

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Entwicklungs-genetik

Bedeutung des
Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K)-Signalwegs
für das
Migrations- und Invasionsverhalten glialer Tumorzellen

Sandra Rauser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst

2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 10.06.2008 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.12.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	2
2.1 Primäre Tumoren des Gehirns	2
2.1.1 Klassifikation von Hirntumoren	2
2.1.2 Molekularpathologie der Astrozytome	3
2.1.3 Klinik der Astrozytome	4
2.2 Störungen in der intrazellulären Signalweiterleitung als Angriffspunkte für Therapien	5
2.3 Signalwege	6
2.3.1 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	6
2.3.2 Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg	8
2.3.3 mTOR (mammalian target of Rapamycin)	9
2.3.4 p44/42 Mitogen aktivierte Protein (MAP)-Kinase (ERK1/ERK2)	10
2.3.5 Endosomale Signalweiterleitung und Rab5	11
2.4 Zellmigration und -invasion	12
2.5 Ziel der Arbeit	15
3 MATERIAL	17
3.1 Gliomzelllinien und gliale Tumoren (Astrozytome)	17
3.1.1 Etablierte humane Gliomzelllinien	17
3.1.2 Frischgewebe von humanen Astrozytomen	17
3.1.3 Primärkulturen von humanen Astrozytomen	18
3.2 Puffer und Lösungen	18
3.2.1 Allgemeine Lösungen	18
3.2.2 Lösungen für die Zellquantifizierung mittels Kristallviolett färbung	18
3.2.3 Lösungen für die Proteinisolierung und die Proteinquantifizierung	18
3.2.4 Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und den Western Blot	19
3.2.5 Lösungen für Fluoreszenzfärbungen	19

3.3 Antikörper	20
3.3.1 Primäre Antikörper für indirekte Immundetektion im Western Blot (WB) und in der Immunfluoreszenz (IF)	20
3.3.2 Sekundäre Antikörper für Western Blot (WB)-Analysen und für die Immunfluoreszenz (IF)	20
3.4 Chemikalien und Reagenzien	21
3.5 Verbrauchsmaterialien	22
3.6 Verwendete Geräte	22
3.7 Computerprogramme zur Datenauswertung und Bildbearbeitung	23
4 METHODEN	24
4.1 Zellkultur	24
4.1.1 Zellkulturbedingungen	24
4.1.2 Gewinnung und Kultivierung von primären Zellen aus humanen Astrozytomen	24
4.1.3 Kultivierung von adhärenenten Zellen	24
4.1.3.1 Auftauen der Zellen	24
4.1.3.2 Zellpassage	25
4.1.3.3 Bestimmung der Zellzahl	25
4.1.3.4 Kryokonservierung der Zellen	25
4.2 Zellbiologische Arbeiten	26
4.2.1 Stimulierungs- und Inhibierungsversuche	26
4.2.1.1 Aktivierungsstatus der Signalwege in den etablierten Gliomzelllinien	26
4.2.1.2 Ermittlung des EGF-Rezeptor-Status in den etablierten Gliomzelllinien	27
4.2.1.2.1 Bestimmung des EGF-Rezeptor-Status mittels Western Blot-Analysen	27
4.2.1.2.2 Bestimmung des Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors mittels Immunfluoreszenz	27
4.2.1.3 Aktivierungsstatus der Signalwege in primären Zellkulturen aus humanen Astrozytomen	27
4.2.2 Zellwachstumsbestimmung	27
4.2.3 Adhäsionsversuch	28
4.2.4 Kristallviolett-färbung zur Zellquantifizierung	28
4.2.5 Wundheilungsversuch	29
4.2.5.1 Etablierung des Wundheilungsversuchs	29
4.2.5.2 Durchführung des Wundheilungsversuchs	29

4.2.5.3 Färben mit Diff-Quik®	30
4.2.5.4 Auswertung der Migrationsrate im Wundheilungsversuch	30
4.2.6 Motilitätsversuch mittels Lebendzellbeobachtung in der Echtzeitmikroskopie	30
4.2.6.1 Beschichtung der ZK-Schalen mit ECM und Collagen I	31
4.2.6.2 Durchführung des Motilitätsversuchs mittels Lebendzellbeobachtung	31
4.2.6.3 Auswertung der Motilitätsversuche mittels Lebendzellbeobachtung	32
4.2.7 Migrations- und Invasionsversuche im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)	33
4.2.7.1 Vorversuche zur Etablierung des modifizierten Boydenkammerversuchs	33
4.2.7.2 Durchführung des modifizierten Boydenkammerversuchs	34
4.2.7.3 Färben der Zellen im modifizierten Boydenkammerversuch für die Fluoreszenzmikroskopie	34
4.2.7.4 Auswertung der Migrations- und Invasionsversuche in der modifizierten Boydenkammer	35
4.2.7.4.1 Konfokale Laserscanningmikroskopie zur Erfassung der Zellen	35
4.2.7.4.2 Quantifizierung der migrierten und invasiven Zellen in der modifizierten Boydenkammer	36
4.2.8 Fluoreszenzfärben von F-Aktin mit TRITC-Phalloidin	36
4.2.8.1 Durchführung der Färbung	36
4.2.8.2 Mikroskopiebedingungen für die Visualisierung der fluoreszenzgefärbten Präparate	37
4.3 Proteinbiochemische Arbeiten	37
4.3.1 Proteinisolierung	37
4.3.1.1 Proteinisolierung aus Zellen	37
4.3.1.2 Proteinisolierung aus Frischgewebe von humanen Astrozytomen	38
4.3.2 Proteinquantifizierung	38
4.3.3 Western Blot-Analysen	38
4.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
4.3.3.2 Proteintransfer	39
4.3.3.2.1 Färben der Proteinbanden auf der PVDF-Membran	39
4.3.3.2.2 Sättigung freier Bindungsstellen („Blocken“)	39
4.3.3.3 Indirekte Immundetektion im Western Blot	40
4.3.4 Doppel-Immunfluoreszenz	40
4.3.4.1 Durchführung der Färbung	40
4.3.4.1 Mikroskopiebedingungen für die Immunfluoreszenz	41

5 ERGEBNISSE	42
5.1 Charakterisierung des Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors und des PI3-Kinase/Akt- und des p44/42 MAP-Kinase-Signalwegs	42
5.1.1 Etablierte Zelllinien	42
5.1.1.1 Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors	42
5.1.1.2 Aktivierungsstatus der Proteinkinase B (PKB)/Akt	43
5.1.1.3 Phosphorylierung der p44/42 Mitogen aktivierten Proteinkinase (p44/42 MAPK)	44
5.1.1.4 Status der kleinen GTPase Rab5	46
5.1.1.5 Aktivierung und Internalisierung des EGF-Rezeptors auf morphologischer Ebene	47
5.1.2 Der PI3/Akt-Signalweg und die p44/42 MAP-Kinase sind in den humanen glialen Tumoren konstitutiv aktiviert	49
5.1.3 Primäre Zellkulturen aus humanen glialen Tumoren	52
5.1.3.1 Aktivierung von PKB/Akt, p44/42 MAPK und p70S6K in den primären Zellkulturen aus TUM G2	53
5.1.3.2 Aktivierung von p44/42 MAPK und p70S6K in der primären Zellkultur aus TUM G4	54
5.1.3.3 Aktivierungsstatus von PKB/Akt, p70S6K und p44/42 MAPK in der primären Zellkultur aus TUM G6	55
5.2 Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der Gliomzelllinien	56
5.2.1 EGF hat keinen Einfluss auf die Proliferation der Gliomzelllinien	57
5.2.2 Die Blockade der PI3-Kinase führt zu einer Reduzierung der Proliferation in den etablierten humanen Gliomzelllinien	58
5.3 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens der Gliomzelllinien	59
5.3.1 Collagen I steigert die Adhäsionsrate der Gliomzelllinien	61
5.3.2 Die Hemmung der PI3-Kinase verringert die Adhäsionsrate der Gliomzelllinien	61
5.4 Charakterisierung des Migrations- und Infiltrationsverhaltens der Gliomzelllinien	64
5.4.1 Wundheilungsversuch	64
5.4.1.1 Migrationsfähigkeit der Zelllinien im Wundheilungsversuch	64
5.4.1.2 EGF erhöht die Migrationsrate der Gliomzelllinien im Wundheilungsversuch	65
5.4.1.3 Die Blockade der PI3-Kinase führt zu einer verminderten Migrationsrate der Gliomzelllinien im Wundheilungsversuch	66
5.4.2 Motilitätsversuche mittels Echtzeitmikroskopie (Lebendzellbeobachtung)	69
5.4.2.1 Bestimmung der Versuchsbedingungen für die Echtzeitmikroskopie	69

5.4.2.2 Motilitätsbestimmung mittels Lebendzellbeobachtung in den Gliomzelllinien	71
5.4.2.3 Die Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs führt zu einer verminderten Motilitätsrate	72
5.4.2.4 EGF erhöht die Motilitätsrate	73
5.4.3 Migrations- und Invasionsverhalten im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)	74
5.4.3.1 Migrationsverhalten der Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)	75
5.4.3.1.1 EGF erhöht die Migrationsrate von Gliomzellen im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)	75
5.4.3.1.2 Die Blockade der Signalwege führt zu einer Verminderung der Migrationsrate im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)	77
5.4.3.2 Invasionsverhalten der Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)	79
5.4.3.2.1 EGF erhöht die Invasionsrate der Gliomzelllinien	79
5.4.3.2.2 Die Blockade der Signalwege führt zu einer Verringerung der Invasionsrate	80
5.4.3.2.3 Die Blockade der PI3-Kinase führt zu einer reduzierten Invasivität der Gliomzelllinien	81
5.4.3.2.4 Die Invasivität von Gliomzelllinien mit niedrigem EGF-Rezeptorstatus wird durch die Blockade mit Tyrphostin AG1478 gehemmt	82
5.4.3.3 Aktivierung der Signalwege im Migrations- und Invasionsversuch in der modifizierten Boydenkammer	83
5.4.3.3.1 Die Reduktion der Invasivität ist nicht abhängig vom Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors	83
5.4.3.3.2 Die Hemmung der Invasivität ist abhängig vom Aktivierungsstatus der Proteinkinase B (PKB)/Akt	85
5.4.3.3.3 Aktivierungsstatus der p44/42 MAP-Kinase (MAPK)	86
5.5 Herunterregulierung des Tumorsuppressors PTEN mittels <i>small interfering RNA</i> (siRNA)	87
5.5.1 Die Expressionshemmung von PTEN führt zu einer erhöhten Motilität in der Gliomzelllinie LN229	87
5.5.2 Die Expressionshemmung von PTEN führt zu einer erhöhten Migration der Gliomzelllinie LN229 im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)	88
5.5.3 Die Expressionshemmung von PTEN führt zu einer verminderten Invasivität der Gliomzelllinie LN229	89

5.6 Ausbildung des Aktinzytoskeletts in den Gliomzelllinien	90
5.6.1 Das Aktinzytoskelett ist in den Gliomzelllinien unterschiedlich angeordnet	90
5.6.2 Collagen I führt zu einer veränderten Ausbildung des Aktinzytoskeletts	91
5.6.3 Einfluss der Blockade der PI3-Kinase auf das Aktinzytoskelett	91
6 DISKUSSION	94
6.1 Bedeutung der Aktivierung des PI3K- und p44/42 MAPK-Signalwegs	94
6.2 Zentrale Stellung der PI3-Kinase im Proliferations-, Adhäsions-, Migrations- und Invasionsverhalten der glialen Tumorzellen	98
6.2.1 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für das proliferative Verhalten von Gliomzellen	98
6.2.2 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für das Adhäsionsverhalten von Gliomzellen	99
6.2.3 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für das Migrations- und Invasionsverhalten von Gliomzellen	101
6.2.3.1 Die Blockade des PI3K/Akt-Signalwegs führt zu einer verringerten Migration	101
6.2.3.2 Die Blockade des EGFR/PI3K/Akt-Signalwegs führt zu einer reduzierten Invasion	102
6.2.4 Vergleich der Migrationsuntersuchungen in den Gliomzelllinien hinsichtlich der vier verwendeten Versuchsansätze	103
6.3 Ausblick	107
7 LITERATURVERZEICHNIS	109
8 ANHANG	115
Abkürzungen	115
Kinetikstudien zur Internalisierung des aktivierten EGF-Rezeptors mittels Doppel-Immunfluoreszenzanalysen	117
DANKSAGUNG	119

1 Zusammenfassung

Gliomzellen, die aus der soliden Tumormasse in das umgebende gesunde Gehirngewebe hineinwandern, tragen hauptsächlich zur Therapieresistenz der meisten Glioblastome bei (Maher *et al.*, 2001). Zu den häufigsten genetischen Veränderungen zählen Überexpression und Amplifikation des Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor-Onkogens und Deletionen des Tumorsuppressors PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*) (Smith *et al.*, 2001; Kleihues und Ohgaki, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb mittels chemischer Inhibitoren die Bedeutung des EGF-Rezeptors und der nachgeschalteten PI3K (Phosphatidylinositol-3'-Kinase)/Akt- und p44/42 MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinase)-Signalwege auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten in humanen Gliomzellen untersucht.

In biochemischen Studien zeigte sich zunächst, dass der PI3K/Akt- und der p44/42 MAPK-Signalweg unabhängig voneinander in den untersuchten glialen Tumorzelllinien und humanen glialen Tumoren aktiviert sind. In anschließenden funktionellen Studien erwiesen sich Proliferation, Migration und Invasion ebenfalls als voneinander unabhängige Parameter. Das Migrationsverhalten der Gliomzelllinien wurde dabei anhand verschiedener Methodikansätze ermittelt, die auf zweidimensionaler Ebene Wundheilungsversuche sowie Lebendzellbeobachtungen umfassten. Im modifizierten Boydenkammersystem wurden dreidimensionale Migrations- und Invasionsstudien durchgeführt. Hierzu wurde eine verfeinerte Methodik etabliert, die auf konfokaler Mikroskopie und semiautomatischer quantitativer Bildanalyse beruht. Dabei wurde nachgewiesen, dass das erfolgreiche Ansprechen der Blockade der Signalwege nicht nur alleine vom Status des EGF-Rezeptors abhängig war, sondern auch vom Status des nachgeschalteten PI3K/Akt-Signalwegs. Zelllinien, bei denen der PI3K/Akt-Signalweg wirksam gehemmt wurde, hatten eine Abnahme in ihrer Invasivität zur Folge. Zelllinien mit geringer EGFR-Expression reagierten sehr sensitiv auf die Inhibierung des EGF-Rezeptors. Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass die Unterschiede im Ansprechen in der unterschiedlichen Kinetik der Internalisierung und Signalantwort des EGF-Rezeptors liegen könnten.

Die Blockade des PI3K/Akt-Signalwegs mit chemischen Inhibitoren führte außerdem zu einer erfolgreichen Verringerung sowohl des Proliferations- als auch des Adhäsions- und Motilitätsverhaltens. Das erfolgreiche Ansprechen auf eine Inhibierung in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus des PI3-Kinase- und des p44/42 MAPK-Signalwegs konnte jedoch nicht zuverlässig vorhergesagt werden.

Die Herunterregulierung von PTEN mittels siRNA hatte ebenfalls eine Abnahme der Motilitätsrate zur Folge. Fluoreszenzfärbungen von F-Aktin deuteten darauf hin, dass die Hemmung der PI3-Kinase an einem Umbau des Aktinzytoskeletts beteiligt war und somit Einfluss auf die Migration nahm.

2 Einleitung

2.1 Primäre Tumoren des Gehirns

Als primäre Tumoren des Gehirns werden alle gut- und bösartigen Geschwülste bezeichnet, die ihren Ursprung von den verschiedenen Zelltypen der Gehirnssubstanz selbst oder den sie umgebenden Hirnhäuten nehmen. Den größten Anteil dieser Tumoren machen dabei mit etwa 60% die Astrozytome aus, die von den Stützzellen des zentralen Nervensystems (Gliazellen) entstehen. Mit dem Glioblastom befindet sich unter diesen Tumoren der häufigste und zugleich bösartigste primäre Gehirntumor (Gurney und Kadan-Lottick, 2001). Es kann überall im Gehirn entstehen, doch tritt es gewöhnlich im Temporal-, Frontal- und Seitenlappen auf (Kleihues und Cavenee, 2000).

Über die Ursachen für die Entstehung von Astrozytomen ist bisher wenig bekannt. Typische Lebens- und Ernährungsgewohnheiten, wie z.B. Rauchen oder übermäßiger Alkoholkonsum, die für das Auftreten von anderen Tumorerkrankungen eine große Rolle spielen, scheinen für die Entwicklung von primären Hirntumoren nicht von Bedeutung zu sein (Ohgaki und Kleihues, 2005). Ebenso wenig konnte bisher ein Zusammenhang mit elektromagnetischen Feldern im Bereich von Hochspannungsleitungen oder mit einer übermäßigen Nutzung von Mobiltelefonen nachgewiesen werden, wobei hierzu bisher noch keine Langzeitstudien vorliegen (Ohgaki und Kleihues, 2005; Lönn *et al.*, 2004). Insgesamt sind Männer häufiger von einer Erkrankung mit einem Glioblastom betroffen als Frauen. In einer europäischen Studie konnte dabei eine Inzidenzrate je 100000 Bewohner pro Jahr von 3.32 bei Männern und 2.24 bei Frauen festgestellt werden (Ohgaki *et al.*, 2004).

2.1.1 Klassifikation von Hirntumoren

Die Klassifikation der primären Hirntumoren erfolgt nach einem Graduierungssystem der WHO (*world health organization*), dessen einzelne Stufen den Malignitätsgraden (WHO-Grade I-IV) entsprechen (Kleihues und Cavenee, 2000). Diese tragen dabei in erster Linie histopathologischen Kriterien Rechnung, aber auch spezifischen genetischen Veränderungen, die eine gute Korrelation mit dem entsprechenden Tumorgrad aufweisen.

In Bezug auf die Astrozytome unterscheidet die WHO-Klassifikation zwischen den bei Kindern und Jugendlichen auftretenden, umschriebenen benignen Tumoren des Grades I (pilozytisches Astrozytom, pleomorphes Xanthoastrozytom und subependymales Riesenzellastrozytom)

und den diffus infiltrierenden, malignen Astrozytomen der Erwachsenen. Diese zweite Gruppe weist dabei eine regelhafte Tendenz zur Tumorprogression auf, die durch die astrogliale Reihe vom niedergradigen diffusen Astrozytom (WHO-Grad II) bis zu den beiden hochmalignen Formen, d.h. anaplastisches Astrozytom (Grad III) und Glioblastom (Grad IV), wiedergegeben wird.

Die WHO-Gradierung dient aber auch als eine Art Wegweiser für die weitere Behandlung dieser Tumoren (vgl. auch Tab. 2.1). So ist bei den benignen Astrozytomen des Grades I eine operative Entfernung ausreichend, unter der Voraussetzung, dass der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnose als operierbar eingestuft wird. Die niedergradig malignen Tumoren des Grades II können einen langen klinischen Verlauf haben und sind häufig durch eine Operation nicht heilbar. 70% dieser Astrozytome werden innerhalb von 5-10 Jahren nach Diagnosestellung zu Gliomen der Grade III und IV. Typischerweise sind junge Erwachsene betroffen. Grad III-Tumore sind bereits bösartig und führen innerhalb von wenigen Jahren zum Tod. Betroffen sind Erwachsene im Alter von etwa 35-45 Jahren, bei denen der Tumor entweder primär oder als Rezidiv eines zuvor niedergradigen Astrozytoms auftritt. Die hochmalignen Tumore des Grades IV sind normalerweise therapieresistent und führen innerhalb von einem Jahr zum Tod. Auch diese Tumoren treten entweder primär oder als Rezidiv eines zuvor niedergradigen Astrozytoms auf (Maher *et al.*, 2001).

Tab. 2.1: Überblick über die Tumorbilogie von Astrozytomen.

Klassifikation	Tumorbilogie und Therapieansätze	Altersgipfel	Überleben
WHO-Grad I	gutartig, langsames Tumorstadium, operative Tumorentfernung, günstige Prognose (gute Heilungschance)	Kindesalter	
WHO-Grad II	niedrigmaligne, erhöhte Neigung zur Rezidivbildung nach Tumorentfernung, Übergang in bösartige Tumoren möglich	30. bis 35. Lebensjahr	5-8 Jahre
WHO-Grad III	hochmaligne, nach der Operation sind Strahlen- und/oder Chemotherapie notwendig	35. bis 45. Lebensjahr	2-3 Jahre
WHO-Grad IV	hochmaligne, rasches Tumorstadium, nach der Operation sind Strahlen- und/oder Chemotherapie notwendig, schlechte Prognose (zumeist keine Heilungschance)	45. bis 70. Lebensjahr	9-12 Monate

Angegeben ist das tumorbilogische Verhalten, die in der Regel angewendeten Therapieansätze, die Altersgipfel für die Erkrankung und das mediane Überleben zum Zeitpunkt der Diagnose von Astrozytomen entsprechend der einzelnen WHO-Grade (zusammengestellt aus Behin *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2001; Kleihues und Cavenee, 2000).

2.1.2 Molekularpathologie der Astrozytome

Der Nachweis genetischer Veränderungen bei Gliomen korreliert sehr gut mit dem histopathologischen Grad, d.h. es wird eine Progression von den differenzierten, weniger malignen Tumoren bis hin zum hochmalignen Phänotyp beobachtet (Kleihues und Cavenee, 2000). Zum Glioblastom können dabei unterschiedlich genetisch determinierte Wege führen. Wie Abb. 2.1

zeigt weisen sekundäre Glioblastome, also solche, die durch Tumorprogression entstanden sind, häufig Mutationen im *TP53*-Gen auf. Primäre, *de novo* auftretende Glioblastome sind dagegen vor allem durch eine Amplifikation des *EGFR*-Gens und eine Deletion des *PTEN*-Gens charakterisiert (Smith *et al.*, 2001; Kleihues und Ohgaki, 1999). Beide Veränderungen führen schließlich zu funktionellen Konsequenzen in der intrazellulären Signalweiterleitung.

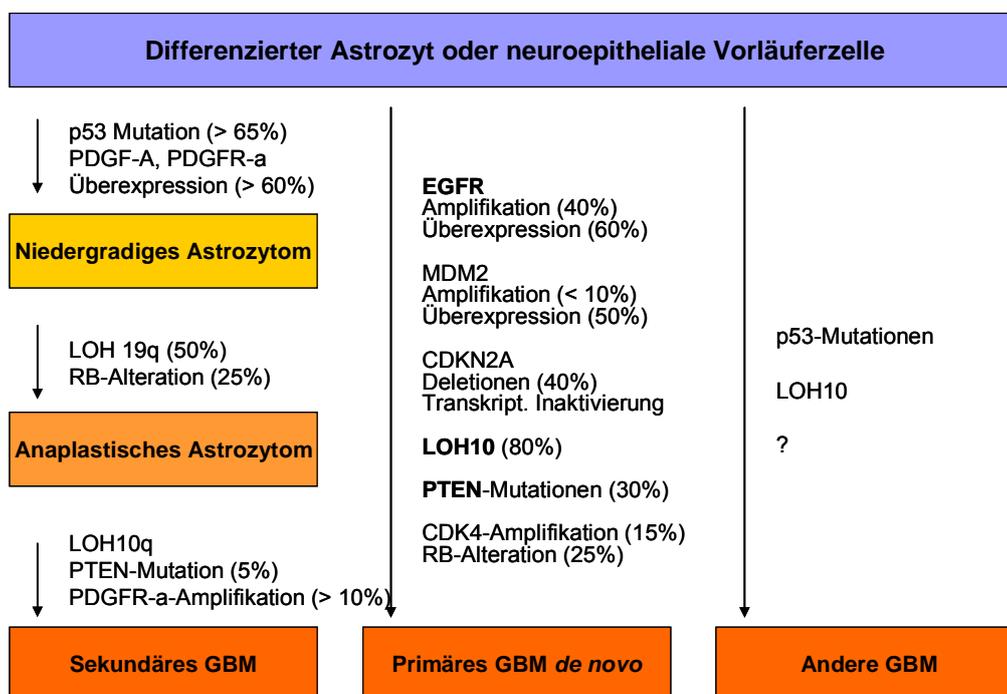


Abb. 2.1: Genetische Veränderungen in astroglialen Tumoren.

Sekundäre Glioblastome, die durch Tumorprogression aus niedergradigen Astrozytomen entstehen, sind vor allem durch Mutationen im *TP53*-Gen charakterisiert. Primäre, *de novo* auftretende Glioblastome weisen vor allem Amplifikationen des *EGFR*-Gens und Deletionen des *PTEN*-Gens auf (Abbildung modifiziert nach Ohgaki *et al.*, 2004).

2.1.3 Klinik der Astrozytome

Die Prognose für die malignen Gliome ist nach wie vor sehr schlecht, was vor allem auf die hohe Rezidivrate nach der Operation und die starke Tendenz zur Tumorprogression zurückzuführen ist. Zusätzlich werden die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Rückfällen immer kürzer (Maher *et al.*, 2001).

Die Bezeichnung „diffus infiltrierende Astrozytome“ beschreibt dabei zugleich das größte klinische Problem dieser Erkrankung. Bereits die niedergradigen Tumoren weisen ein äußerst ausgeprägtes infiltratives Wachstum gegenüber dem angrenzenden Gehirngewebe auf, indem einzelne Tumorzellen aus einem Gliom mehrere Zentimeter tief in das benachbarte gesunde Normalgewebe einwandern. In histologischen Schnitten von Gliomen zeigt sich ein zentrales

Areal aus Nekrose, das von einem Ring aus solidem Tumor und einer peripheren Zone mit infiltrierenden Zellen umgeben wird. Diese Eigenschaft ist auch hauptverantwortlich dafür, dass eine Heilung durch Operation kaum möglich ist, selbst wenn die Tumoren in Gehirnbereichen auftreten, in denen eine großzügige Gewebeentfernung möglich wäre (Maher *et al.*, 2001). Die migrierenden Tumorzellen bilden oftmals den Ausgangspunkt für ein erneutes Tumorwachstum nach erfolgter Resektion. Adjuvante Therapien wie Bestrahlung und gegebenenfalls Chemotherapie wirken zudem oftmals nicht heilend, sondern können nur den Zeitpunkt des Todes der betroffenen Patienten hinauszögern (Maher *et al.*, 2001). Tatsächlich haben sich die Prognoseaussichten seit den letzten 15 Jahren nicht verbessert (Mischel und Cloughesy, 2003). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Glioblastom-Patienten beträgt weniger als 3% (Ohgaki und Kleihues, 2005). Neue und spezifischere Behandlungsmethoden sind zwingend erforderlich.

2.2 Störungen in der intrazellulären Signalweiterleitung als Angriffspunkte für Therapien

Als allgemeine Ursachen für das Entstehen und Fortschreiten der meisten Krebserkrankungen gelten Fehlregulationen von Wachstumsprozessen, an denen verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege beteiligt sind. Hanahan und Weinberg entwickelten dazu die Hypothese, dass allen Arten von Tumorerkrankungen sechs wesentliche Veränderungen in der Zellphysiologie zugrunde liegen, die während der Tumorprogression neu erworben werden und gemeinsam für das bösartige Wachstum verantwortlich sind: (i) Unabhängigkeit von Wachstumsignalen, (ii) Insensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen, (iii) Resistenz gegenüber Apoptose, (iv) unlimitiertes replikatives Potential, (v) Aufrechterhalten der Angiogenese und (vi) Gewebeinvasion und -metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000).

In den letzten Jahren konnten zunehmend zielgerichtete Therapiestrategien entwickelt werden, die in den Prozess der Signaltransduktion eingreifen und als viel versprechende Ergänzung zur Chemotherapie angesehen werden. So profitieren etwa 35% der Brustkrebspatientinnen mit einer ERBB2/HER2-Überexpression von einer Behandlung mit Herceptin (Trastuzumab), einem monoklonalen Antikörper gegen HER2 (Vogel *et al.*, 2002; Slamon *et al.*, 2001). Auch Iressa (Gefitinib), ein EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor, ist klinisch zugelassen und wird bei der Therapie von EGFR-überexprimierenden Patienten mit Lungenkrebs (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) eingesetzt (Hynes und Lane, 2005; Lynch *et al.*, 2004). Weitere Therapeutika, die zielgerichtet gegen Onkoproteine eingesetzt werden sollen, befinden sich in verschiedenen Stadien klinischer Studien (Gschwind *et al.*, 2004).

2.3 Signalwege

2.3.1 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor wird zu der Subklasse I der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) gezählt und hat ein Molekulargewicht von 170kDa. Die Familie der EGF-Rezeptoren umfasst dabei außer EGFR (ERBB1) die drei weiteren Mitglieder ERBB2 (HER2, *human EGFR-related 2*), ERBB3 und ERBB4. Alle diese Rezeptoren verfügen über eine extrazelluläre Liganden-Bindedomäne, eine Transmembran-Region und eine zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne. Die Bindung von Liganden (z.B. EGF, *epidermal growth factor*, und TGF, *transforming growth factor*) bewirkt dabei die Bildung von Homo- und Heterodimeren der vier Rezeptor-Untereinheiten und die Aktivierung der intrinsischen Kinasedomäne. Über ihre ATP-Bindestelle wird die Phosphorylierung spezifischer zytoplasmatischer Tyrosinreste katalysiert, welche wiederum als Bindungsstellen für Proteine mit einer SH2 (*Src-homology 2*)- und PTB (*phosphotyrosine binding*)-Domäne dienen, wie z.B. PLC γ (*phospholipase C gamma*), CBL, GRB2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) und SHC (*Src homology 2 domain containing transforming protein*). Diese Proteine rekrutieren nun weitere Effektormoleküle mit SH2-, SH3-, PTB- und PH (Pleckstrin-Homologie)-Domänen, was zur Auslösung von verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden führt (Schlessinger, 2000). Der aktivierte EGF-Rezeptor wird schließlich im frühen Endosom internalisiert und nach Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes entweder zur Membran zurücktransportiert oder im Lysosom abgebaut. Zwei der wichtigsten Signalkaskaden, die über den EGF-Rezeptor aktiviert werden, sind der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg und der Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg (vgl. auch Abb. 2.2).

Zu den wichtigsten Autophosphorylierungsstellen im C-Terminus des EGF-Rezeptors zählen die Tyrosinreste 992, 1068, 1086, 1148 und 1173 (Hynes und Lane, 2005), welche essentiell für die Kinaseaktivität und die Internalisierung des Rezeptors sind (Sorkin *et al.*, 2000). Die phosphorylierten Tyrosinreste Tyr1068 und Tyr1086 agieren dabei als Bindungsstelle für GRB2, das sowohl über die Bindung von GAB1 an der Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signalwegs beteiligt ist (Hynes und Lane, 2005; Rodrigues *et al.*, 2000), als auch die Internalisierung des EGF-Rezeptors in *clathrin-coated pits* reguliert (Jiang *et al.*, 2003).

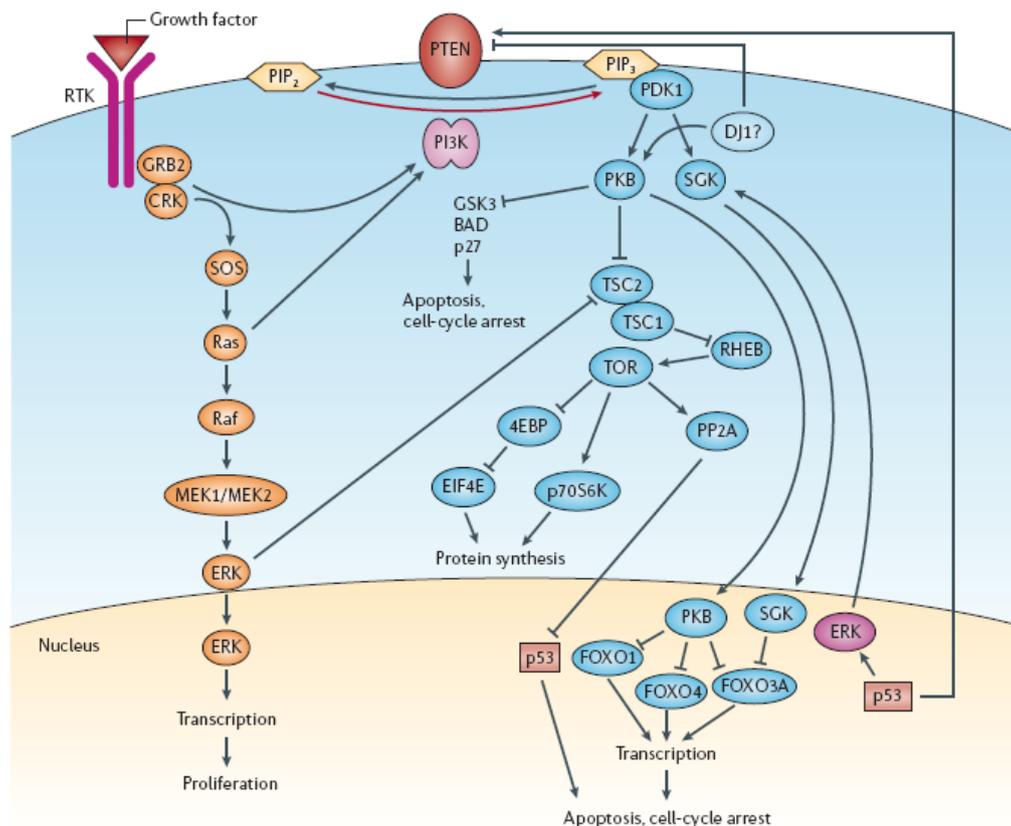


Abb. 2.2: Übersicht über durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) aktivierte Signalwege und durch sie regulierte zellphysiologische Prozesse.

Die Bindung von Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, *epidermal growth factor*) führt zur Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. EGF-Rezeptor), die wiederum die Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs (links, orange Symbole) und des Akt(PKB)/PI3-Kinase (PI3K)/mTOR-Signalwegs (rechts, blaue Symbole) auslöst. Die PI3-Kinaseaktivität phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) und aktiviert PDK1 (*phosphatidylinositol-dependent kinase 1*). PDK1 bewirkt die vollständige Aktivierung von PKB/Akt an Ser473. Der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) reguliert die PI3-Kinase negativ, indem es PIP₃ dephosphoryliert. PKB/Akt aktiviert mTOR nach Heterodimerbildung von TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex 1 and 2*) und Inhibierung von RHEB (*Ras homologue enriched in brain*). Die Bindung von Liganden an Rezeptor-Tyrosinkinasen bewirkt über den Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (*son of sevenless*) außerdem die Aktivierung von Ras, Raf, MEK1/2 (MAPK/ERK Kinasen 1 und 2) und ERK1/2 (*extracellular regulated kinase 1 and 2*, auch p44/42 MAPK genannt) (Abbildung aus Cully *et al.*, 2006).

Im normalen und neoplastischen Gewebe ist die Signalweiterleitung durch den EGF-Rezeptor an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel der Proliferation, Differenzierung und der Zellmotilität (Prenzel *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2001).

Bei 40% der primären Glioblastome konnte eine Amplifikation, bei 60% eine Überexpression des *EGFR*-Gens nachgewiesen werden (vgl. Abb. 2.1). Beides hat eine verstärkte oder konsti-

tativ aktive Signalweiterleitung in der Zelle zur Folge und führt zu Veränderungen des tumorbiologischen Verhaltens (Kleihues und Ohgaki, 1999).

In klinischen Studien für Glioblastom-Therapien wurden verschiedene Tyrosinkinase-Inhibitoren untersucht und bei einem Teil der Patienten konnte eine Wachstumsinhibierung oder eine Reduzierung der Tumorgroße gezeigt werden (Mellinghoff *et al.*, 2005; Goudar *et al.*, 2005; Arteaga und Baselaga, 2004). Als Beispiel sei hier das Tyrphostin ZD1839 (Iressa, Gefitinib) genannt, das den EGF-Rezeptor an der ATP-Akzeptorstelle (Lysin 721) innerhalb der intrinsischen Kinasedomäne blockiert und so die Autophosphorylierung verhindert (Kari *et al.*, 2003). Ebenso wurden monoklonale anti-EGFRvIII (*EGFR deletion mutant variant III*)-Antikörper entwickelt, die eine Internalisierung des Rezeptors begünstigen und dadurch die Phosphorylierung des Rezeptors und die Signalweiterleitung herunterregulieren (Mischel und Cloughesy, 2003).

Ein weiterer chemischer, spezifischer Inhibitor des EGF-Rezeptors ist Tyrphostin AG1478, welches die ATP-Bindungsstelle der intrazellulären Kinasedomäne blockiert (Levitzki und Gazit, 1995).

2.3.2 Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg

Die Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3-Kinase) ist eine Lipidkinase und stellt eine wichtige Komponente unterhalb von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK)-Signalkaskaden dar (Cantley, 2002) (vgl. auch Abb. 2.2). Nach Aktivierung von RTKs wird durch die Bindung der entsprechenden p85 Untereinheit die katalytische p110 Untereinheit der PI3-Kinase aktiviert. An der Zellmembran katalysiert p110 dann die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃), indem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) an der D3-Position seines Inositolringes phosphoryliert wird. PIP₃ wiederum trägt zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Effektorproteine mit einer Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne bei, darunter auch die Serin (Ser)/Threonin (Thr)-Kinase PKB (Proteinkinase B)/Akt. Durch die Phosphorylierung an Thr308 wird PKB/Akt durch PDK1 (*phosphatidylinositol-dependent kinase 1*) teilweise aktiviert, und eine zusätzliche Phosphorylierung an Ser473 im C-Terminus von PKB/Akt bewirkt schließlich seine vollständige Aktivierung (Cully *et al.*, 2006; Cantley, 2002). PKB/Akt selber ist an der Regulation verschiedener Zielproteine beteiligt, die u.a. Zellproliferation, -wachstum, -überleben und -motilität kontrollieren - alles Prozesse, die eine kritische Rolle in der Tumorigenese spielen (Vivanco und Sawyers, 2002).

Der Tumorsuppressor PTEN/MMAC1 (PTEN, *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*; MMAC 1, *mutated in multiple advanced cancers 1*) agiert dabei als negativer Regulator der PI3-Kinase. PTEN dephosphoryliert PIP₃, wandelt es wieder zu PIP₂ um und inhibiert somit den PI3-Kinase-Signalweg (Cantley und Neel, 1999) (Abb. 2.2). Durch den Funk-

tionsverlust von PTEN wird der intrazelluläre PIP3-Level erhöht, was zu einer übermäßigen Phosphorylierung von Akt/PKB führt und damit auch zu einer Verstärkung der von PKB/Akt regulierten zellulären Prozesse (Brazil *et al.*, 2002).

Die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs spielt bei der Pathogenese verschiedener Tumortypen eine große Rolle (Luo *et al.*, 2003), wobei dies bei 55% der Gliome nachgewiesen werden konnte (Bellacosa *et al.*, 2005). Gliom-Patienten mit aktiviertem PI3K/Akt-Signalweg haben außerdem eine deutlich kürzere Überlebensrate (Chakravarti *et al.*, 2004). In 15-40% der Glioblastome konnte eine Mutation des *PTEN*-Gens auf 10q23 gezeigt werden, wobei diese *PTEN*-Mutationen fast ausschließlich in primären und eher selten in sekundären Glioblastomen auftraten (Ohgaki *et al.*, 2004). 80% der sekundären Glioblastome weisen einen LOH10 (*loss of heterozygosity*) auf (Kleihues und Ohgaki, 1999).

Ein spezifischer, chemischer Inhibitor der PI3-Kinase ist LY294002, welches die ATP-Bindungsstelle des Enzyms blockiert (Baumann und West, 1998).

PKB/Akt wird außerdem für die Aktivierung von mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) benötigt, welches an der Proteinsynthese beteiligt ist (Gingras *et al.*, 1998).

2.3.3 mTOR (*mammalian target of Rapamycin*)

mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die eine C-terminale Region mit Homologie zu der katalytischen Domäne der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) besitzt (Schmelzle und Hall, 2000).

PKB/Akt aktiviert mTOR dabei über die Phosphorylierung und Inhibierung von TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*, auch Tuberin genannt). TSC1 (auch Hamartin genannt) und TSC2 bilden daraufhin ein Heterodimer mit GTPase-Aktivität, welches die Aktivität von RHEB (*Ras homologue enriched in brain*) inhibiert (vgl. Abb. 2.2). Die kleine GTPase RHEB wiederum aktiviert mTOR, das einen Rapamycin-sensitiven Komplex mit Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) bildet (Hay, 2005). mTOR kontrolliert somit die Translationsmaschinerie, indem es die p70S6K Proteinkinase aktiviert und den eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) Inhibitor 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*) inhibiert, was zu einer Zunahme in der Proteinbiosynthese und zu einer selektiven Translation von bestimmten mRNA-Populationen führt (Manning, 2004; Schmelzle und Hall, 2000). Diese Eigenschaften der TOR-Proteine scheinen auch hauptverantwortlich zu sein für ihre Fähigkeit Zellwachstum und -proliferation zu regulieren (Fingar und Blenis, 2004).

Für mTOR selbst konnten bisher zwar noch keine onkogenen Eigenschaften nachgewiesen werden, aber verschiedene Proteine, darunter auch PI3K, die mit dem mTOR-Signalweg assoziiert sind, haben onkogenes Potential und/oder die Fähigkeit zur Zelltransformation. Sowohl in

Glioblastomzelllinien als auch in Mausmodellen konnte eine anti-proliferative Wirkung der mTOR-Inhibitoren Rapamycin und CCI-779 festgestellt werden (Podsypanina *et al.*, 2001; Schmelzle und Hall, 2000), wobei CCI-779 bereits erfolgreich in klinischen Phase II-Studien bei Mamma- und Nierentumoren eingesetzt wurde (Mita *et al.*, 2003).

Der mTOR-Inhibitor Rapamycin, welches aus dem Bodenbakterium *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde und antibiotische Eigenschaften aufweist (Gregory *et al.*, 1995), blockiert mTOR, indem es mit FKBP12 (*FK506 binding protein 12*) einen Komplex bildet, der an die FRB (*FKBP12-rapamycin binding*)-Region im C-Terminus des mTOR-Proteins bindet und somit dessen Aktivität inhibiert (Chen *et al.*, 1995).

2.3.4 p44/42 Mitogen aktivierte Protein (MAP)-Kinase (ERK1/ERK2)

Die p44/42 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) gehört neben JNK/SAPK (*c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*), ERK5/BMK1 (*extracellular regulated kinase 5/big MAP kinase 1*) und p38 MAPK zu einer der vier Unterfamilien der MAPK Familie. Nach Aktivierung unter anderem über Rezeptor-Tyrosinkinasen wie den EGF-Rezeptor binden zunächst Adapterproteine wie GRB2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) an den Rezeptor (vgl. Abb. 2.2). GRB2 rekrutiert den Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (*son of sevenless*) an die Zellmembran, der durch den Austausch von GDP zu GTP die kleine GTPase Ras aktiviert. Ras wiederum bewirkt die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Raf, was über die intermediären Threonin/Tyrosin-Kinasen MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK Kinasen 1 und 2) zur Tyrosin- und Threoninphosphorylierung von ERK1 und ERK2 (*extracellular regulated kinase 1 and 2*, auch p44/42 MAPK genannt) führt. Die p44/42 MAPK wird daraufhin in den Zellkern transloziert und phosphoryliert dort verschiedene Transkriptionsfaktoren. Die daraus resultierenden Veränderungen in der Genregulation betreffen Vorgänge im Zellzyklus, wie z.B. Proliferation und Apoptose, und der Zellmigration und -invasion (Kolch, 2005; Sebolt-Leopold und Herrera, 2004). Über die Aktivierung der PI3-Kinase durch Ras sowie die negative Regulierung von Raf durch Akt sind die MAP-Kinasen auch mit dem PI3-Kinase/Akt-Signalweg assoziiert (Sebolt-Leopold und Herrera, 2004).

Die MEK-Inhibitoren PD0325901 und ARRY-142886 zeigten vielversprechende Erfolge in verschiedenen Tumormodellen und befinden sich nun in klinischen Phase I-Studien (Sebolt-Leopold und Herrera, 2004). Ein kommerziell erhältlicher, chemischer Inhibitor der p44/42 MAPK ist PD98059, welches die Aktivierung von MEK1 und damit die Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung der p44/42 MAPK verhindert (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995).

2.3.5 Endosomale Signalweiterleitung und Rab5

Das klassische Modell der Signaltransduktion geht von membrangebundenen Rezeptoren aus, die nach Aktivierung durch extrazelluläre Liganden Sekundär-Botenstoffe im Zytosol aktivieren, die das Signal zum Zellkern weiterleiten. Endozytose wurde dabei lange als ein Prozess angesehen, der die Signalweiterleitung beendet, indem der aktivierte Rezeptorkomplex nach der Internalisierung von der Plasmamembran wieder degradiert wird. Verschiedene Arbeiten konnten aber zeigen, dass die Signalweiterleitung im Endosom bestehen bleibt und nicht abgebrochen wird (Schoeberl *et al.*, 2002; Sorkin *et al.*, 2000). Hierbei ist eine bestimmte Kompartimentalisierung der endozytischen Organellen für eine räumliche und zeitliche Regulierung der Signaltransduktion verantwortlich (Miaczynska *et al.*, 2004a).

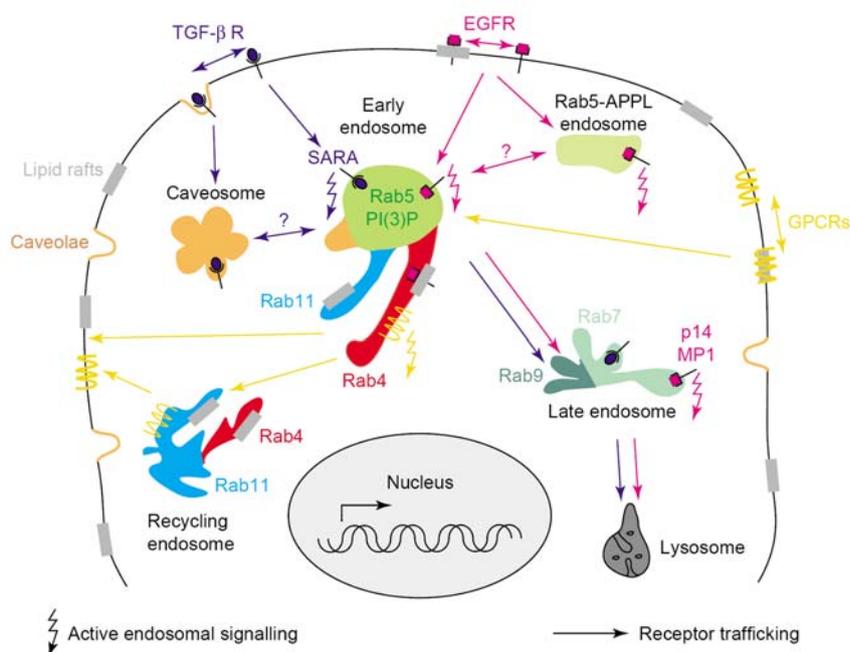


Abb. 2.3: Signalweiterleitung in endosomalen Kompartimenten.

Rezeptoren wie der EGF-Rezeptor (magenta) werden nach Aktivierung internalisiert und ins frühe Endosom, das mit Rab5 assoziiert ist, transportiert. Über das Recycling-Endosom werden sie wieder an die Zellmembran zurücktransportiert oder über das späte Endosom im Lysosom degradiert. Die Signalweiterleitung bleibt im Endosom bestehen (Abbildung aus Miaczynska *et al.*, 2004b).

Wird der EGF-Rezeptor mit EGF aktiviert, löst er außer verschiedenen Signalkaskaden zugleich die eigene Endozytose aus, indem er in *clathrin-coated pits* (CCPs) und *clathrin-coated vesicles* (CCVs) internalisiert und zu den frühen Endosomen transportiert wird (Sorkin und Von Zastrow, 2002; Yarden und Sliwkowski, 2001). Die kleine GTPase Rab5 ist in diesem Prozess an der Kontrolle des endozytischen Vesikeltransports beteiligt, indem es sowohl die Vesikelbil-

dition als auch die Fusion der frühen Endosomen durch Rekrutierung von EEA1 (*early endosomal antigen 1*) reguliert (Benmerah, 2004; Clague und Urbé, 2001). Im frühen Endosom erfolgt dann eine Art Sortierung für den weiteren Verlauf: Die Rezeptoren werden nun entweder über das Recycling-Endosom wieder an die Zellmembran zurücktransportiert oder über das späte Endosom im Lysosom abgebaut (Miaczynska *et al.*, 2004b) (vgl. Abb. 2.3).

Die zeitliche Dauer des Signalweiterleitungsprozesses hängt dabei vom Anteil der Rezeptoren ab, die abgebaut werden, im Vergleich zu denen, die nach Recycling wieder an die Plasmamembran zurücktransportiert werden. So konnte z.B. für den EGF-Rezeptor nachgewiesen werden, dass 25-30% der internalisierten Rezeptoren wieder an die Membran gelangen, während der restliche Anteil im Lysosom degradiert wird (Wiley, 2003).

2.4 Zellmigration und -invasion

Zellmigration und -invasion ermöglichen es Zellen innerhalb eines Gewebeverbands ihre Position zu verändern. Diese Mechanismen übernehmen in normalen, nicht-neoplastischen Zellen während physiologischer Prozesse (z.B. Embryogenese, Wundheilung und Immunantwort) eine essentielle und lebenswichtige Funktion. In Tumoren sind sie jedoch hauptverantwortlich für die Entstehung von Rezidiven und damit indirekt auch für die schlechten Überlebenschancen der betroffenen Patienten.

Die Migration von Tumorzellen wird dabei durch verschiedene Prozesse, die Integrine, Matrix degradierende Enzyme, Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle und Zell-Zell-Kommunikation beinhalten, gesteuert. Die daraus erfolgende Veränderung der Zellgestalt und -verformbarkeit wird durch Umgestaltung des Aktinzytoskeletts hervorgerufen (Friedl und Wolf, 2003).

Der eigentliche Prozess der Zellmigration wird dabei in einen kontinuierlichen Zyklus aus fünf voneinander unabhängigen Schritten eingeteilt werden: (i) Zellpolarisation, (ii) Bildung von Zellausstülpungen und -ausläufern (Filo- und Lamellipodien), (iii) Ausbildung von neuen Adhäsionspunkten, (iv) Kontraktion des Zellkörpers und (v) Ablösen des hinteren Endes des Zellkörpers (Friedl und Wolf, 2003; Lauffenburger und Horwitz, 1996). Abb. 2.4 zeigt diesen Vorgang im Detail.

Die Geschwindigkeit, mit der sich eine Zelle fortbewegt, hängt dabei von der Umsatzrate der einzelnen Adhäsions- und Deadhäsionsvorgänge ab. Die Stabilisierung von fokalen Kontakten verstärkt dabei das Haften am Substrat und verringert das Ablösen, wodurch die Migrationsraten gemindert werden. Umgekehrt sorgt eine schwache Haftung für eine höhere Rate (Lauffenburger und Horwitz, 1996).

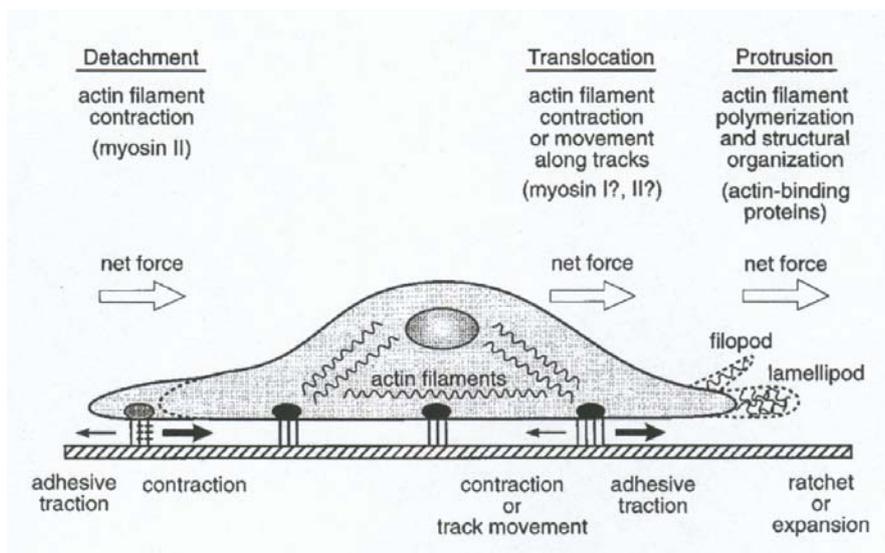


Abb. 2.4: Darstellung des Migrationsprozesses einer Zelle.

Durch lokale Aktinpolymerisierung, der daraus resultierenden Bildung von fokalen Kontakten wie Filo- und Lamellipodien, die sich an das Substrat (extrazelluläre Matrix) anheften, der Kontraktion von Aktinfilamenten sowie steten Adhäsionsprozessen am vorderen Ende der Zelle („leading edge“, rechts) und dem Kontaktverlust zur Matrix am hinteren Ende der Zelle („trailing edge“, links) gelingt es der Zelle auf einem Substrat entlangzugleiten (Abbildung aus Lauffenburger und Horwitz, 1996).

Bisher wurden verschiedene Signalweiterleitungsmoleküle identifiziert, die bei der Regulierung der einzelnen Migrationsschritte eine Rolle spielen. Dabei scheinen der Tumorsuppressor PTEN und die PI3-Kinase in den Prozess der Polarisierung involviert zu sein. In Chemotaxisuntersuchungen konnte für die PI3-Kinase und ihr Produkt PIP3 eine Lokalisation am vorderen Ende („leading edge“) von migrierenden Zellen festgestellt werden, wobei sich PTEN ausschließlich an den Seiten und am hinteren Ende des Zellkörpers befand. In ruhenden Zellen hingegen verteilte sich die PI3-Kinase gleichmäßig im Zytoplasma und PTEN über den gesamten Zellrand (Iijima *et al.*, 2002; Funamoto *et al.*, 2002). Chemokine und Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) werden hingegen benötigt um Zellausläufer zu bilden, die eine Voraussetzung für den Beginn und das Fortdauern der Migration sind (Friedl und Wolf, 2003). Die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix wird wiederum durch verschiedene Rezeptorfamilien vermittelt, wobei Rho GTPasen die Signale von der Oberfläche an nachgeschaltete Effektoren (z.B. Arp2/3 Komplex) übermitteln (Ridley, 2001). Für ERKs (*extracellular regulated kinases*) konnte über die Aktivierung von dem nachgeschalteten Calpain eine Beteiligung am Deadhäsionsprozeß nachgewiesen werden (Huang *et al.*, 2004) und für Rab5 eine PI3-Kinase- und Rho GTPasen-unabhängige Reorganisation des Zytoskeletts, die zur Ausbildung von Lamellipodien führt (Spaargaren und Bos, 1999).

Die Art des Versuchsaufbaus von Migrationsuntersuchungen hat dabei entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse und die sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen (Friedl und Wolf, 2003). Erfolgt die Migration im zweidimensionalen Raum ist sie von Adhäsions- und Deadhäsions-Prozessen abhängig. Eine Blockade von Proteinen, die die Adhäsion aufrechterhalten, führt zu einem Verlust des Zell-Substrat-Kontakts und schließlich zur kompletten Ablösung der Zelle. Sind die Zellen hingegen im dreidimensionalen Raum in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, treten sie in direkten Kontakt mit den sie umgebenden Strukturen. Fortbewegungsprozesse werden hier von morphodynamischen Mechanismen gesteuert und beinhalten auch die Invasion von natürlichen Gewebebarrieren (z.B. Basalmembran) (vgl. auch Abb. 2.5).

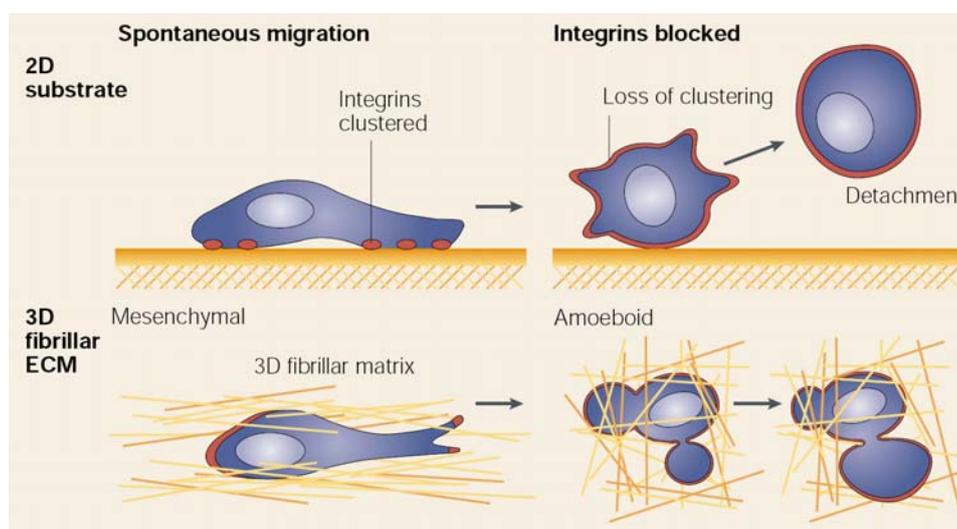


Abb. 2.5: Einfluss der Methodik von Migrationsuntersuchungen.

Die Art des Versuchsaufbaus von Migrationsuntersuchungen hat entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse und die sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen. Im zweidimensionalen Raum führt die Blockade von Proteinen, die die Adhäsion aufrechterhalten, zum Verlust des Zell-Substrat-Kontakts und schließlich zur kompletten Ablösung der Zelle. Die Migration im zweidimensionalen Raum ist folglich von der Adhäsion abhängig. Im dreidimensionalen Raum sind die Zellen hingegen in eine extrazelluläre Matrix eingebettet und treten in direkten Kontakt mit den sie umgebenden Strukturen. Die Migration wird demnach auch von morphodynamischen Mechanismen gesteuert (Abbildung aus Friedl und Wolf, 2003).

Im Rahmen von Migrationsuntersuchungen wurde in dieser Arbeit im zweidimensionalen Raum der so genannte Wundheilungsversuch verwendet, sowie Lebendzellbeobachtungen mit anschließender quantitativer Bestimmung des Anteils motiler Zellen durchgeführt. Migrations- und Invasionsversuche im dreidimensionalen Raum fanden unter Verwendung eines Zellsystems mit zwei durch eine poröse Membran getrennten Kammern („modifizierte Boydenkammer“) statt (Albini *et al.*, 1987). Durch Beschichtung der Membran mit einer rekonstituierten ext-

razellulären Matrix aus Extrakten von Engelbreth-Holm-Swarm-Tumoren („Matrigel“) wurde so eine natürliche Barriere geschaffen, die die Zellen zu durchbrechen hatten.

2.5 Ziel der Arbeit

Das größte klinische Problem glialer Hirntumoren ist nach wie vor ihr ausgeprägtes infiltratives Wachstum in das umgebende gesunde Gehirngewebe hinein, sowie die sich daraus ergebende nahezu vollkommene Therapieresistenz gegenüber den klassischen Behandlungsmethoden (d.h. operative Tumorentfernung, Strahlen- und Chemotherapie) (Maher *et al.*, 2001). Auf molekularer Ebene konnten als häufigste genetische Veränderungen bei diesen Tumoren Überexpression und Amplifikationen des Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptors sowie Mutationen im Gen des Tumorsuppressors PTEN nachgewiesen werden (Ohgaki *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2001; Kleihues und Ohgaki, 1999). Beide Veränderungen führen zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3 (Phosphatidylinositol-3’)-Kinase/Akt-Signalwegs, welcher der wesentliche anti-apoptotische Signalweg der Zelle zu sein scheint, aber auch eine wichtige Rolle im Motilitätsverhalten der Zelle einnimmt (Altomare und Testa, 2005; Funamoto *et al.*, 2002). Die ebenso vom EGF-Rezeptor aktivierten MAP (Mitogen aktivierte Protein)-Kinasen vermitteln eher mitogene Signale, sind aber durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen auch in den Prozess der Motilität involviert (Kolch 2005; Sebolt-Leopold und Herrera, 2004).

Ziel dieser Arbeit war es die Bedeutung der Signalwege für das infiltrative und proliferative Verhalten von humanen glialen Tumorzelllinien zu untersuchen und dadurch einen weiteren Einblick in die aggressive Tumorbilogie von humanen Glioblastomen zu erhalten. Die Beeinflussung der Signalwege mittels spezifischer Inhibitoren und Aktivatoren sollte zum Verständnis ihrer Funktionsweise beitragen und therapeutisch interessante Zielmoleküle identifizieren.

Im Rahmen dessen sollte zunächst in biochemischen Studien der Aktivierungsstatus der Signalwege ohne und unter Blockade bzw. Aktivierung in sechs etablierten humanen Gliomzelllinien bestimmt werden und so eine mögliche veränderte Signalweiterleitung identifiziert werden.

In funktionellen Studien sollten dann die Auswirkungen einer solchen Blockade bzw. Aktivierung und veränderten Signalweiterleitung auf das Proliferations-, Adhäsions-, Migrations- und Invasionsverhalten der Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurde das Migrationsverhalten auf zweidimensionaler Ebene mittels Wundheilungsversuchen sowie Lebendzellbeobachtungen mit anschließender quantitativer Bestimmung der Migrationsrate analysiert. Das Migrations- und Invasionsverhalten im dreidimensionalen Raum wurde im so genannten modifizierten Boydenkammerversuch ermittelt, wobei für die Auswertung eine neuartige Methodik etabliert wurde, die

nach aufwendiger konfokaler Bilderfassung und semiautomatischer quantitativer Bildanalyse eine genaue Quantifizierung der Invasionsrate ermöglichte.

Parallel zu diesen Untersuchungen in etablierten Zelllinien sollte in Operationspräparaten von humanen glialen Tumoren sowie in Primärkulturen aus humanen glialen Tumoren in biochemischen Studien der Aktivierungsstatus des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs und des MAP-Kinase-Signalwegs untersucht werden.

3 Material

3.1 Gliomzelllinien und gliale Tumoren (Astrozytome)

3.1.1 Etablierte humane Gliomzelllinien

Folgende etablierte humane Gliomzelllinien wurden verwendet:

Zelllinie	Beschreibung	Referenz	Kulturmedium
G109	humane Gliomzelllinie (adhärent)	Kraus <i>et al.</i> , 1999	RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin
G139	humane Gliomzelllinie (adhärent)	Kraus <i>et al.</i> , 1999	RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin
G147	humane Gliomzelllinie (adhärent)	Kraus <i>et al.</i> , 1999	RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin
LN18	humane Gliomzelllinie (adhärent)	Ishii <i>et al.</i> , 1999	DMEM, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin
LN229	humane Gliomzelllinie (adhärent)	Ishii <i>et al.</i> , 1999	DMEM, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin
LNZ308	humane Gliomzelllinie (adhärent)	Ishii <i>et al.</i> , 1999	DMEM, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin

Die mit *small interfering RNA* (siRNA) (siPTEN1 und siPTEN2) transient transifizierte Zelllinie LN229 wurde von Guido Piontek (AG Prof. J. Schlegel) zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Frischgewebe von humanen Astrozytomen

Aus folgenden Operationsmaterialen von humanen Astrozytomen wurde Frischgewebe verwendet:

Astrozytom	Diagnose
TUM G2	Glioblastoma multiforme, WHO-Grad IV
TUM G4	Glioblastoma multiforme, WHO-Grad IV
TUM G5	Glioblastoma multiforme, WHO-Grad IV
TUM G6	Glioblastoma multiforme, WHO-Grad IV
TUM G8	Glioblastoma multiforme, WHO-Grad IV
TUM G10	Glioblastoma multiforme, WHO-Grad IV
TUM G11	Anaplastisches Astrozytom, WHO-Grad III

Die Diagnose erfolgte durch den Neuropathologen der TU München (Prof. J. Schlegel).

3.1.3 Primärkulturen von humanen Astrozytomen

Folgende Primärkulturen aus den unter 3.1.2 genannten humanen Astrozytomen wurden verwendet:

Primärkultur	Beschreibung	Herkunft	Kulturmedium
TUM G2	Primärzellen aus humanen Astrozytomen (adhärent)	vgl. 3.1.2	RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin
TUM G4	Primärzellen aus humanen Astrozytomen (adhärent)	vgl. 3.1.2	RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin
TUM G6	Primärzellen aus humanen Astrozytomen (adhärent)	vgl. 3.1.2	RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin

3.2 Puffer und Lösungen

3.2.1 Allgemeine Lösungen

PBS (10x)	1,4M NaCl; 0,1M Na ₂ HPO ₄ ; 26,8mM KCl; 17,6mM KH ₂ PO ₄ in H ₂ O dest., pH 7,4
4% Formaldehyd/PBS	1:9,25-Verdünnung einer 37%igen Formaldehydlösung in 1x PBS
Collagen I-Stammlösung	1mg/ml in 0,1M Essigsäure

3.2.2 Lösungen für die Zellquantifizierung mittels Kristallviolett-Färbung

TritonX-100	0,1% (v/v) TritonX-100 in 1x PBS
Kristallviolett-Lösung	0,04% (w/v) Kristallviolett in 4% (v/v) Ethanol verdünnt in 1x PBS
SDS	1% (w/v) SDS in 1x PBS

3.2.3 Lösungen für die Proteinisolierung und die Proteinquantifizierung

PMSF (Phenylmethan-Sulfonylfluorid)	100mM in Aceton
TritonX-100	0,01% (v/v) in 1x PBS
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)-Lösung	1,4mg/ml in 0,01% TritonX-100

3.2.4 Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und den Western Blot

Probenpuffer (5x)	312,5mM Tris-Cl pH 6,8; 10% (w/v) SDS; 50% (v/v) Glycerin; 250mM DTT; 0,05% (v/v) Bromphenolblau in H ₂ O dest.
Trenngelpuffer (7,5%)	2,54ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung; 3,74ml 1M Tris-Cl pH 8,8; 3,66ml H ₂ O dest.; 50µl 20% (w/v) SDS; 50µl 10% (w/v) APS; 20µl TEMED
Trenngelpuffer (10%)	3,34ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung; 3,74ml 1M Tris-Cl pH 8,8; 2,86ml H ₂ O dest.; 25µl 20% (w/v) SDS; 25µl 10% (w/v) APS; 20µl TEMED
Sammelgelpuffer (5%)	836µl 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung; 626µl 1M Tris-Cl pH 6,8; 3,5ml H ₂ O dest.; 25µl 20% (w/v) SDS; 25µl 10% (w/v) APS; 10µl TEMED
SDS-Laufpuffer (10x)	0,25M Tris; 1,92M Glyzin; 1% (w/v) SDS in H ₂ O dest.
Anodenlösung I	0,3M Tris; 20% (v/v) Methanol abs. in H ₂ O dest.
Anodenlösung II	25mM Tris; 20% (v/v) Methanol abs. in H ₂ O dest.
Kathodenlösung	25mM Tris; 20% (v/v) Methanol abs.; 40mM 6-Aminocaprinsäure in H ₂ O dest.
Transferpuffer für den Wet Blot	25mM Tris; 192mM Glyzin; 15% (v/v) Methanol abs. in H ₂ O dest.; pH 8,3-8,4
TBS (10x)	200mM Tris; 1,5M NaCl in H ₂ O dest.; pH 7,6
Waschpuffer (1x TBST)	0,1% (v/v) Tween-20 in 1x TBS
Magermilchpuffer	5% (w/v) Magermilchpulver in 1x TBST
Ponceau S-Lösung (10x)	2% (w/v) Ponceau S; 30% (v/v) Trichloressigsäure; 30% (v/v) Sulfosalicylsäure in H ₂ O dest.

3.2.5 Lösungen für Fluoreszenzfärbungen

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)	0,15µg/ml in H ₂ O dest.
TO-PRO [®] -3	1µM in 0,2x PBS
NH ₄ Cl-Lösung	50mM in H ₂ O dest.
TritonX-100	0,25% (v/v) in 1x PBS
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	1% (w/v) in 1x PBS
TRITC-Phalloidin	0,125µg/ml in PBS
Hoechst 33342	1,5µg/ml in 1x PBS

3.3 Antikörper

3.3.1 Primäre Antikörper für indirekte Immundetektion im Western Blot (WB) und in der Immunfluoreszenz (IF)

Antikörper	Isotyp	Verwendung	Bezugsquelle
Akt	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)
phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)
EGFR	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
phospho-EGFR (Tyr1086)	Kaninchen, polyklonal	IF 1:150 WB 1:1000	Zymed® Laboratories Inc., San Francisco, CA/USA (über Zytomed GmbH, Berlin)
phospho-p70S6-Kinase(Thr389)	Kaninchen, polyklonal	WB 1:500	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA/ USA (über NEB, Frankfurt am Main)
phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)
PTEN	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)
Rab5	Maus IgG2a	IF 1:50 WB 1:1000	Pharmingen (Becton Dickinson GmbH), Heidelberg
α-Tubulin	Maus, polyklonal	WB 1:10000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.3.2 Sekundäre Antikörper für Western Blot (WB)-Analysen und für die Immunfluoreszenz (IF)

Antikörper	Spezies	Verwendung	Bezugsquelle
Kaninchen IgG (H+L), HRP-konjugiert	Ziege	WB 1:2000	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)
Kaninchen IgG (H+L), FITC-konjugiert	Ziege	IF 1:100	Zymed® Laboratories Inc., San Francisco, CA/USA (über Zytomed GmbH, Berlin)
Maus IgG (H+L), HRP-konjugiert	Ziege	WB 1:2000	Cell Signaling Technology™, Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)
Maus IgG (H+L), Cy™3-konjugiert	Ziege	IF 1:100	Zymed® Laboratories Inc., San Francisco, CA/USA (über Zytomed GmbH, Berlin)

3.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Amphotericin B („Fungizone [®] “, 250µg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect GmbH, Pfullingen
Bradford Reagenz („Protein Assay“)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA („Protein Assay Standard II“)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CASY [®] ton Verdünnungslösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Collagen I (Rattenschwanz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI	Molecular Probes, Leiden, NL (über Invitrogen, Karlsruhe)
Diff-Quik [®]	Medion Diagnostics GmbH, Düdingen, CH
DMEM-Zellkulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (für die Molekularbiologie)	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ECL Western Blot Detection Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
ECM Basement Membrane (21,5mg/ml) („Matrigel“)	Harbor Bio-Products, Norwood, MA/USA (über tebu-bio GmbH, Offenbach)
EGF (human rekombinant)	Upstate Biotechnology, Waltham, MA/USA (über Biomol GmbH, Hamburg)
FCS	Biochrom AG, Berlin
Glutamin-Lösung (200mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Größenstandard für SDS-Gele	Cell Signaling Technology [™] , Beverly, MA/USA (über NEB, Frankfurt am Main)
Hoechst 33342 „Fluoro Pure“	Molecular Probes, Leiden, NL (über Invitrogen, Karlsruhe)
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LY294002	Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Schwalbach
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000U/ml / 10000µg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
PD98059	Calbiochem (Merck Biosciences GmbH), Schwalbach
PMSF	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rapamycin	Biomol GmbH, Hamburg
RPMI 1640-Zellkulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe
TO-PRO [®] -3 Iodid	Molecular Probes, Leiden, NL (über Invitrogen, Karlsruhe)
TRITC-Phalloidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (1x)-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Tyrphostin AG1478	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
VectaShield [®] Eindeckmedium	Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen
Zellysepuffer (10x)	Cell Signaling Technology [™] , Beverly, MA/ USA (über NEB, Frankfurt am Main)

3.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
6-Loch Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
BIOCOAT Collagen I-Zellkulturschalen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Deckgläschen	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Kleinbilddiafilm (Kodak 5005 EPP)	Kodak GmbH, Stuttgart
Filterpapier (Whatman)	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon™ Transfermembran (PVDF)	Millipore, Eschborn
Objektträger für <i>in situ</i> Zellkultur (Objektträgersystem Lab-Tek™ II)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Pasteurpipetten	Schubert & Weiss, München
Plastikwaren (inkl. sterile Plastikwaren für die Zellkultur)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röntgenfilm X-Omat	Röntgen-Bender, Baden-Baden
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Schaumstoffschwämme für den „Wet Blot“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Transwell® Einsätze für die Zellkultur („modifiziertes Boydenkammer-Zellkultursystem“)	Corning Costar BV, Schiphol-Rijk, NL
Zellkulturschälchen mit Glasbodeneinsatz	MatTek Corporation, Ashland, MA/USA (über Schubert & Weiss, München)

3.6 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
2-Photonen-Laser	Coherent Mira 900	Coherent Inc., Santa Clara, CA/USA
Analysewaage	Sartorius Basic	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Varioklav®EC	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Brutschränke	Heraeus 6000, Cytoperm 2 Heraeus B 5060	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammern	Mini-Protean®-II Cell Mini-Protean®-III Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ELISA Lesegerät	DigiScan, ASYS Hitech	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Hohenlinden
Entwicklermaschine für Röntgenfilme	Kodak RP X-Omat Processor, Model M6B	Kodak AG, Stuttgart
Fluoreszenzmikroskope	Axiovert 135 Axioplan 2	Carl Zeiss, Jena
Fotoapparat	SC35 Type 12	Olympus, Hamburg
Heizblock	Techne Dri-Block DB-2A	Gesellschaft für Laborgeräte mbH, Wertheim
Inkubationssystem für Lebendzellmikroskopie	CTI-Controller 3700 <i>digital</i> Heizeinsatz P Inkubator S	PeCon GmbH, Erbach/Württ.

Gerät	Modell	Hersteller
Konfokales Laserscanning- mikroskop	LSM 510 META angeschlossen an Axio- vert 100M	Carl Zeiss, Jena
Lichtmikroskope	Axiovert 25, Axiovert 135 CK	Carl Zeiss, Jena Olympus, Tokyo
Spannungsgeräte	Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, Mün- chen
Spektralphotometer	DU [®] 530	Beckman Instruments GmbH, Mün- chen
Sterilwerkbanken	Hera safe 12 CEAG	Heraeus, Hanau Mühlenkamp Reinraumtechnik, Billerbeck
Transferapparatur	Trans-Blot [®] SD, Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Mün- chen
Wasserbäder	Typ 1002 Typ 3042	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel Köttermann, Uetze-Hänigsen
Zellzähler	CASY 1 Modell TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifugen	4K15 Megafuge 1.0	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz Heraeus, Hanau

3.7 Computerprogramme zur Datenauswertung und Bildbearbeitung

Microsoft Office Professional Edition 2003 (inklusive Excel und Powerpoint)	Microsoft Corporation, 2003
Zeiss AIM 3.2	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen
Zeiss KS400	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Hallbergmoos
GIMP 2.2.3	Spencer Kimball & Peter Mattis
Adobe [®] Photoshop [®] CS 8.0.1	Adobe, 2003
ImageReady 8.0.1	Adobe, 2003

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten fanden unter Laminaflufffluss mit autoklavierten Lösungen und sterilen Kulturmedien und Kunststoffmaterialien statt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

4.1.2 Gewinnung und Kultivierung von primären Zellen aus humanen Astrozytomen

Die Gewinnung von primären Zellen erfolgte aus Biopsie- und Operationsmaterial von Gliompatienten, deren klinische Diagnose durch den Neuropathologen der TU München bestätigt wurde. Das Tumorgewebe wurde im Kulturmedium mit einem Skalpell in kleine Stückchen zerteilt. Nach 2-3 Tagen, wenn Tumorzellen aus dem Gewebe auf den Boden der Zellkulturschale adhären waren, wurden die Gewebestückchen entfernt und die Kultur mehrmals mit 1x PBS von den Erythrozyten gereinigt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640-Kulturmedium [mit 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 2mM Glutamin] unter Zugabe von 1% Amphotericin B (Invitrogen, Karlsruhe). Nach 5-7 Passagen konnte auf diesen Zusatz verzichtet werden, wenn keine Gefahr mehr einer Verunreinigung durch Pilze bestand. Die so gewonnenen Zellen wurden für eine Proteinisolierung nach Inhibierungs- und Stimulierungsversuchen verwendet oder kryokonserviert.

4.1.3 Kultivierung von adhären Zellen

4.1.3.1 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellsuspensionen wurden 15ml-Röhren mit 3ml erwärmtem Kulturmedium [DMEM bzw. RPMI 1640 mit 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 2mM Glutamin] vorbereitet. Die in Kryoröhren gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei

37°C aufgetaut und in die 15ml-Röhre überführt. Die anschließende Aussaat erfolgte auf 10cm-Zellkulturschalen und ein Mediumwechsel nach dem Adhärenieren der Zellen.

4.1.3.2 Zellpassage

Die adhärenenten Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurden sie mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin-EDTA (1x)-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Nach 5-10min Inkubation im Brutschrank wurde das Ablösen der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und durch Aufnahme in 4ml Kulturmedium sowohl die Protease inaktiviert als auch das zytotoxische EDTA gebunden. Die Suspension wurde 2min bei 1500rpm zentrifugiert, das Zellsediment in frischem Medium aufgenommen und in der benötigten Konzentration auf neue Zellkulturschalen ausgesät.

4.1.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels zweier Methoden: entweder mit Hilfe eines elektronischen Zählgerätes (CASY[®]1, Schärfe System GmbH, Reutlingen) oder einer Neubauer Zählkammer.

Bei Verwendung des Zählgerätes wurden 10ml der CASY[®]ton Verdünnungslösung mit 200µl des resuspendierten Zellsediments bestückt und in die dafür vorgesehene Halterung des Geräts gegeben. Mit Hilfe des zugehörigen Softwareprogramms wurde die Zellkonzentration erfasst.

Wurde die Neubauer Zählkammer verwendet, wurde die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen}/\mu\text{l} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate} \times \text{Kammertiefe} \times \text{Verdünnung}}$$

4.1.3.4 Kryokonservierung der Zellen

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden $5-8 \times 10^5$ Zellen sedimentiert, in 1,5ml Einfriermedium [DMEM- bzw. RPMI 1640-Nährmedium unter Zusatz von 20% (v/v) FCS, 5% (v/v) DMSO, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 2mM Glutamin] aufgenommen und in 2ml-Kryoröhrchen überführt. Nach 20min Inkubation

auf Eis wurden die Zellen zunächst für 1h bei -20°C und dann bei -80°C tiefgefroren, bevor die Überführung in flüssigen Stickstoff erfolgte.

4.2 Zellbiologische Arbeiten

4.2.1 Stimulierungs- und Inhibierungsversuche

Um die Aktivierung der durch den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor vermittelten Signalwege zu untersuchen wurden Stimulierungs- und Inhibierungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die humanen Gliomzellen mit folgenden spezifischen, chemischen Inhibitoren dieser Signalwege inkubiert: $10\mu\text{M}$ Tyrphostin AG1478 (EGF-Rezeptor-Inhibitor; Sigma-Aldrich, Taufkirchen), $50\mu\text{M}$ LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor; Calbiochem, Schwalbach), $50\mu\text{M}$ PD98059 (inhibiert die Phosphorylierung von p44/42 MAPK; Calbiochem, Schwalbach) und 100nM Rapamycin (mTOR-Inhibitor; Biomol GmbH, Hamburg). Rekombinantes, humanes EGF (Upstate Biotechnology, Waltham, MA, USA) wurde eingesetzt um eine Aktivierung des EGF-Rezeptors zu erlangen. Als Kontrolle wurde DMSO (Roth GmbH, Karlsruhe) mitgeführt, welches die Substanz war, in der die Inhibitoren gelöst waren, und im gleichen Volumen wie LY294002 verwendet [DMSO-Volumenäquivalent (DMSO-VÄ)].

Die Stimulierungs- und Inhibierungsversuche wurden in den etablierten Gliomzelllinien LN18, LN229, LN2308, G109, G139 und G147 (Ishii *et al.*, 1999; Kraus *et al.*, 1999), sowie in primären Gliomzellen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Operationspräparaten von humanen Astrozytomen (vgl. 3.1.3) gewonnen wurden, durchgeführt.

4.2.1.1 Aktivierungsstatus der Signalwege in den etablierten Gliomzelllinien

Die Grundaktivierung der Signalwege in den etablierten Gliomzelllinien wurde mittels anschließenden Western Blot-Analysen charakterisiert. Dazu wurden zunächst 8×10^5 Zellen auf 10cm-Kulturschalen ausgesät und nach 24h fand ein Mediumwechsel unter Serumentzug statt. 16h später wurden die Zellen mit den Inhibitoren in den unter 4.2.1 genannten Konzentrationen behandelt. Tyrphostin AG1478, LY294002 und PD98059 wurden für je 30min im Brutschrank inkubiert, Rapamycin und die Kontrolle für 1h. Im Anschluss daran erfolgte eine 15minütige Inkubation mit und ohne 10ng/ml EGF und eine Proteinisolierung (vgl. 4.3.1).

4.2.1.2 Ermittlung des EGF-Rezeptor-Status in den etablierten Gliomzelllinien

4.2.1.2.1 Bestimmung des EGF-Rezeptor-Status mittels Western Blot-Analysen

Mittels Western Blot-Analysen wurde der EGF-Rezeptor-Status bestimmt, indem zunächst 8×10^5 Zellen auf 10cm-Kulturschalen ausgesät wurden. Nach 24h fand ein Mediumwechsel unter Serumentzug statt und 16h später wurden die Zelllinien für 5min mit und ohne 100ng/ml EGF inkubiert. Anschließend wurde eine Proteinisolierung durchgeführt (vgl. 4.3.1).

4.2.1.2.2 Bestimmung des Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors mittels Immunfluoreszenz

Die Kinetik der Aktivierung und der Internalisierung des EGF-Rezeptors wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Hierfür wurden zunächst je $1,5 \times 10^4$ Zellen in 0,5ml Kulturmedium in die Kammern des Objektträgersystems Lab-Tek™ II für die *in situ* Zellkultur (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. 24h später erfolgte ein Mediumwechsel unter Serumentzug und 16h später wurden die Zellen für 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 und 60min mit 100ng/ml EGF im Brutschrank inkubiert. Abschließend erfolgte eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung (vgl. 4.3.4).

4.2.1.3 Aktivierungsstatus der Signalwege in primären Zellkulturen aus humanen Astrozytomen

Die Bestimmung der Aktivierung der Signalwege in primären Zellkulturen aus humanen Astrozytomen erfolgte mittels Western Blot-Analysen. Hierzu wurden 8×10^5 Zellen auf 10cm-Kulturschalen ausgesät. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel zum einen unter Serumentzug und zum anderen ohne Serumentzug. Nach 16h wurden die Zellen dann mit EGF und den Inhibitoren wie folgt behandelt: 10ng/ml EGF wurde für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert, $10 \mu\text{M}$ Tyrphostin AG1478, $50 \mu\text{M}$ LY294002 und $50 \mu\text{M}$ PD98059 für je 30min und 100nM Rapamycin und die unbehandelte Kontrolle für je 1h. Im Anschluss daran erfolgte eine Proteinisolierung (vgl. 4.3.1).

4.2.2 Zellwachstumsbestimmung

Um das Zellwachstum unter Einfluss von EGF und den zu untersuchenden Inhibitoren zu ermitteln wurden 2×10^4 Zellen je Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturschale (Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät. 16h später erfolgte die Inkubation mit EGF und den Inhibitoren im Kulturme-

dium [Kontrolle (= DMSO-VÄ), 100ng/ml EGF (+ DMSO-VÄ), 10 μ M Tyrphostin AG1478, 50 μ M LY294002, 50 μ M PD98059 und 100nM Rapamycin]. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und nach 12, 24 und 48h erfolgte ein Mediumwechsel mit den zu untersuchenden Substanzen in den oben genannten Konzentrationen. Nach 72h wurde eine Kristallviolett-färbung zur Zellquantifizierung durchgeführt (vgl. 4.2.4).

4.2.3 Adhäsionsversuch

Die Adhäsionsfähigkeit der sechs Gliomzelllinien an ausgewählte Substrate wurde unter Einfluss von EGF und den zu untersuchenden Inhibitoren bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zunächst für 24h in unbeschichteten Kulturschalen mit den chemischen Substanzen im Kulturmedium vorbehandelt [Kontrolle (= DMSO-VÄ), 100ng/ml EGF (+ DMSO-VÄ), 10 μ M Tyrphostin AG1478, 50 μ M LY294002, 50 μ M PD98059 und 100nM Rapamycin]. Anschließend wurden je Behandlung 2×10^4 Zellen in jeweils drei Vertiefungen einer 24-Loch-Schale ausgesät, die entweder unbeschichtet war (Sarstedt, Nümbrecht) oder eine Collagen I-Beschichtung („Biocoat“ von Becton Dickinson, Heidelberg) hatte. Nach 1h Inkubation im Brutschrank wurde eine Kristallviolett-färbung durchgeführt um die Anzahl der adhärenierten Zellen zu ermitteln (vgl. 4.2.4).

Die Beschichtung der Kulturschalen mit ECM erwies sich hierbei als nicht auswertbar, da sich der Farbstoff Kristallviolett auch an das ECM-Substrat lagert und so eine spezifische Messung der adhärenierten Zellen nicht mehr möglich ist (Daten nicht gezeigt).

4.2.4 Kristallviolett-färbung zur Zellquantifizierung

Die Kristallviolett-färbung beruhte auf der Bindung des Vitalfarbstoffes Kristallviolett an das raue endoplasmatische Reticulum und wurde modifiziert nach Versteeg *et al.* (2000) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach Zelladhäsions- und Zellwachstumsexperimenten in 24-Loch-Schalen zweimal mit 1x PBS gewaschen und 30min mit 4% Formaldehyd/PBS bei RT fixiert. Anschließend wurden sie 5min luftgetrocknet, zweimal mit 0,1% TritonX-100/PBS und zweimal mit H₂O dest. gewaschen. 500 μ l Kristallviolettlösung wurden 30min bei RT mit den Zellen inkubiert und diese dreimal mit H₂O dest. gewaschen. Die so gefärbten Zellen wurden mit 500 μ l 1% SDS/PBS unter Schütteln bei RT für 1h lysiert. Nach Überführung der Lysate in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 590nm in einem ELISA Lesegerät (DigiScan, Mikrotek Laborsysteme, Hohenlinden) gemessen.

Um eine Verfälschung der Messwerte durch eine unspezifische Anlagerung des Farbstoffs Kristallviolett an die Wände der Zellkulturschalen auszuschließen, wurden parallel bei jedem Versuch sämtliche Behandlungsschritte der Kristallviolettfärbung ebenfalls in leeren Reaktionsgefäßen der 24-Loch-Schalen durchgeführt. Die Messwerte aus den Versuchsreihen mit Zellen wurden dann gegen diese Leerwerte normalisiert.

4.2.5 Wundheilungsversuch

Um die Migration von Zellen ohne oder unter Einfluss von EGF und Inhibitoren zu bestimmen wurde der Wundheilungsversuch durchgeführt. Hierbei wurde die Fähigkeit der sechs humanen Gliomzelllinien ermittelt einen künstlich zugefügten Spalt im Zellrasen teilweise oder ganz zu schließen.

4.2.5.1 Etablierung des Wundheilungsversuchs

In Etablierungsversuchen zum Wundheilungsversuch wurden verschiedene Pipettenspitzen auf ihre Eignung getestet dem konfluenten Zellrasen eine Lücke („Wunde“) zuzufügen. Es zeigte sich, dass die Verwendung der 1000µl-Pipettenspitze (Sarstedt, Nümbrecht) am besten geeignet war. Kleinere Spitzen verursachten einen zu kleinen Spalt mit zu geringem Abstand zwischen den beiden Zellrasengrenzen, 5ml- und 10ml-Einmalpipetten einen zu großen. Außerdem verursachten die 5ml- und 10ml-Pipetten unerwünschte Kratzer an den Kulturschalen, die die Ergebnisse verfälschten. Eine Beschichtung der Zellkulturschalen mit Collagen I und ECM [*Extracellular Matrix Basement Membrane* („Matrigel“)], wie sie bei der Lebendzellbeobachtung vorgenommen wurde, erwies sich hier ebenso als nicht durchführbar, da sie durch das Abschaben der Zellen gleichfalls beschädigt wurde und so keine intakte Oberfläche für die Migrationsuntersuchungen bot (Daten nicht gezeigt).

4.2.5.2 Durchführung des Wundheilungsversuchs

Für den Wundheilungsversuch wurden jeweils 8×10^5 Zellen auf 10cm-Kulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht) gesät. 16h später wurde der zu 80% konfluente Zellrasen durch Wegschaben der Zellen mittels einer 1000µl-Pipettenspitze (Sarstedt, Nümbrecht) unterbrochen, indem eine Linie über den Zellrasen gezogen wurde und so ein zellfreier Spalt entstand. Die Schalen wurden anschließend mehrfach mit 1x PBS gewaschen, damit sich keine abgelösten Zellen in den

freien Spalt absetzen konnten, und mit den zu untersuchenden Substanzen im Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert [Kontrolle (= DMSO-VÄ), 100ng/ml EGF (+ DMSO-VÄ), 10µM Tyrphostin AG1478, 50µM LY294002, 50µM PD98059 und 100nM Rapamycin]. Motile Zellen konnten so in den Spalt wandern, nicht motile Zellen blieben an ihrem ursprünglichen Ort. Nach 12, 24 und 48h erfolgte die Überprüfung und fotografische Dokumentation des Zellspalts sowie ein Mediumwechsel. Nach 55h wurden die Zellen in der Kulturschale mit Diff-Quik[®] fixiert und gefärbt.

4.2.5.3 Färben mit Diff-Quik[®]

Die Fixierung und Färbung der Zellen wurde mit dem käuflich erwerbbaaren Färbeset Diff-Quik[®] (Medion Diagnostics GmbH, Düringen, CH) durchgeführt. Dieser Färbetest ist eine Schnellfärbemethode, deren Ergebnisse mit denen der Pappenheim-Methode (Giemsa-May-Grünwald) vergleichbar sind (siehe Herstellerangaben). Die eosinophile (rote) Färbung weist dabei die Zellkerne, die basophile (blaue) Färbung das Zytoplasma nach.

Die Zellen wurden nach Ende der Inkubation mit 1x PBS gewaschen und dann jeweils 2min mit der Fixierungslösung, Färbelösung I und Färbelösung II behandelt. Abschließend wurden die Präparate mit H₂O dest. entfärbt und luftgetrocknet.

4.2.5.4 Auswertung der Migrationsrate im Wundheilungsversuch

Die Auswertung erfolgte mittels eines 20x Objektivs eines Lichtmikroskops (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena) an fixierten und gefärbten Präparaten. Der Prozentsatz an motilen Zellen wurde bestimmt, indem die Anzahl der motilen Zellen durch die Anzahl nicht motiler Zellen dividiert und dieser Quotient mit 100 multipliziert wurde. Es wurden jeweils zehn Gesichtsfelder ausgezählt.

4.2.6 Motilitätsversuch mittels Lebendzellbeobachtung in der Echtzeitmikroskopie

Es zeigte sich, dass die Migrationsbestimmung nach Wundheilungsversuchen in ihrer Interpretation eingeschränkt war, so dass die Motilität von Zellen mittels Lebendzellbeobachtung in der Echtzeitmikroskopie untersucht wurde. Die Zellen wurden hierzu mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 100M (Carl Zeiss, Jena) untersucht, an das ein Inkubationssystem (PeCon GmbH, Er-

bach/Württ.) angeschlossen war, welches den pH-Wert (5% CO₂) und, aufgrund eines beheizbaren Mikroskoptischs, die Temperatur (37°C) regelte.

4.2.6.1 Beschichtung der ZK-Schalen mit ECM und Collagen I

Um die Motilität von Zellen auf verschiedenen Substraten zu untersuchen wurden die Glasbodeneinsätze der Kulturschälchen (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) mit einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (ECM, „Matrigel“; tebu-bio, Offenbach) oder Collagen I (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) beschichtet.

Die Beschichtung mit ECM erfolgte mit einer 1:20-Verdünnung der Stammlösung nach Angaben des Herstellers. Der Glasbodeneinsatz wurde hierbei mit 20µl der verdünnten ECM-Lösung bedeckt und unter sterilen Bedingungen im Laminarluftfluss für 2h getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Die Collagen I-Lösung wurde in einer Konzentration von 100µg/ml eingesetzt. Pro Schälchen wurden 100µl Collagen I-Lösung verwendet und für 4h bei 37°C inkubiert. Danach folgten ein Waschschrift mit 1x PBS und die Aufbewahrung bei 4°C.

4.2.6.2 Durchführung des Motilitätsversuchs mittels Lebendzellbeobachtung

Für die Motilitätsuntersuchungen mittels Lebendzellbeobachtung in der Echtzeitmikroskopie wurden die Zellen ÜN in einer Inkubationskammer (PeCon GmbH, Erbach/Württ.), die an ein konfokales Laserscanningmikroskop (LSM) (Axiovert 100M, LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena) angeschlossen war, bei 37°C, 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Aussaat von $1,2 \times 10^5$ Zellen erfolgte im Kulturmedium auf 3,5cm Kulturschalen mit Glasbodeneinsatz der Firma MatTek (Ashland, MA, USA), die entweder unbeschichtet oder mit poly D-Lysin-Beschichtung erworben wurden. Unbeschichtete Schälchen wurden zu Etablierungszwecken mit ECM und Collagen I, im Motilitätsversuch mit Collagen I (vgl. 4.2.6.1) überdeckt.

2-3h nach Zellaussaat wurde unter Steuerung der LSM-Software (AIM; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen) mit der automatischen Aufnahme von 160 Phasenkontrastbildern im Abstand von je 3min begonnen, die so einen Zeitrafferfilm über den Zeitraum von 8h ergaben. Die Mikroskopie erfolgte im Durchlicht mit einem 20x/0.4 PH2-Objektiv und einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 543nm.

Sollte der Einfluss von EGF und signalwegsspezifischen Inhibitoren untersucht werden, so wurden diese Substanzen 1h vor Filmstart zugegeben. EGF wurde dabei in einer Konzentration von 100ng/ml, LY294002 mit 50µM und Rapamycin mit 100nM eingesetzt.

4.2.7 Migrations- und Invasionsversuche im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)

Das Migrations- und Invasionsverhalten der sechs humanen Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum wurde in einem modifizierten Boydenkammer-Zellkultursystem untersucht (Albini *et al.*, 1997). Dazu wurden sterile Filtermembraneinsätze verwendet, die in Kulturschalen gehängt wurden („modifizierte Boydenkammer“, „Transwell“; vgl. Abb. 4.2). So konnten auf die Oberfläche des Filters Zellen ausgebracht werden, welche dann durch die Poren in der Membran auf die Unterseite des Filters wandern konnten. Die Migrationsfähigkeit der Gliomzelllinien wurde dabei auf unbeschichteten Filtern ermittelt und ihre Invasionsfähigkeit auf Filtern, die mit einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (ECM, „Matrigel“) beschichtet waren.

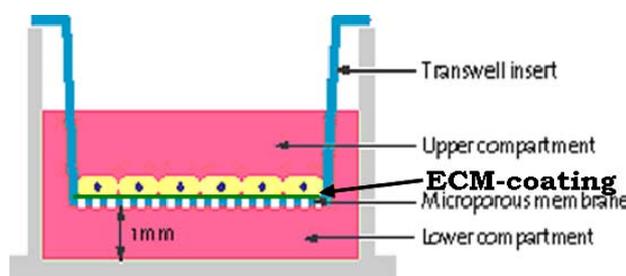


Abb. 4.2: Modifiziertes Boydenkammer-Zellkultursystem für Migrations- und Invasionsversuche.

Im modifizierten Boydenkammerversuch werden Migrations- und Invasionsuntersuchungen durchgeführt. Zellen werden auf eine poröse Filtermembran ausgesät und können diese durchwandern. Nach Beschichtung der Filter mit einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (ECM, „Matrigel“) kann die Invasionsfähigkeit bestimmt werden (Abbildung modifiziert nach <http://www.corning.com/lifesciences/>).

4.2.7.1 Vorversuche zur Etablierung des modifizierten Boydenkammerversuchs

In Etablierungsexperimenten zum modifizierten Boydenkammerversuch wurden verschiedene Filtermembraneinsätze unterschiedlicher Hersteller getestet. Es zeigte sich, dass die „Transwell®-Einsätze für die Zellkultur“ der Firma Corning Costar BV (Schiphol-Rijk, NL) am besten geeignet waren, da die Filter mittels einer Plastikumrandung fest auf der Vertiefung z.B. einer 24-Loch-Zellkulturschale auflagen und somit der Einsatz nicht verrutschen konnte. Die Membranen waren zudem so starr in die Plastikkonstruktion eingearbeitet, dass sie nicht nach unten durchgingen. So konnten sich die Zellen nach der Aussaat gleichmäßig auf der gesamten Filterfläche absetzen und nicht nur bevorzugt in der Mitte (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres Kriterium war die Auswahl der Porengröße der Filter. Der limitierende Faktor, dass eine Zelle durch eine Pore infiltriert, ist die Verformbarkeit ihres Zellkerns. Die Poren sollten also nicht zu klein sein, so dass eine Invasion schon aus rein physikalischen Gründen ver-

hindert würde, aber auch nicht zu groß, so dass die Zelle in ihrem gesamten Umfang nicht „durchrutscht“. Aufgrund der Größe ihrer Zellkerne wurden schließlich für die Zelllinien G109, G139 und LN229 Filter mit einer Porengröße von 8µm, für die Linien G147, LN18 und LN308 eine Porengröße von 5µm verwendet, so dass die zu durchwandernde Pore in etwa 80% der Zellkerngröße entsprach.

4.2.7.2 Durchführung des modifizierten Boydenkammerversuchs

Um Migration und Invasion in der modifizierten Boydenkammer unterscheiden zu können, wurden die Filtermembranen vor Zellaussaat mit einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (ECM, „Matrigel“; tebu-bio, Offenbach) beschichtet. ECM wurde von EHS (Engelbreth-Holm-Swarm)-Tumoren extrahiert und beinhaltet alle Bestandteile des Bindegewebes. Dazu wurden die bei -80°C gelagerte ECM-Lösung, die Transwell®-Filter (Corning Costar, Schiphol-Rijk, NL) und Pipettenspitzen vor Versuchsbeginn ÜN bei 4°C aufbewahrt. Die Beschichtung erfolgte dann mit 7µl unverdünnter ECM-Lösung je Filter einer 24-Loch-Zellkulturschale. Nach 1h Inkubation im Brutschrank konnten schließlich die Zellen, die zuvor wie unter 4.2.1.3 beschrieben behandelt worden waren, ausgesät werden. Dabei wurden bei jeder Zelllinie 850 Zellen/mm² Wachstumsoberfläche eingesetzt, mit Ausnahme von G109, bei der aufgrund des größeren Zellumfangs 425 Zellen/mm² verwendet wurden. Die Aussaat erfolgte im oberen Reaktionsgefäß der 24-Loch-Zellkulturschale in 100µl Kulturmedium mit der jeweiligen, zu behandelnden Substanz [Kontrolle (= DMSO-VÄ), 100ng/ml EGF (+ DMSO-VÄ), 10µM Tyrphostin AG1478, 50µM LY294002, 50µM PD98059 und 100nM Rapamycin]. In den unteren Reaktionstopf wurden 600µl Kulturmedium mit der entsprechenden, zu untersuchenden Substanz gegeben (vgl. oben). Pro Versuchsansatz wurden dabei je ein unbeschichteter und je drei mit ECM beschichtete Filter angesetzt. Die unbeschichteten Membranen dienten dazu die migratorische von der infiltrierenden Kapazität der Zellen abzugrenzen. Des Weiteren wurden sie als Kontrolle für die erfolgreiche ECM-Beschichtung der Filter, die für Invasionsversuche eingesetzt wurden, verwendet. Die anschließende Kultivierung erfolgte für 24h im Brutschrank.

4.2.7.3 Färben der Zellen im modifizierten Boydenkammerversuch für die Fluoreszenzmikroskopie

Nach Inkubation der Gliomzellen in der modifizierten Boydenkammer wurden sie für die Fluoreszenzmikroskopie mit 1x PBS gewaschen und 30min mit 4% Formaldehyd/PBS bei RT fixiert. Hierfür wurden die Filter im Plastikeinsatz der Boydenkammer belassen und lichtgeschützt

10min in den Vertiefungen einer 24-Loch-Zellkulturschale mit dem Cyanfarbstoff TO-PRO[®]-3 (Molecular Probes, Leiden, NL) gefärbt, der spezifisch an die DNA bindet und im unsichtbaren Infrarotbereich emittiert. Nach Waschen mit H₂O dest. erfolgten für 1min die Gegenfärbung mit DAPI (Molecular Probes, Leiden, NL) und ein zweiter Waschschriff. Die Membranen wurden dann im feuchten Zustand mit einem Skalpell aus ihrem Plastikeinsatz geschnitten. Sie wurden mit der Unterseite zum Objektiv des Mikroskops auf 6-Loch Objektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde) gelegt und mit VectaShield[®] Eindeckmedium (Linaris, Wertheim-Bettingen) versehen. Aufgrund der Instabilität von TO-PRO[®]-3 erfolgte die Mikroskopie der Präparate innerhalb einer Woche sowie eine Aufbewahrung bei -20°C.

4.2.7.4 Auswertung der Migrations- und Invasionsversuche in der modifizierten Boydenkammer

4.2.7.4.1 Konfokale Laserscanningmikroskopie zur Erfassung der Zellen

Die Mikroskopie der Filtermembranen aus dem modifizierten Boydenkammerversuch erfolgte mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie (LSM510 META, Carl Zeiss, Jena) mit einem C-Apo 63x1.2 Wasserobjektiv und einem durch LSM-Software (AIM; Zeiss Microimaging, Göttingen) eingestelltem Zoomfaktor von 0,7.

Zur getrennten Darstellung der Zellen an der Oberseite und an der Unterseite des Filters wurde hierbei die optische Schnittbildtechnik des LSM510 eingesetzt. Die Fluoreszenz des DNA-Farbstoffes TO-PRO-3[®] wurde mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 633nm angeregt und mit einem Langpassfilter ab 650nm gemessen. Das oben genannte Objektiv ermöglichte mit seiner numerischen Apertur eine Schnittbilddicke von ca. 1µm. Über eine Tiefe von 18-20µm wurden 18 Schnittbilder im Abstand von etwa 1µm erfasst. Durch die Projektion im Maximum-Mode aller Schichten, die Informationen von Zellen über bzw. unter der Membran enthielten, wurde ein Bild erweiterter Tiefenschärfe der Zellschicht über bzw. unter der Membran erzeugt. Der Vorteil dieser Methodik besteht darin, dass hierbei sowohl die Zellen auf der Membranunterseite als auch die Zellen auf der Oberseite von ein- und demselben Filter erfasst werden.

Je Filter wurden zehn Gesichtsfelder untersucht und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet.

4.2.7.4.2 Quantifizierung der migrierten und invasiven Zellen in der modifizierten Boydenkammer

Die Quantifizierung der Migrations- und Invasionsrate in der modifizierten Boydenkammer erfolgte semiautomatisch mit Hilfe eines eigens dafür entworfenen Softwareprogramms (E. Mannweiler, GSF Forschungszentrum, Institut für Pathologie). Dabei konnten die Zellen auf der Filterunterseite und -oberseite getrennt ausgezählt werden, indem die jeweiligen Bilderstapel der einzelnen Membranseiten zu einem Projektionsbild überlagert wurden. Zellen wurden als migratorisch bzw. invasiv definiert, wenn sich ihre Zellkerne mindestens zur Hälfte auf der Unterseite eines mit ECM beschichteten Filters befanden. Die Migrations- und Invasionsrate ergab sich dabei nach folgender Berechnung:

$$\text{Migration bzw. Invasion in \%} = \frac{\text{Zellen auf Filterunterseite}}{\text{Zellen auf Filterunterseite} + \text{Zellen auf Filteroberseite}} \times 100$$

4.2.8 Fluoreszenzfärben von F-Aktin mit TRITC-Phalloidin

Um Aktinfilamente zu visualisieren, wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC, der an das Pilzgift Phalloidin konjugiert war, gefärbt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

4.2.8.1 Durchführung der Färbung

Für die Färbung der Aktinfilamente wurden zunächst je $1,5 \times 10^4$ Zellen in 0,5ml Kulturmedium in unbeschichtete oder mit Collagen I beschichtete Kammern des Objektträgersystems Lab-Tek™ II für die *in situ* Zellkultur (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Nach 16h erfolgte entweder die Fixierung der Zellen oder eine 24stündige Inkubation mit 50µM LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor; Calbiochem, Schwalbach). Die Beschichtung der Objektträger mit Collagen I erfolgte hierbei wie in Kapitel 4.2.6.1 beschrieben.

Die Durchführung der Fluoreszenzfärbung von F-Aktin mit TRITC-Phalloidin fand bei RT statt und die Waschschritte erfolgten mit 1x PBS. Die Zellen wurden dazu nach ihrer Inkubation zweimal gewaschen und 30min mit 4% Formaldehyd/PBS fixiert. Nach jeweils zweimaligem Waschen erfolgten für je 10min zuerst die Sättigung unspezifischer Aldehydgruppen mit 50mM NH₄Cl und anschließend die Permeabilisierung mit 0,2% TritonX-100/PBS. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden unspezifische Bindungsstellen für 30min mit 3% BSA/PBS gesättigt.

Daraufhin wurden die Zellen 1h mit 0,125µg/ml TRITC-Phalloidin inkubiert und einmal gewaschen. Abschließend folgten für 5min eine Zellkernfärbung mit 1,5µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes, Leiden, NL) und ein letzter Waschschrift. Nach dem Trocknen des Präparates wurde dieses mit VectaShield® Eindeckmedium (Linaris, Wertheim-Bettingen) versehen und bis zur Fluoreszenzmikroskopie bei -20°C aufbewahrt.

4.2.8.2 Mikroskopiebedingungen für die Visualisierung der fluoreszenzgefärbten Präparate

Die Fluoreszenzpräparate wurden an einem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM510 META, Carl Zeiss, Jena) mit einem C-Apo 40x1.2 Wasserobjektiv und einem mittels der LSM-Software (AIM, Zeiss Microimaging, Göttingen) eingestelltem Zoomfaktor von 1,0 mikroskopiert. TRITC-Phalloidin wurde mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 543nm angeregt und zwischen 565-615nm detektiert. Die Anregung des DNA-Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33342 erfolgte mit dem 2-Photonen-Laser bei 764nm und einer Detektion zwischen 390-465nm.

4.3 Proteinbiochemische Arbeiten

4.3.1 Proteinisolierung

Für die Proteinisolierung aus Zelllinien und Frischgewebe wurde der 10x Zellysepuffer der Firma CST (USA) verwendet. Kurz vor dem Einsatz erfolgte auf Eis die 1:10-Verdünnung mit Aqua a.i. und die Zugabe von 1mM PMSF als Proteaseinhibitor.

4.3.1.1 Proteinisolierung aus Zellen

Die Zellen wurden mit 5ml 1x PBS (4°C) gewaschen. 500µl 1x Lysepuffer wurden auf eine 10cm-Schale gegeben und 15min auf Eis inkubiert. Der Zellrasen wurde abgeschabt und 15min bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert.

4.3.1.2 Proteinisolierung aus Frischgewebe von humanen Astrozytomen

Frischgewebe wurde in kleine Stückchen geschnitten, im Homogenisator mit 3ml 1x Lysepuffer versetzt und zerkleinert. Nach 15min Inkubation auf Eis wurde das Homogenisat nochmals durchmischt, auf 1,5ml Reaktionsgefäße verteilt und 15min bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C tiefgefroren.

4.3.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung von Zell- und Gewebeextrakten erfolgte nach Bradford (Bradford 1976) mit Hilfe eines kommerziellen Nachweissystems der Firma Bio-Rad (München). Der Nachweis beruht auf einer Interaktion des Farbstoffs Coomassie-Blau mit aromatischen Aminosäuren. Aus einer BSA-Lösung wurden definierte Konzentrationen (0, 2, 4, 6 und 8µg/ml in TritonX-100) hergestellt. Von den 1:10 in 1x PBS verdünnten Proteinlysaten wurden Doppelbestimmungen in den Konzentrationen 1:250 und 1:500 durchgeführt. 10min nach Zugabe von 600µl 1:4 in 1x PBS verdünnter Bradford Reagenz erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 595nm mit einem Spektralphotometer (Beckman Instruments GmbH). Die Proteinkonzentration der Proben wurde mittels Standardkurve ermittelt.

4.3.3 Western Blot-Analysen

4.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die aufzutragenden Proteine und der Größenstandard wurden nach Laemmli (1970) mit 5x Probenpuffer gemischt und 5min bei 95°C denaturiert. Sollte in der späteren Immundetektion der EGF-Rezeptor nachgewiesen werden, wurden 7,5%ige Trenngele verwendet, ansonsten wurden 10%ige Trenngele eingesetzt. In eine Gelspur wurden 4-8µg Protein bzw. 8µl des Größenstandards aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Laufzeit betrug bei einer Spannung von 120-150V etwa 45-120min.

4.3.3.2 Proteintransfer

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membranen erfolgte in Abhängigkeit der Molekularmasse des nachzuweisenden Proteins. Sollte in der späteren Immundetektion der EGF-Rezeptor gezeigt werden, wurde das „Wet Blot“-Verfahren angewendet, sonst wurde das „Semi-Dry Blot“-Verfahren durchgeführt.

Das Verfahren des „Semi-Dry Blottings“ erfolgte nach Kyhse-Andersen (1984) mit einem „Semi-Dry Blotter“ (Bio-Rad Laboratories GmbH). Der Proteintransfer wurde mittels eines diskontinuierlichen Puffersystems durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde hierbei 5min in Methanol abs. und nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser nochmals 5min in der Anodenlösung I inkubiert. Der Transfer erfolgte unmittelbar nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für 1h bei einer Stromstärke von 225mA.

Der „Wet Blot“ (Tank Blot) wurde nach dem sogenannten Sandwichverfahren durchgeführt. Dabei wurde das Trenngel unmittelbar nach dem Proteintransfer 15min im Transferpuffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde 1min in Methanol abs., 2min in H₂O dest. und 10min im Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgte ÜN bei einer Spannung von 14V.

4.3.3.2.1 Färben der Proteinbanden auf der PVDF-Membran

Bei Bedarf wurde der Erfolg des Proteintransfers mittels Ponceau-S-Färbung überprüft. Die Membran wurde dazu nach dem Transfer 5min in 1x Ponceau-S-Lösung bei RT inkubiert und durch kurzes, mehrmaliges Waschen in H₂O dest. entfärbt. Die auf der Membran fixierten Proteinbanden stellten sich durch Bindung des Farbstoffs rot dar.

4.3.3.2.2 Sättigung freier Bindungsstellen („Blocken“)

Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu sättigen wurde die PVDF-Membran unmittelbar nach dem Transfer oder der Ponceau-S-Färbung mit 5% Magermilchpulver (in 1x TBST) 1h bei RT inkubiert. Die Membran konnte nun für den spezifischen Immunnachweis verwendet oder für spätere Weiterbearbeitung nach dem Trocknen bei 4°C aufbewahrt werden.

4.3.3.3 Indirekte Immundetektion im Western Blot

Der Nachweis immobilisierter Antigene erfolgte indirekt, indem ein Primärantikörper durch einen an das Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper mit Hilfe der ECL-Reaktion detektiert wurde. Durch die Peroxidase wird die Oxidation von Luminol katalysiert und eine Chemilumineszenz ausgelöst.

Die PVDF-Membranen wurden bei 4°C ÜN mit dem gewünschten ersten Antikörper in der angegebenen Konzentration (vgl. 3.3.1) in 1x TBST unter Schütteln inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für 5min in 1x TBST und eine Inkubation von 1h mit dem Sekundärantikörper in der angegebenen Verdünnung (vgl. 3.3.2) in 5% Magermilchpuffer. Nach dreimaligem Waschen wurden die Membranen 1min nach Angaben des Herstellers mit den ECL-Komponenten benetzt. Die Visualisierung der immunreaktiven Proteine erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

4.3.4 Doppel-Immunfluoreszenz

4.3.4.1 Durchführung der Färbung

Um die Lokalisation von phospho-EGFR und Rab5 in der Zelle zu untersuchen wurden die sechs humanen Gliomzelllinien mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Kultivierung und Behandlung der Zellen erfolgte dabei wie in Kapitel 4.2.1.2.2 beschrieben.

Die Durchführung der Immunfluoreszenz fand, sofern nicht anders angegeben, bei RT statt und die Waschschrte mit 1x PBS. Dazu wurden die Zellen nach Inkubation zweimal gewaschen und 30min mit 4% Formaldehyd/PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte dann zuerst die Sättigung unspezifischer Aldehydgruppen mit 50mM NH₄Cl für 10min und nach zwei weiteren Waschschrten anschließend die Permeabilisierung mit 0,25% TritonX-100/PBS für 5min. Die Zellen wurden daraufhin dreimal gewaschen und schließlich unspezifische Bindungsstellen mit 1% BSA/PBS gesättigt. Im Anschluss daran erfolgte ÜN die Inkubation mit den beiden primären Antikörpern im Gemisch bei 4°C [phospho-EGFR(Tyr1086) 1:150, polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, Zymed[®] Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA; Rab5 1:50, monoklonaler Antikörper aus der Maus, von Pharmingen, Heidelberg; Verdünnung jeweils in 1% BSA/PBS]. Die Präparate wurden dann dreimal je 5min gewaschen und mit den beiden fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern im Gemisch 1h inkubiert (Ziege gegen Kaninchen FITC-konjugiert und Ziege gegen Maus CY3-konjugiert; Verdünnung je 1:100 in 1% BSA/PBS; beide von Zymed[®] Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA). Nach drei 5minütigen Waschschrten wurden für 5min eine Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 (1,5µg/ml; Molecular Probes, Leiden,

NL) und ein letzter Waschschrift durchgeführt. Nach dem Trocknen der Präparate wurden sie mit VectaShield® Eindeckmedium (Linaris, Wertheim-Bettingen) versehen und bis zur Fluoreszenzmikroskopie bei -20°C gelagert.

4.3.4.1 Mikroskopiebedingungen für die Immunfluoreszenz

Die Mikroskopie der Immunfluoreszenzpräparate erfolgte an einem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM510 META, Carl Zeiss, Jena) mit einem C-Apo 40x1.2 Wasserobjektiv und einem durch die LSM-Software (AIM, Zeiss Microimaging, Göttingen) eingestelltem Zoomfaktor von 1,0. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC wurde mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt und zwischen 505-530nm detektiert. Die Anregung für CY3 erfolgte mit einem Helium-Neon-Laser bei 543nm und die Messung zwischen 565-615nm. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 wurde mit dem 2-Photonen-Laser bei 764nm angeregt und zwischen 390-465nm detektiert.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors und des PI3-Kinase/Akt- und des p44/42 MAP-Kinase-Signalwegs

In höhergradigen glialen Tumoren sind häufig genetische Veränderungen des EGF-Rezeptors zu finden, die funktionelle Konsequenzen in der intrazellulären Signaltransduktion zur Folge haben (Kleihues und Ohgaki, 1999). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die biochemische Charakterisierung des EGF-Rezeptors und des nachgeschalteten PI3-Kinase/Akt- und des p44/42 MAP-Kinase-Signalwegs (i) in humanen glialen Tumoren, (ii) in etablierten humanen Gliomzelllinien und (iii) in Primärkulturen aus humanen glialen Tumoren mittels Western Blot-Analysen. Phospho-spezifische Antikörper wurden eingesetzt um den jeweiligen Aktivierungsstatus der Signalwege zu ermitteln.

5.1.1 Etablierte Zelllinien

5.1.1.1 Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors

Der EGF-Rezeptor konnte in allen etablierten Gliomzelllinien in unterschiedlicher Menge nachgewiesen werden. G139, LN18 und LNZ308 ließen dabei auf eine sehr starke Expression des *EGFR*-Gens schließen und G109, G147 und LN229 auf eine eher schwache Expression (vgl. Abb. 5.1).

Mit einem Antikörper gegen die Tyr1086-Phosphorylierungsstelle, die als Bindungsstelle für das Adapterprotein Grb2 agiert und damit an der Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signalwegs beteiligt ist (Hynes und Lane, 2005; Rodrigues *et al.*, 2000), konnte bei keiner der Zelllinien eine konstitutive Aktivierung des EGFR-Signalwegs festgestellt werden. Nach fünfminütiger Inkubation mit 100ng/ml EGF zeigte sich innerhalb der Zelllinien eine unterschiedlich starke Aktivierung des EGF-Rezeptors. Hierbei konnte bei G139, LN18 und LNZ308, welches auch die Zelllinien mit hohem EGF-Rezeptorstatus sind, eine sehr starke Phosphorylierung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.1). G147 zeigte im Vergleich dazu eine abgeschwächte Aktivierung, G109 eine eher schwache und bei LN229 konnte keine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors beobachtet werden.

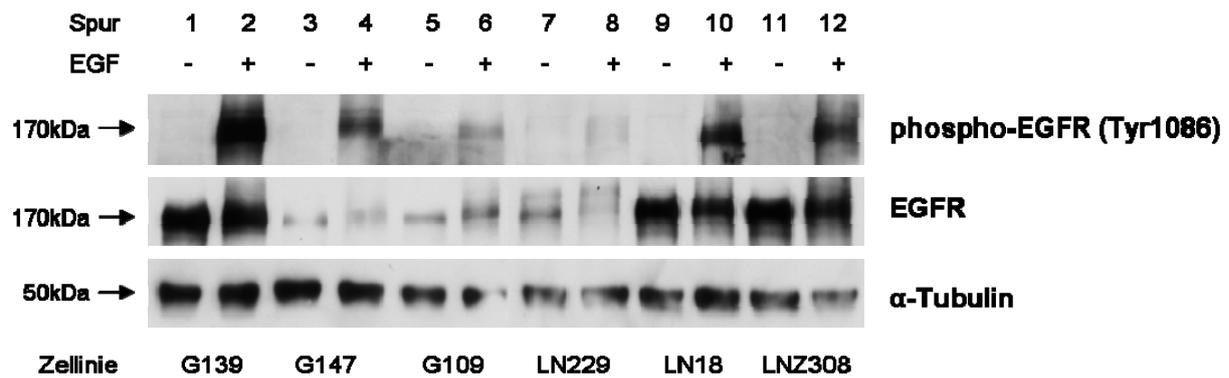


Abb. 5.1: Nachweis von phospho-EGFR und EGFR in Gliomzelllinien mittels Western Blot-Analysen

Humane Gliomzelllinien wurden nach Serumentzug mit (+) oder ohne (-) EGF inkubiert. 5µg Gesamtprotein aus den Zellysaten wurde in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der phospho-EGFR-Antikörper detektiert den an Tyrosin 1086 phosphorylierten EGF-Rezeptor. Es zeigte sich, dass keine der Zelllinien eine konstitutive Aktivierung des EGF-Rezeptors aufwies. G139, LN18 und LNZ308 hatten einen hohen EGFR-Expressionsstatus im Vergleich zu G147, G109 und LN229. Die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors erfolgte in Abhängigkeit seines Expressionsstatus.

5.1.1.2 Aktivierungsstatus der Proteinkinase B (PKB)/Akt

Alle etablierten Zelllinien wiesen eine Expression des *PKB/Akt*-Gens auf (Abb. 5.2, jeweils untere Reihe). Unter serumfreien Bedingungen zeigte sich mit einem Antikörper gegen die Ser473-Phosphorylierungsstelle, die zur vollständigen Aktivierung von PKB/Akt benötigt wird, bei G139 und LNZ308 eine starke konstitutive Aktivierung von PKB/Akt, die selbst nach 15minütiger Inkubation mit 10ng/ml EGF nicht weiter gesteigert werden konnte (Abb. 5.2, Spuren 1 und 2). G109, G147 und LN18 waren unter serumfreien Bedingungen schwach positiv, für LN229 konnte keine Aktivierung von PKB/Akt beobachtet werden. Die Stimulation mit EGF hatte aber bei diesen vier Zelllinien die Phosphorylierung an Ser473 und somit die vollständige Aktivierung von PKB/Akt zur Folge (Abb. 5.2, Spuren 1 und 2).

Mit Ausnahme von LNZ308 konnte bei allen anderen untersuchten Zelllinien die Phosphorylierung von PKB/Akt an Ser473 durch Gabe des spezifischen PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 vollständig verhindert und auch durch EGF nicht mehr aufgehoben werden. Bei LNZ308 mit ausgeprägter konstitutiver Aktivierung von PKB/Akt konnte die Behandlung mit LY294002 das Signal zwar deutlich reduzieren, die Phosphorylierung jedoch nicht vollständig verhindern. Auch hier konnte EGF diese Hemmung nicht wieder aufheben. LNZ308 war hierbei auch die einzige der Zelllinien, bei der die Blockade anderer Kinasen keine Effekte auf die Phosphorylierung von PKB/Akt hatte. So führte bei den übrigen Zelllinien die Blockade des EGF-Rezeptors durch Tyrphostin AG1478 ebenfalls zu einer Hemmung von PKB/Akt. Die anschließende Behandlung

mit EGF konnte PKB/Akt nicht an Ser473 phosphorylieren wie es bei der nur mit EGF behandelten Kontrolle zu beobachten war (Abb. 5.2).

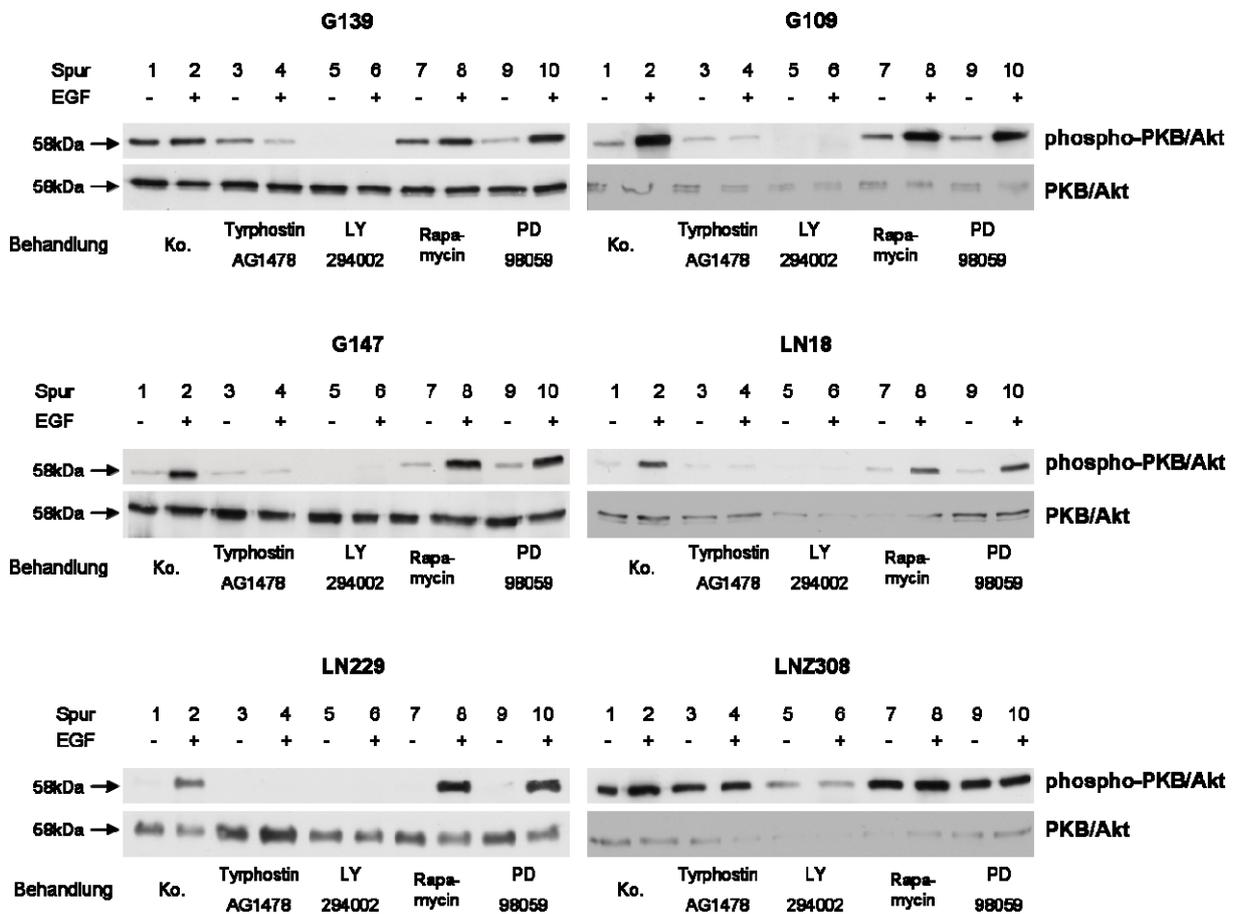


Abb. 5.2: Nachweis von phospho-PKB/Akt und PKB/Akt in Gliomzelllinien mittels Western Blot-Analysen

Humane Gliomzelllinien wurden nach Serumentzug mit Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor), PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor) oder ohne einen Inhibitor (Kontrolle, Ko.) behandelt und anschließend mit (+) oder ohne (-) EGF inkubiert. 5µg Gesamtprotein aus den Zellsaten wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der phospho-PKB/Akt-Antikörper detektiert die an Serin 473 phosphorylierte Proteinkinase B(PKB)/Akt. Es zeigte sich, dass G139 und LNZ308 eine starke, G109, G147 und LN18 eine schwache und LN229 keine konstitutive Aktivierung von PKB/Akt hatten (Spur 1). Alle Zelllinien wiesen nach EGF-Stimulation eine Phosphorylierung von PKB/Akt auf (Spur 2) und die Blockade der PI3-Kinase durch LY294002 führte bei LNZ308 zu einer Abnahme und bei den übrigen Zelllinien zu einer Inhibierung der Phosphorylierung (Spuren 5 und 6). Die Blockade des EGF-Rezeptors mit Tyrphostin AG1478 hatte ebenfalls eine Hemmung von PKB/Akt zur Folge (Spur 4).

5.1.1.3 Phosphorylierung der p44/42 Mitogen aktivierten Proteinkinase (p44/42 MAPK)

In allen etablierten Zelllinien konnte eine Expression des *p44/42 MAPK*-Gens nachgewiesen werden (Abb. 5.3, jeweils untere Reihe). Mit einem Antikörper gegen die Thr202/Tyr204-

Phosphorylierungsstellen zeigte sich unter serumfreien Bedingungen bei allen Zelllinien eine unterschiedlich starke konstitutive Aktivierung von p44/42 MAPK (Abb. 5.3, jeweils Spur 1). Hierbei konnte bei G109, G139 und G147 eine stärker ausgeprägte Phosphorylierung als bei LN18, LN229 und LN308 beobachtet werden. Nach 15min Inkubation mit 10ng/ml EGF zeigte sich bei allen Zelllinien eine weitere Zunahme des Signals (vgl. Abb. 5.3, jeweils Spur 2).

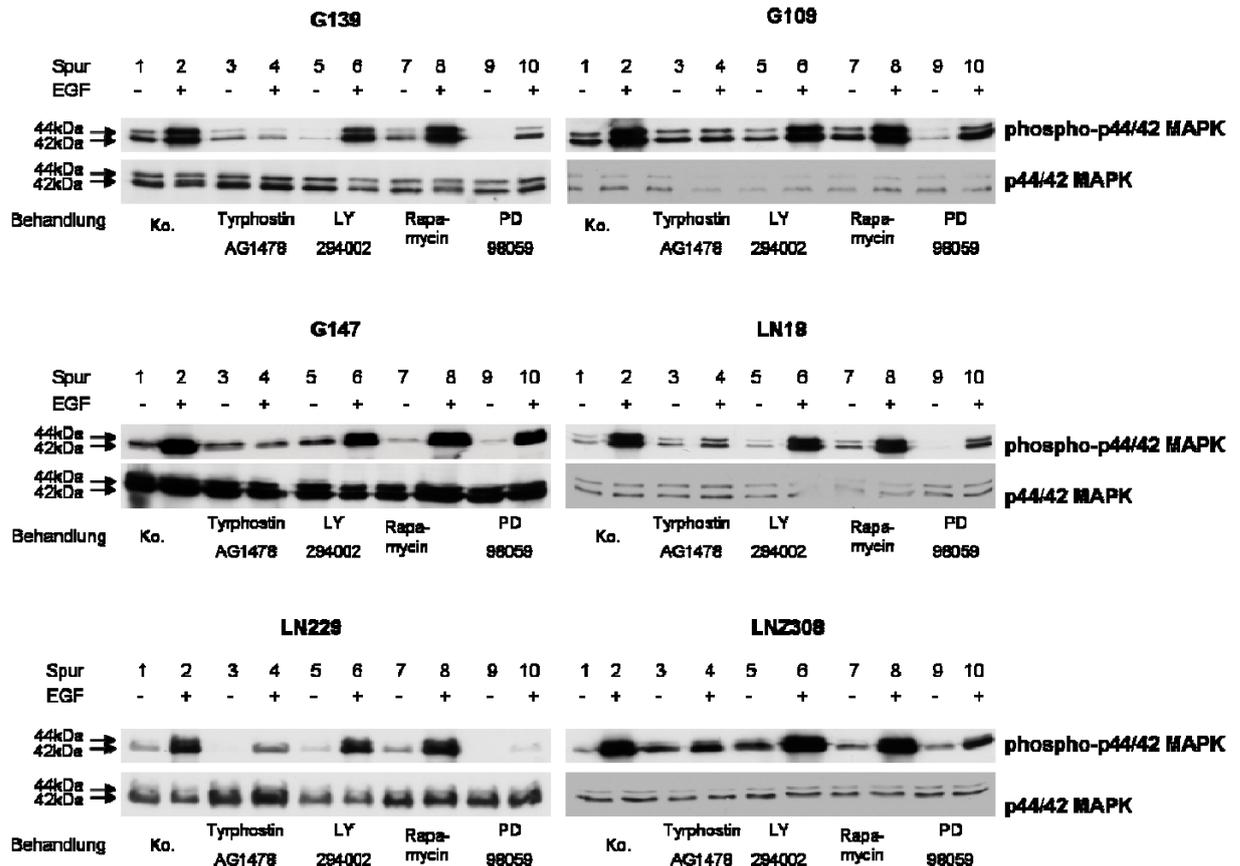


Abb. 5.3: Nachweis von phospho-p44/42 MAPK und p44/42 MAPK in Gliomzelllinien mittels Western Blot-Analysen

Humane Gliomzelllinien wurden nach Serumentzug mit Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor), PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor) oder ohne einen Inhibitor (Kontrolle, Ko.) behandelt und anschließend mit (+) oder ohne (-) EGF inkubiert. 5µg Gesamtprotein aus den Zellysaten wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der phospho-p44/42 MAPK-Antikörper detektiert die an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierte p44/42 MAP-Kinase (ERK1/ERK2). Es zeigte sich für G109, G139 und G147 eine stärkere konstitutive Aktivierung von p44/42 MAPK als für LN18, LN229 und LN308 (Spur 1). Alle Zelllinien wiesen nach EGF-Stimulation eine Phosphorylierung von p44/42 MAPK auf (Spur 2). Die Blockade des EGF-Rezeptors mit Tyrphostin AG1478 (Spur 4) erwies sich als effizienter als eine direkte Blockade der p44/42 MAPK durch PD98059.

Bei G139, LN18 und LN229 konnte unter serumfreien Bedingungen der p44/42 MAPK-Inhibitor PD98059, welches die Aktivierung von MEK1 und damit die Threonin- und Tyrosin-

Phosphorylierung der p44/42 MAP-Kinase verhindert (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995), die Phosphorylierung von p44/42 MAPK vollständig blockieren; bei G109 und G147 war nur noch ein schwach positives Signal zu sehen. Bei LN229 war die Blockade auch nach EGF-Gabe nahezu irreversibel. Bei G109, G139, LN2308 und LN18 konnte PD98059 das Ausmaß der Aktivierung nur vermindern, aber nicht vollständig inhibieren. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, die nur mit EGF behandelt worden war, zeigte sich eine Reduktion in der Stärke des Signals (vgl. Abb. 5.3).

Der EGF-Rezeptor-Inhibitor Tyrphostin AG1478 wies nach EGF-Stimulation ein größeres Inhibierungspotential der p44/42 MAP-Kinase als PD98059 auf. So konnte EGF nach Blockade des EGF-Rezeptors mit Tyrphostin AG1478 bei keiner der Zelllinien außer LN229 eine weitere Aktivierung von p44/42 MAPK hervorrufen (Abb. 5.3, Spur 4). Die Inhibierung durch PD98059 hingegen konnte bei allen Zelllinien außer bei LN229 durch EGF wieder aufgehoben werden (Abb. 5.3, Spur 10).

Bei zwei Zelllinien hatten der mTOR-Inhibitor Rapamycin und der PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 einen Einfluss auf die Aktivierung von p44/42 MAPK. So konnte bei G139 unter serumfreien Bedingungen nach LY294002-Behandlung eine fast vollständige Inhibierung beobachtet werden, die durch EGF jedoch wieder aufgehoben wurde. Bei G147 erzielte Rapamycin unter serumfreien Bedingungen fast den gleichen Effekt wie eine Blockade des p44/42 MAPK-Inhibitors. Der mTOR-Inhibitor konnte aber die Aktivierung durch EGF nicht unterbinden (vgl. Abb. 5.3).

5.1.1.4 Status der kleinen GTPase Rab5

In allen sechs Gliomzelllinien konnte in Western Blot-Analysen die kleine GTPase Rab5, welche mit den frühen Endosomen assoziiert ist, nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.4). Unter serumfreien Bedingungen konnte hierbei im Vergleich der Zelllinien untereinander eine etwa gleich starke Immunreaktion für LN18 und LN2308 beobachtet werden, sowie eine schwächere für G139, G147 und LN229. G109 wies dazu eine vergleichsmäßig geringe Expression des *Rab5*-Gens auf. Eine Behandlung mit EGF hatte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Immunreaktion von Rab5.

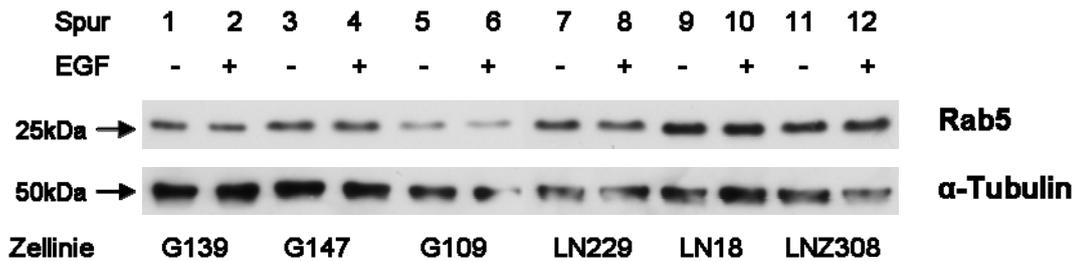


Abb. 5.4: Nachweis der kleinen GTPase Rab5 in Gliomzelllinien mittels Western Blot-Analysen

Humane Gliomzelllinien wurden nach Serumentzug mit (+) und ohne (-) EGF inkubiert. 5µg Gesamtprotein aus den Zellysaten wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Es zeigte sich, dass Rab5 in allen Zelllinien vorhanden ist und eine Behandlung mit EGF erwartungsgemäß keinen Einfluss auf den Rab5-Status hat.

5.1.1.5 Aktivierung und Internalisierung des EGF-Rezeptors auf morphologischer Ebene

Die Kinetik der Aktivierung und Internalisierung des EGF-Rezeptors in den sechs Gliomzelllinien wurde nach Gabe von EGF untersucht. Um hierbei das Reaktionsverhalten des EGF-Rezeptors auf morphologischer Ebene zu beurteilen wurde nach Inkubation mit 100ng/ml EGF für je 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Der phosphorylierte EGF-Rezeptor und die kleine GTPase Rab5, die mit den frühen Endosomen assoziiert ist (Benmerah, 2004; Clague und Urbé, 2001), wurden gleichzeitig visualisiert. Hierbei erfolgte für den aktivierten EGF-Rezeptor der Nachweis des phosphorylierten Tyrosinrestes Tyr1086, da er als Bindungsstelle für GRB2 agiert, das sowohl über die Bindung von GAB1 an der Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signalwegs beteiligt ist (Hynes und Lane, 2005; Rodrigues *et al.*, 2000), als auch die Internalisierung des EGF-Rezeptors in *clathrin-coated pits* reguliert (Jiang *et al.*, 2003).

In Abb. 5.5 sind aus dieser Versuchsreihe exemplarisch Immunfluoreszenzbilder von LN18 (Abb. 5.5 A), einer Zelllinie mit hohem EGF-Rezeptorstatus, und G109 (Abb. 5.5 B), einer Zelllinie mit niedrigem EGF-Rezeptorstatus, gezeigt. Die Immunfluoreszenzbilder für die übrigen Zelllinien sind im Anhang aufgeführt.

Übereinstimmend mit den Western Blot-Daten konnte unter serumfreien Bedingungen auch hier bei keiner der Zelllinien eine konstitutive Aktivierung des EGF-Rezeptors gezeigt werden (vgl. Abb. 5.1). Ebenso konnte nach EGF-Gabe für G139, LN18 und LNZ308 eine starke Aktivierung des EGF-Rezeptors an Tyr1086 nachgewiesen werden, wobei in fast allen Zellen eine positive Immunreaktion festgestellt wurde. Bei G109 und G147 zeigte sich hingegen nur in einigen Zellen eine Aktivierung des EGF-Rezeptors. Für LN229 konnte auch nach EGF-Gabe in keiner Zelle eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors beobachtet werden.

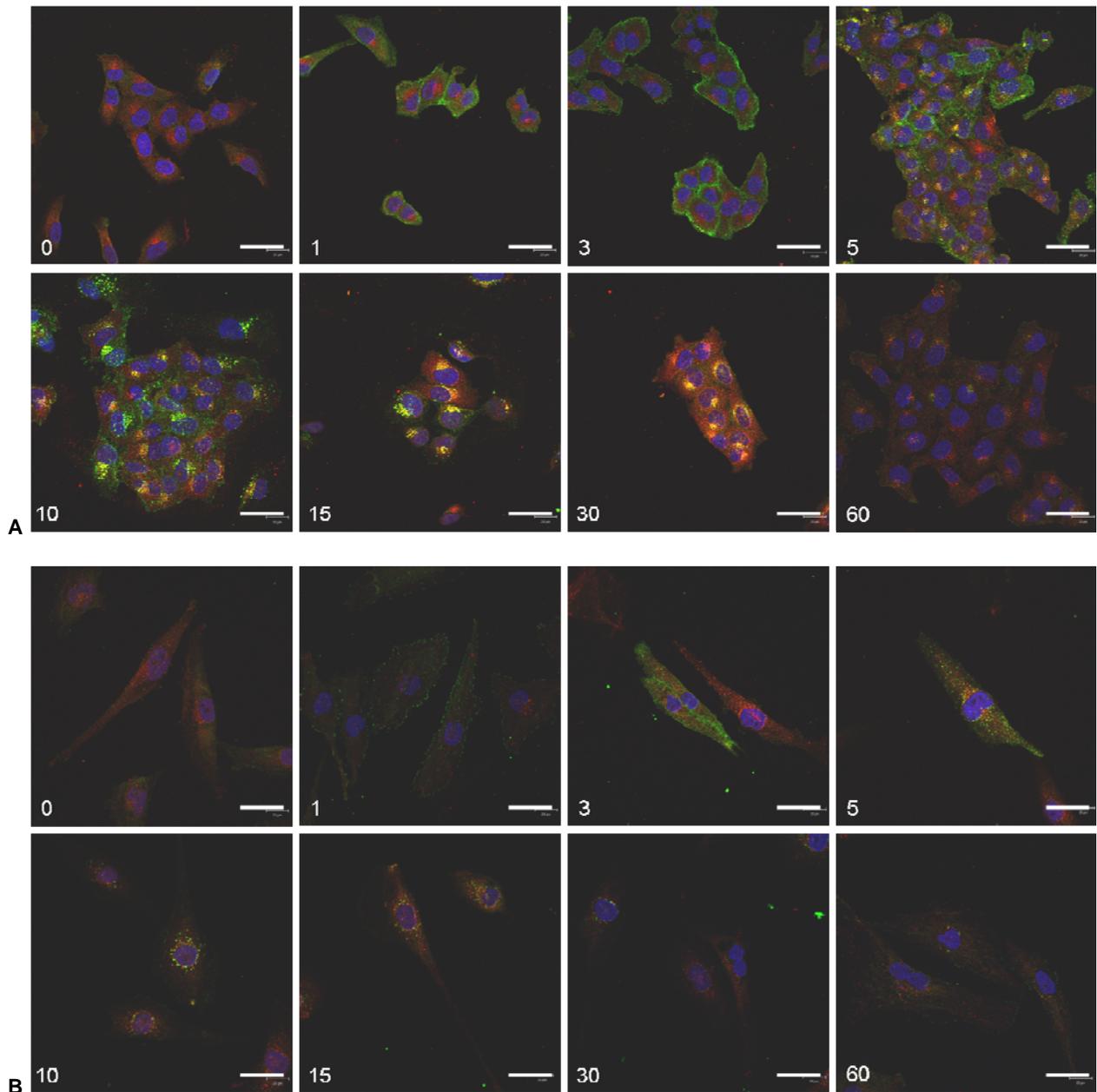


Abb. 5.5: Zeitliche Kinetik der Aktivierung des EGF-Rezeptors und seiner Internalisierung in das frühe Endosom.

Die humanen Gliomzelllinien LN18 (**A**) und G109 (**B**) wurden 24h unter serumfreien Bedingung inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 und 60min nach EGF-Stimulation wurde eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung für den an Tyr1086 phosphorylierten EGF-Rezeptor (goat-anti-rabbit FITC; grüne Signale) und der mit den frühen Endosomen assoziierten kleinen GTPase Rab5 (goat-anti-mouse CY3, rote Signale) durchgeführt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt und der Maßstabsbalken entspricht 40 μ m. Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors bei LN18 1min, bei G109 3min nach Stimulation erfolgte. Die Aktivierung blieb nach Internalisierung bestehen und folgte einer unterschiedlichen Kinetik. Bei LN18, einer Zelllinie mit hohem EGFR-Status, war der aktivierte EGF-Rezeptor noch nach 30 Minuten nachzuweisen, bei G109 wurde dies hingegen zuletzt in den Präparaten mit 15minütiger EGF-Stimulation festgestellt.

Mit Ausnahme von LN229 konnte bei allen Zelllinien sehr früh nach EGF-Stimulation die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors gezeigt werden. Hierbei ließ sich bei LN18, LN308 und G147 der aktivierte EGF-Rezeptor bereits nach einer Minute und bei G109 und G139 nach drei Minuten an der Zellmembran nachweisen. Für G109, G139, G147 und LN18 konnte die Internalisierung und Kolokalisation mit Rab5 zum ersten Mal nach fünf Minuten beobachtet werden und für LN308 nach zehn Minuten. Die weitere Kolokalisation von phospho(Tyr1086)-EGFR und Rab5 folgte einer unterschiedlichen zeitlichen Kinetik in den Zelllinien. Bei den Zelllinien mit hohem EGF-Rezeptorstatus, d.h. bei G139, LN18 und LN308, zeigte sich nach 30 Minuten immer noch eine Kolokalisation des aktivierten EGF-Rezeptors mit Rab5 in den frühen Endosomen. Für G109 und G147 konnte dies hingegen zuletzt in den Präparaten mit 15minütiger EGF-Stimulation nachgewiesen werden.

Nachdem der aktivierte EGF-Rezeptor das frühe Endosom verlassen hatte, d.h. nicht mehr mit Rab5 assoziiert war, konnte er in allen Zelllinien außer bei LN229 nur noch sehr vereinzelt am Zellkern beobachtet werden.

5.1.2 Der PI3/Akt-Signalweg und die p44/42 MAP-Kinase sind in den humanen glialen Tumoren konstitutiv aktiviert

An Proteinlysaten aus Operations- und Biopsiematerial von Gliompatienten der Neurochirurgie des Klinikums rechts der Isar wurde mittels Western Blot-Analysen der Aktivierungsstatus des PI3-Kinase/Akt- und des p44/42 MAP-Kinase-Signalwegs bestimmt. Insgesamt wurden sieben Tumoren untersucht.

Bei den Tumoren mit der Bezeichnung TUM G4 und TUM G6 konnte eine konstitutive Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs ermittelt werden. Sowohl für PKB/Akt als auch für die nachgeschaltete p70S6-Kinase konnte eine Phosphorylierung gezeigt werden (Abb. 5.6 B, Spuren 1 und 2 bzw. Abb. 5.6 C, Spuren 3 und 4). Entgegen der Erwartung konnte aber auch der Tumorsuppressor PTEN, welches der Gegenspieler der PI3-Kinase ist und somit die Phosphorylierung von PKB/Akt verhindert (Cantley und Neel, 1999), festgestellt werden (Abb. 5.6 B, Spuren 1 und 2). Bei TUM G4 zeigte sich eine stark ausgeprägte konstitutive Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase an Thr202/Tyr204 (Abb. 5.6 B, Spur 1), wohingegen bei TUM G6 nur ein schwaches Signal zu sehen war (Abb. 5.6 B, Spur 2).

Ebenso bei dem Glioblastom mit der Bezeichnung TUM G8 konnte eine Phosphorylierung von PKB/Akt an Ser473 gezeigt werden (vgl. Abb. 5.7, Spur 7). Übereinstimmend hiermit konnte der Tumorsuppressor PTEN nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte eine starke

konstitutive Aktivierung der p44/42-MAP-Kinase an Thr202/Tyr204 beobachtet werden (Abb. 5.7, Spur 7).

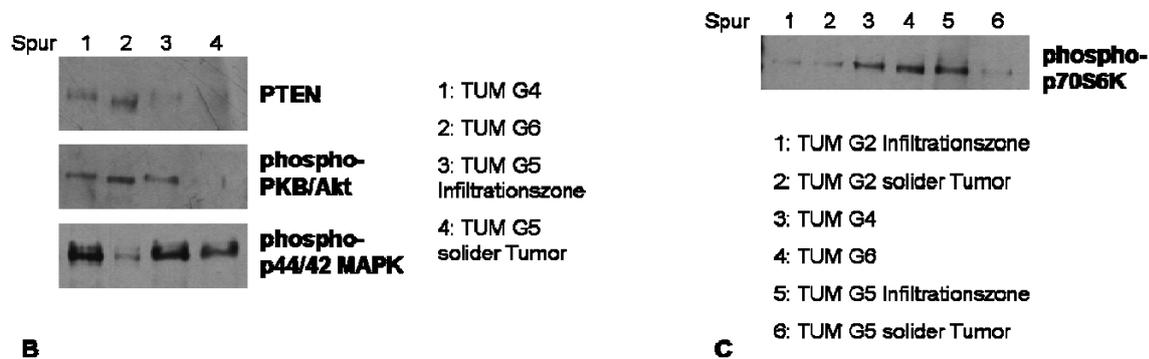
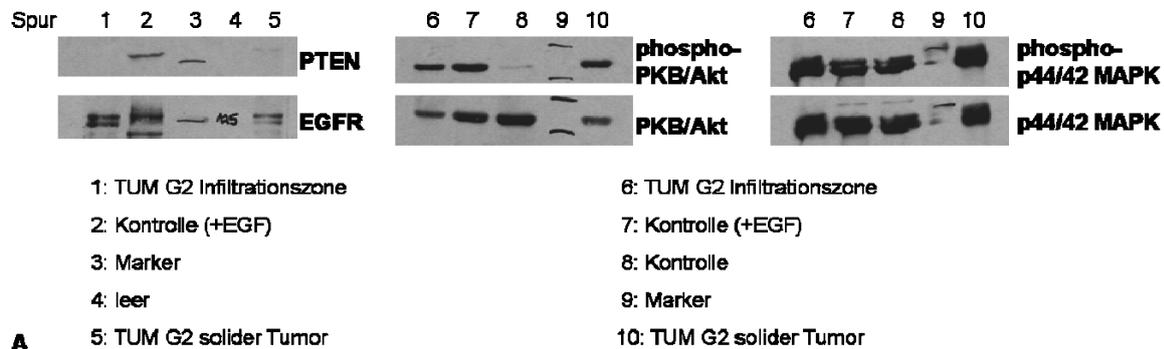


Abb. 5.6: Nachweis von PTEN, EGFR, phospho-PKB/AKT, PKB/Akt, phospho-p44/42 MAPK, p44/42 MAPK und phospho-p70S6K in den humanen Glioblastomen TUM G2, TUM G4, TUM G5 und TUM G6

5µg Gesamtprotein aus Lysaten von humanen Glioblastomen wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Für TUM G2 und TUM G5 wurden Gewebeproben sowohl aus dem Tumor selbst (solider Tumor) als auch aus der Infiltrationszone untersucht. Der phospho-PKB/Akt-Antikörper detektiert die an Serin 473 phosphorylierte Proteinkinase B(PKB)/Akt, der phospho-p44/42 MAPK-Antikörper die an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierte p44/42 MAP-Kinase und der phospho-p70S6K-Antikörper die an Threonin 389 phosphorylierte p70S6-Kinase. Es zeigte sich, dass in allen Tumoren sowohl PKB/Akt als auch p44/42 MAPK konstitutiv aktiviert ist. Bei TUM G5 wurde in der Infiltrationszone eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs nachgewiesen (**B**, Spur 3; **C**, Spur 5), wohingegen dies im soliden Tumor nicht festgestellt wurde (**B**, Spur 4; **C**, Spur 6). (Als Kontrolle wurden Proteinlysate der Zelllinie 229 verwendet, die unter serumfreien Bedingungen keine Phosphorylierung von PKB/Akt aufweist. Molekulargewichte von PTEN: 55kDa, EGFR: 170kDa, PKB/Akt: 58kDa, p44/42 MAPK: 44 bzw. 42kDa und p70S6K: 70kDa).

Um einen möglichen Unterschied in der Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs zu identifizieren wurden dabei für die Glioblastome mit der Bezeichnung TUM G2 und TUM G5 getrennte Proben aus dem Tumor selbst (solider Tumor) und aus der Infiltrationszone untersucht. Bei den Tumoren TUM G10 und TUM G11 wurden jeweils drei getrennte Proben analysiert. Hierbei handelte es sich um Gewebe aus dem soliden Tumor, sowie um Proben, die aus der

Infiltrationszone entnommen worden waren, die 1cm und 2cm vom soliden Tumor entfernt lagen (Infiltrationszone I bzw. Infiltrationszone II).

Für TUM G2 und TUM G10 konnte kein Unterschied in der Aktivierung der Signalwege für die verschiedenen Proben nachgewiesen werden.

Für TUM G2 zeigte sich sowohl in der Infiltrationszone als auch im soliden Tumor eine konstitutive Aktivierung von PKB/Akt an Ser473 (Abb. 5.6 A, Spur 6 bzw. 10). Übereinstimmend hierzu konnte in keiner der beiden Proben der Tumorsuppressor PTEN nachgewiesen werden (Abb. 5.6 A, Spur 1 bzw. 5). Für die p70S6-Kinase zeigte sich eine schwache Phosphorylierung an Thr389 (Abb. 5.6 C, Spur 1 bzw. 2). Des Weiteren konnte in beiden Proben der EGF-Rezeptor ermittelt werden (Abb. 5.6 A, Spur 1 bzw. 5) sowie eine konstitutive Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase an Thr202/Tyr204 (Abb. 5.6 A, Spur 6 bzw. 10).

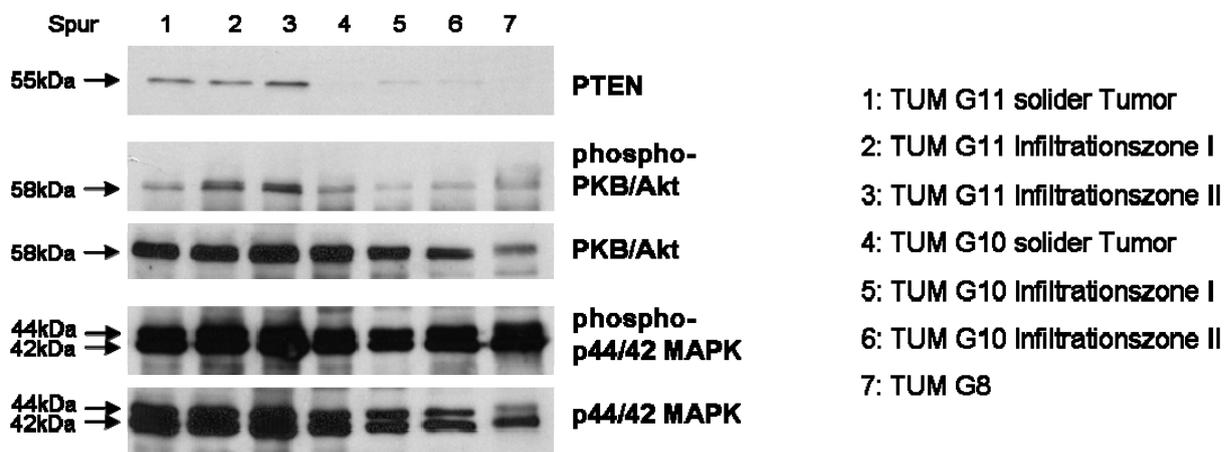


Abb. 5.7: Nachweis von PTEN, phospho-PKB/AKT, PKB/Akt, phospho-p44/42 MAPK und p44/42 MAPK in humanen Glioblastomen

5µg Gesamtprotein aus Lysaten von humanen Glioblastomen wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Für TUM G10 und TUM G11 wurden Gewebeprobe sowohl aus dem Tumor selbst (solider Tumor) als auch aus der Infiltrationszone untersucht, die 1cm und 2cm vom soliden Tumor entfernt waren (Infiltrationszone I bzw. II). Der phospho-PKB/Akt-Antikörper detektiert die an Serin 473 phosphorylierte Proteinkinase B(PKB)/Akt und der phospho-p44/42 MAPK-Antikörper die an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierte p44/42 MAP-Kinase. Es zeigte sich, dass in allen Tumoren sowohl PKB/Akt als auch p44/42 MAPK konstitutiv aktiviert ist. Bei TUM G11 wurde in den Infiltrationszonen eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs nachgewiesen (Spuren 2 und 3), wohingegen dies im soliden Tumor nicht festgestellt wurde (Spur 1).

Auch konnte kein Unterschied in der Aktivierung der Signalwege in den Proben aus dem soliden Tumor und den beiden Infiltrationszonen bei TUM G10 festgestellt werden. Hier zeigte sich in allen Geweben eine Phosphorylierung von PKB/Akt an Ser473. Übereinstimmend hierzu konnte PTEN nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte in allen drei Proben eine kon-

stitutive Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase an Thr202/Tyr204 gezeigt werden (vgl. Abb. 5.7, Spuren 4-5).

Für das Glioblastom (WHO-Grad IV) mit der Bezeichnung TUM G5 und das Anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) TUM G11 konnte hingegen ein Unterschied in der Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs festgestellt werden.

Bei TUM G5 konnte sowohl für PKB/Akt als auch für die nachgeschaltete p70S6-Kinase im soliden Tumor keine bzw. nur eine schwache Phosphorylierung beobachtet werden (Abb. 5.6 B, Spur 4 bzw. Abb. 5.6 C, Spur 6). In der Infiltrationszone von TUM G5, in der sich eingebettet in Normalgewebe, d.h. in nicht neoplastisches Gewebe, migrierende Tumorzellen finden, ist der PI3-Kinase-Signalweg hingegen aktiviert. Sowohl bei PKB/Akt als auch bei der nachgeschalteten p70S6-Kinase wurde eine Phosphorylierung beobachtet (Abb. 5.6 B, Spur 3 bzw. Abb. 5.6 C, Spur 5). Der Tumorsuppressor PTEN konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.6 B, Spur 3 bzw. 4). Beim Aktivierungsstatus der p44/42 MAP-Kinase ließ sich für die Infiltrationszone und den soliden Tumor von TUM G5 allerdings kein Unterschied aufzeigen. In beiden Proben war dieser Signalweg konstitutiv aktiviert (Abb. 5.6 B, Spur 3 bzw. 4).

Auch bei TUM G11 zeigte sich für PKB/Akt in den Proben aus den beiden Infiltrationszonen eine stärkere Phosphorylierung an Ser473 als in der Probe aus dem soliden Tumor. In allen Proben konnte jedoch auch PTEN nachgewiesen werden und ebenso eine stark ausgeprägte konstitutive Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase (vgl. Abb. 5.7, Spuren 1-3).

Zusammenfassend konnte in vier der sieben (57,1%) untersuchten Astrozytome ein Verlust des Tumorsuppressors PTEN nachgewiesen werden. In allen Tumoren konnte eine konstitutive Aktivierung von PKB/Akt und der p44/42 MAP-Kinase.

5.1.3 Primäre Zellkulturen aus humanen glialen Tumoren

An Proteinlysaten aus primären Zellkulturen, die aus Operations- und Biopsiematerial von Gliompatienten der Neurochirurgie des Klinikums rechts der Isar gewonnen wurden, wurde der Aktivierungsstatus des PI3-Kinase (PI3K)/Akt- und des p44/42 MAP-Kinase-Signalwegs untersucht.

5.1.3.1 Aktivierung von PKB/Akt, p44/42 MAPK und p70S6K in den primären Zellkulturen aus TUM G2

Für das Glioblastom TUM G2 wurden Primärkulturen angelegt, die zum einen aus Frischgewebe aus der Infiltrationszone des Tumors und zum anderen aus dem soliden Tumor selbst stammten. So wie bei der Pathogenese verschiedener Tumoren eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs nachgewiesen wurde (Luo *et al.*, 2003), konnte dies nach 16h Serumentzug auch bei beiden TUM G2-Primärkulturen festgestellt werden (vgl. Abb. 5.8, Spur 1). Sogar eine 16stündige Kultivierung mit 10% Serum (FCS) (Abb. 5.8, Spur 6) oder eine 15minütige EGF-Stimulation (Abb. 5.8, Spur 2) vermochte das Ausmaß der Phosphorylierung der Proteinkinase (PKB)/Akt an Ser473 nicht weiter zu verstärken.

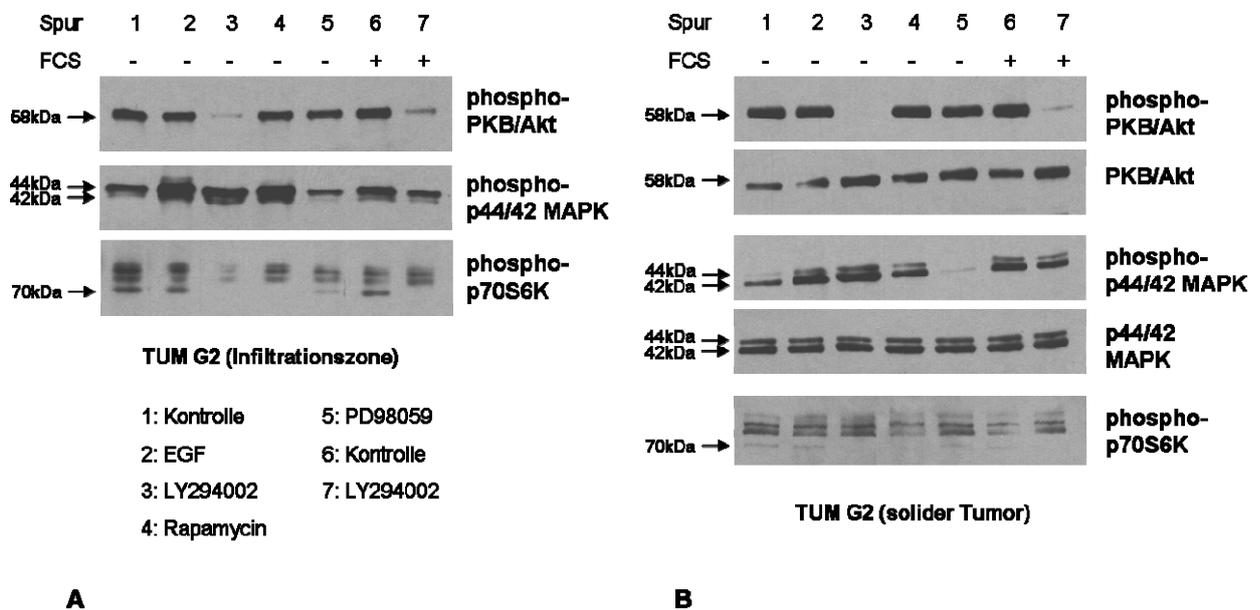


Abb. 5.8: Nachweis von phospho-PKB/AKT, PKB/Akt, phospho-p44/42 MAPK, p44/42 MAPK und phospho-p70S6K in der primären Zellkultur aus dem Glioblastom TUM G2.

Primäre Zellen aus der Infiltrationszone (A) und dem soliden Tumor (B) des Glioblastoms TUM G2 wurden nach Serumentzug (FCS -) und ohne Serumzug (FCS +) mit EGF, LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) oder PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor) inkubiert. 5µg Gesamtprotein aus den Zellysaten wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der phospho-PKB/Akt-Antikörper detektiert die an Serin 473 phosphorylierte Proteinkinase B(PKB)/Akt, der phospho-p44/42 MAPK-Antikörper die an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierte p44/42 MAP-Kinase und der phospho-p70S6K-Antikörper die an Threonin 389 phosphorylierte p70S6-Kinase. Es zeigte sich, dass sowohl der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg als auch p44/42 MAPK konstitutiv aktiviert sind. Es wurde kein Unterschied zwischen den primären Zellen, die aus der Infiltrationszone gewonnen worden waren, und des Zellen aus dem soliden Tumor festgestellt.

Die Blockade der PI3-Kinase durch den spezifischen Inhibitor LY294002 führte sowohl unter serumfreien Bedingungen (Abb. 5.8, Spur 3) als auch unter Einfluss von FCS (Abb. 5.8, Spur 7) erwartungsgemäß zu einer Abnahme bzw. Inhibierung der Phosphorylierung von PKB/Akt an Ser473.

Übereinstimmend mit dem Phosphorylierungsstatus von PKB/Akt, konnte bei beiden Primärkulturen aus TUM G2 nach 16h Serumentzug auch eine konstitutive Aktivierung der Thr389-Phosphorylierungsstelle der p70S6-Kinase, welche über mTOR von PKB/Akt phosphoryliert wird (Schmelzle und Hall, 2000), festgestellt werden (vgl. Abb. 5.8, Spur 1). Auch hier war nach EGF-Stimulation oder unter Kultivierung mit 10% FCS keine weitere Zunahme der Signalstärke zu beobachten (Abb. 5.8, Spur 2 bzw. 6). Sowohl die Inhibierung von mTOR durch Rapamycin (Abb. 5.8, Spur 4) als auch die Inhibierung des PI3K/Akt-Signalwegs durch LY294002 (Abb. 5.8, Spuren 3 und 7) hatte die Dephosphorylierung von Thr389 der p70S6-Kinase zur Folge.

In der Primärkultur aus der Infiltrationszone und auch in der Kultur aus dem soliden Tumor ließ sich nach 16h Serumentzug eine konstitutive Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase (MAPK) an Thr202/Tyr204 beobachten (vgl. Abb. 5.8, Spur 1). Die Aktivierung der Proben ohne Serumentzug war jedoch schwächer als die der Proben, die 16h mit 10% FCS inkubiert wurden (Abb. 5.8, Spur 6). Die Stimulierung mit EGF führte ebenfalls zu einer stärkeren Phosphorylierung von p44/42 MAPK (Abb. 5.8, Spur 2). Die Blockade von p44/42 MAPK durch PD98059 war bei der Primärkultur aus der Infiltrationszone nicht erfolgreich, bei der Primärkultur aus dem soliden Tumor zeigte sich jedoch die erwartungsgemäße Inhibierung der Phosphorylierung von p44/42 MAPK (Abb. 5.8 A bzw. 5.8 B, Spur 5). Interessanterweise zeigte die Blockade der PI3-Kinase durch LY294002 und die Blockade von mTOR durch Rapamycin unter serumfreien Bedingungen in der Primärkultur aus der Infiltrationszone die gleichen Effekte wie eine Stimulierung mit EGF (Abb. 5.8 A, Spur 3 bzw. 4). Im Vergleich zur Kontrolle konnte hier das Ausmaß der Phosphorylierung von p44/42 MAPK verstärkt werden.

5.1.3.2 Aktivierung von p44/42 MAPK und p70S6K in der primären Zellkultur aus TUM G4

Für die primäre Zellkultur aus dem Glioblastom TUM G4 zeigte sich nach 16h Serumentzug sowohl für die p44/42 MAP-Kinase an Thr202/Tyr204 als auch für die p70S6-Kinase an Thr389 eine konstitutive Aktivierung (Abb. 5.9, Spur 1). Eine 15minütige Stimulierung mit EGF hatte dabei eine stärkere Zunahme der Phosphorylierung zur Folge als eine 16stündige Inkubation mit 10% FCS (Abb. 5.9, Spur 2 bzw. 6).

Eine Inhibierung mit PD98059 führte erwartungsgemäß zur Dephosphorylierung der p44/42 MAP-Kinase (Abb. 5.9, Spur 4). Dabei hatte die Inhibierung der PI3-Kinase mittels LY294002

unter serumfreien Bedingungen eine Verstärkung des p44/42 MAPK-Signals zur Folge (Abb. 5.9, Spur 3).

Die Phosphorylierung der p70S6-Kinase, die über mTOR von PKB/Akt aktiviert wird, konnte hier sowohl durch Rapamycin (mTOR-Inhibitor) als auch durch LY294002 vollständig unterbunden werden (Abb. 5.9, Spur 5 bzw. 3 und 7).

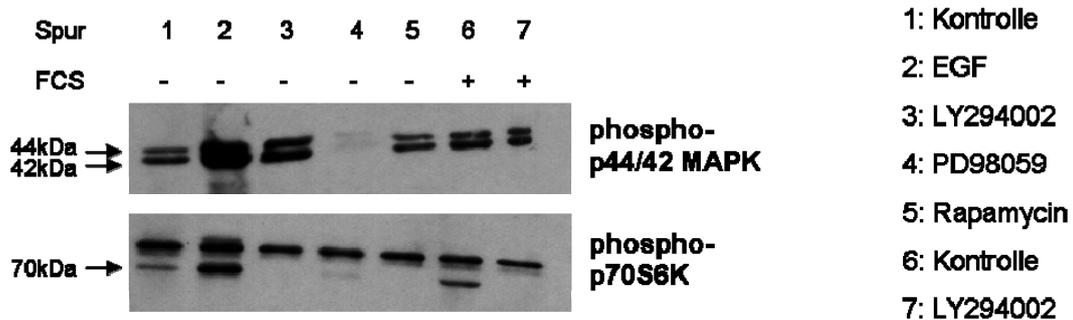


Abb. 5.9: Nachweis von phospho-p44/42 MAPK und phospho-p70S6K in der primären Zellkultur aus dem Glioblastom TUM G4.

Primäre Zellen aus dem Glioblastom TUM G4 wurden nach Serumentzug (FCS -) und ohne Serumentzug (FCS +) mit EGF, LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) oder PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor) inkubiert. 5µg Gesamtprotein aus den Zellysaten wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der phospho-p44/42 MAPK-Antikörper detektiert die an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierte p44/42 MAP-Kinase und der phospho-p70S6K-Antikörper die an Threonin 389 phosphorylierte p70S6-Kinase. Es zeigte sich, dass sowohl der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg als auch p44/42 MAPK konstitutiv aktiviert sind.

5.1.3.3 Aktivierungsstatus von PKB/Akt, p70S6K und p44/42 MAPK in der primären Zellkultur aus TUM G6

Bei der primären Zellkultur aus dem Astrozytom TUM G6 konnte nach 16h Serumentzug eine starke konstitutive Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase an Thr202/Tyr204 nachgewiesen werden. Diese konnte weder durch eine Stimulierung mit EGF noch durch eine Kultivierung mit Serum (10% FCS) beeinflusst werden (vgl. Abb. 5.10).

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg zeigte erst nach Stimulierung mit EGF oder mit 10% FCS eine Aktivierung (Abb. 5.10, Spur 2 bzw. 7). Unter serumfreien Bedingungen konnte weder eine Phosphorylierung von PKB/Akt an Ser473 noch von p70S6K an Thr389 beobachtet werden (Abb. 5.10, Spur 1).

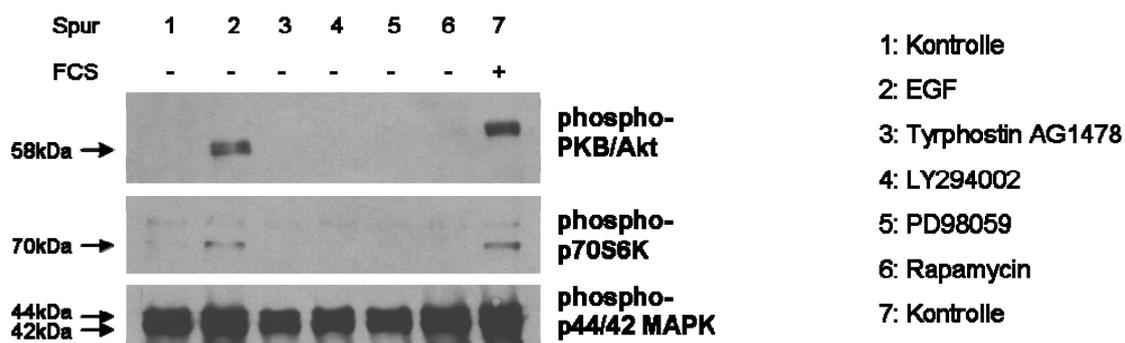


Abb. 5.10: Nachweis von phospho-PKB/Akt, phospho-p70S6K und phospho-p44/42 MAPK in der primären Zellkultur aus dem Glioblastom TUM G6.

Primäre Zellen aus dem Glioblastom TUM G6 wurden nach Serumentzug (FCS -) und ohne Serumentzug (FCS +) mit EGF, Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) oder PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor) inkubiert. 5µg Gesamtprotein aus den Zellysaten wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der phospho-PKB/Akt-Antikörper detektiert die an Serin 473 phosphorylierte Proteinkinase B(PKB)/Akt, der phospho-p70S6K-Antikörper die an Threonin 389 phosphorylierte p70S6-Kinase und der phospho-p44/42 MAPK-Antikörper die an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierte p44/42 MAP-Kinase. Es zeigte sich eine konstitutive Aktivierung von p44/42 MAPK.

5.2 Charakterisierung des Proliferationsverhaltens der Gliomzelllinien

Astrozytome des WHO-Grades IV (Glioblastome) zeichnen sich durch ein rasches Tumorstadium mit hoher Zellproliferation aus (Maher *et al.*, 2001). Das Proliferationsverhalten der etablierten Gliomzelllinien wurde ohne und unter Einfluss von EGF und den Inhibitoren Tyrphostin AG1478, LY294002, Rapamycin und PD98059 mittels einer Kristallviolett-Färbung ermittelt.

Die sechs untersuchten Zelllinien unterschieden sich teilweise stark in ihrem Proliferationsverhalten. So verfügte LN18 vergleichsweise über eine sehr hohe und G147 über eine niedrige Proliferationskapazität (vgl. Tab. 5.1 und Abb. 5.11).

Tab. 5.1: Proliferation der Gliomzelllinien.

	G139	G109	G147	LN18	LN229	LNZ308
Absorption	1,120	0,653	0,336	1,527	0,709	0,834

Angegeben sind die Absorptionswerte der Gliomzelllinien nach Zellwachstumsbestimmung mittels Kristallviolett-Färbung.

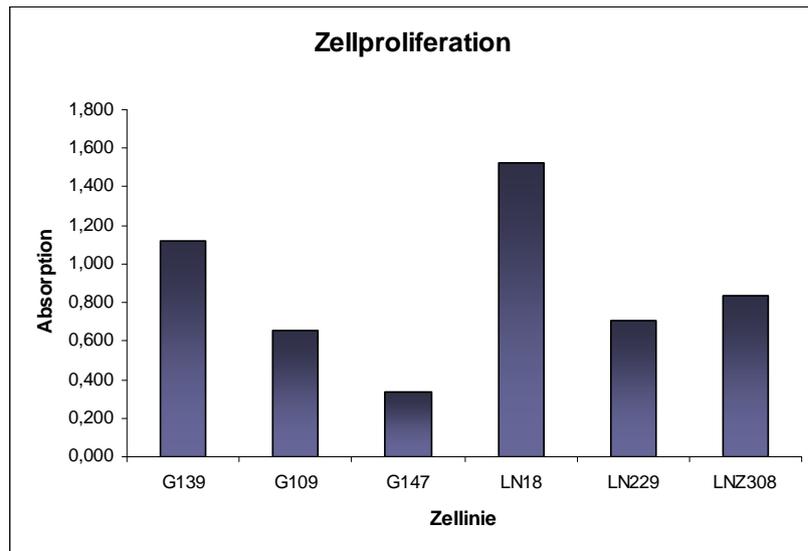


Abb. 5.11: Proliferationskapazität der Gliomzelllinien.

Die Proliferation von humanen Gliomzelllinien wurde mittels Zellwachstumsbestimmung untersucht. Nach Kristallviolett-Färbung wurden die Zellen lysiert und die Absorption in einem ELISA Lesegerät gemessen. Es zeigte sich, dass LN18 über eine vergleichsweise hohe und G147 über eine geringe Proliferationskapazität verfügte.

5.2.1 EGF hat keinen Einfluss auf die Proliferation der Gliomzelllinien

EGF hatte keinen steigernden Effekt auf die Zellproliferation der Gliomzelllinien. Bei den Zelllinien LN18 und LN229 führte es sogar zu einem gegenteiligen Effekt, die Proliferation nahm im Vergleich zur Kontrolle um mehr als 30% ab (Abb. 5.12).

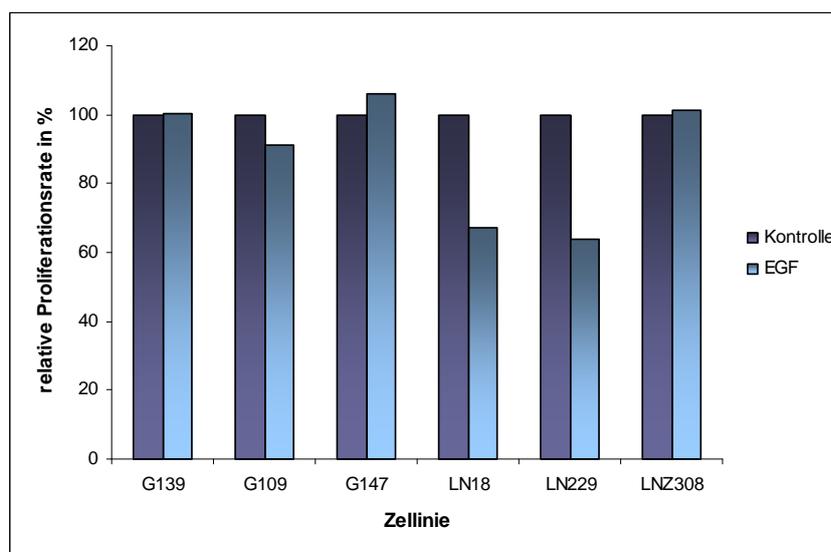


Abb. 5.12: Einfluss von EGF auf das Proliferationsverhalten in den Gliomzelllinien.

(Fortsetzung folgende Seite).

Abb. 5.12: Einfluss von EGF auf das Proliferationsverhalten in den Gliomzelllinien. (Fortsetzung).

Humane Gliomzelllinien wurden mittels Zellwachstumsbestimmung nach EGF-Inkubation auf ihre Proliferationskapazität untersucht. Nach Kristallviolett-Färbung wurden die Zellen lysiert und die Absorption in einem ELISA Lesegerät gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden auf die Kontrolle bezogen und in die relative Proliferationsrate (in %) übersetzt. Es zeigte sich, dass mit Ausnahme von LN18 und LN229 EGF keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen hat.

5.2.2 Die Blockade der PI3-Kinase führt zu einer Reduzierung der Proliferation in den etablierten humanen Gliomzelllinien

Die Bedeutung des EGF-Rezeptors sowie des PI3-Kinase/Akt- und des p44/42 MAP-Kinase-Signalwegs auf die Proliferation wurde durch Einsatz spezifischer, chemischer Inhibitoren untersucht. Alle eingesetzten Inhibitoren konnten in unterschiedlich ausgeprägtem Maße die Proliferation der Zelllinien verringern. Tab. 5.2 und Abb. 5.13 zeigen die relative Abnahme der Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle. Mit Ausnahme von G147 konnte jedoch in allen Zelllinien die Proliferation am effizientesten durch eine Blockade der PI3-Kinase mit LY294002 reduziert werden. Bei G147 konnte die Proliferation durch Hemmung des EGF-Rezeptors mit Tyrphostin AG1478 am wirksamsten reduziert werden.

Tab. 5.2: Proliferation von Gliomzellen nach Blockade der Signalwege.

	Kontrolle	PD98059	Tyrphostin AG1478	LY294002	Rapamycin
G139	100,0%	70,6%	75,6%	14,1%	44,7%
G109	100,0%	50,0%	53,4%	35,1%	78,0%
G147	100,0%	49,8%	10,7%	36,7%	52,7%
LN18	100,0%	80,3%	88,9%	13,7%	41,9%
LN229	100,0%	70,1%	52,0%	25,1%	54,6%
LNZ308	100,0%	56,0%	72,8%	26,0%	32,2%

Angegeben ist die relative Proliferationsrate der Gliomzelllinien ohne und unter Einfluss von PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor). Für die Zellwachstumsbestimmung wurden die Zellen nach Kristallviolett-Färbung lysiert und ihre Absorption in einem ELISA Lesegerät gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden auf die Kontrolle bezogen und in die relative Proliferationsrate (in %) übersetzt.

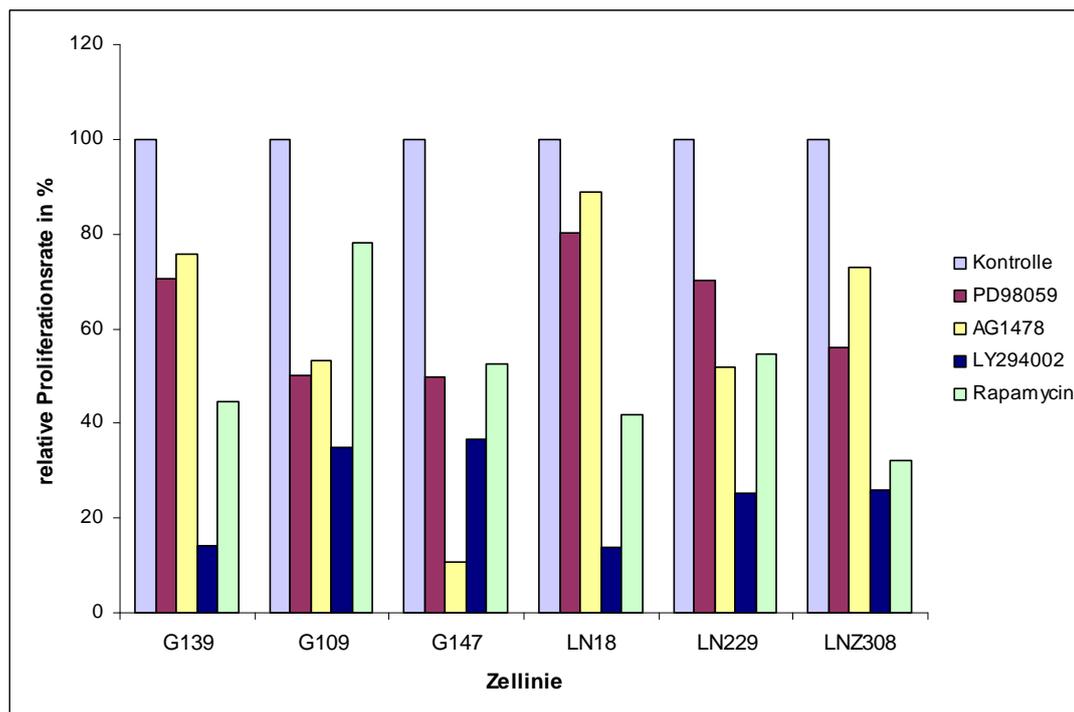


Abb. 5.13: Einfluss der Blockade der p44/42 MAP-Kinase, des EGF-Rezeptors, der PI3-Kinase und von mTOR auf das Proliferationsverhalten von humanen Gliomzelllinien.

Humane Gliomzelllinien wurden ohne und unter Einfluss von PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) mittels Zellwachstumsbestimmung auf ihre Proliferationskapazität untersucht. Nach Kristallviolett-färbung wurden die Zellen lysiert und die Absorption in einem ELISA Lesegerät gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden auf die Kontrolle bezogen und in die relative Proliferationsrate (in %) übersetzt. Es zeigte sich, dass in allen Zelllinien die Proliferation am effizientesten durch eine Blockade der PI3-Kinase reduziert werden konnte (dunkelblauer Balken). Für G147 erwies sich die Hemmung des EGF-Rezeptors als ebenso erfolgreich (gelber Balken).

5.3 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens der Gliomzelllinien

Das Adhäsionsverhalten einer Zelle nimmt maßgeblich Einfluss auf den kontinuierlichen Vorgang der Migration (Friedl und Wolf, 2003; Lauffenburger und Horwitz, 1996). So gelingt es der Zelle aufgrund von steten Adhäsionsprozessen an ihrem vorderen Ende („leading edge“) und dem Kontaktverlust zur Matrix an ihrem hinteren Ende („trailing edge“) auf einem Substrat entlangzugleiten (Lauffenburger und Horwitz, 1996).

In Adhäsionsversuchen wurde deshalb die Fähigkeit der sechs etablierten humanen Gliomzelllinien untersucht, ohne und unter Einfluss von EGF und den Inhibitoren Tyrphostin AG1478, LY294002, Rapamycin und PD98059 an bestimmte Substrate zu adhären. Die Zellen wurden

hierfür auf unbeschichtete Zellkulturschalen ausgesät sowie auf Schalen, die mit Collagen I oder einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (ECM, „Matrigel“) beschichtet waren.

Es zeigte sich für G139, LN18, LN229 und LN308 kein Unterschied im Adhäsionsverhalten zwischen unbeschichteten und mit Collagen I beschichteten Schalen (Tab. 5.3 und Abb. 5.14). Für G109 und G147 wurde eine bis um mehr als die Hälfte geringere Adhäsionsrate gemessen (Tab. 5.3 und Abb. 5.14).

Die Beschichtung der Zellkulturschälchen mit ECM konnte nicht ausgewertet werden, da sich der zur Zellquantifizierung eingesetzte Farbstoff Kristallviolett auch an das ECM-Substrat lagerte. Eine spezifische Messung der adhärirten Zellen war deshalb nicht mehr möglich (Daten nicht gezeigt).

Tab. 5.3: Adhäsion der Gliomzelllinien.

	G139	G109	G147	LN18	LN229	LNZ308
unbeschichtetes Substrat	0,065	0,026	0,034	0,059	0,058	0,067
Collagen I-Beschichtung	0,067	0,030	0,029	0,069	0,076	0,076

Angegeben sind die Absorptionwerte der Gliomzelllinien nach Zellquantifizierung mittels Kristallviolettffärbung. Im Adhäsionsversuch wurde die Fähigkeit der Gliomzelllinien untersucht auf einem unbeschichteten Substrat und auf einer Collagen I-Beschichtung zu adhäririeren.

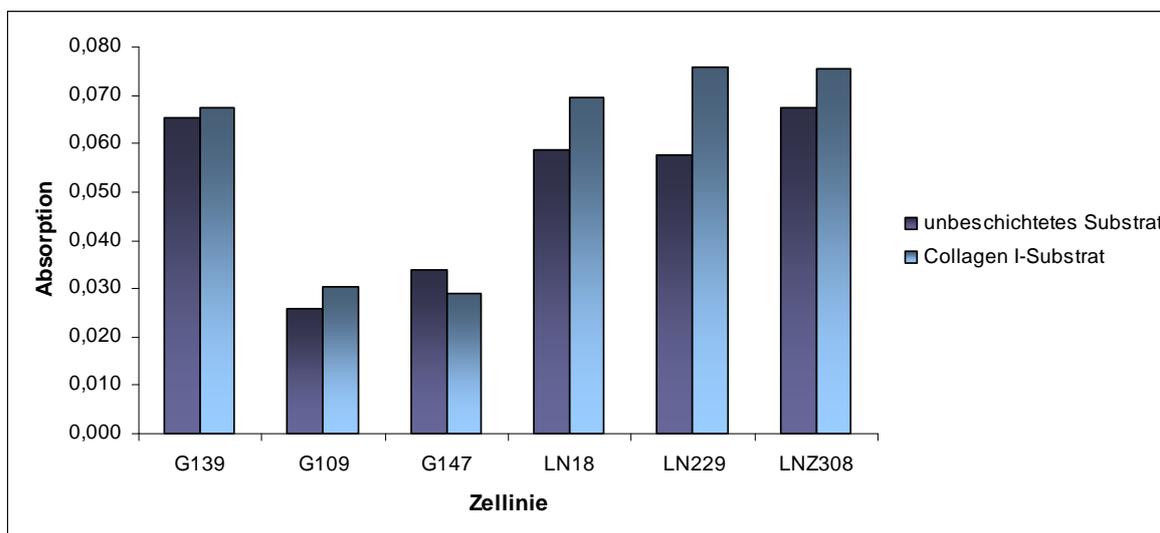


Abb. 5.14: Einfluss des Substrats auf die Adhäsion von Gliomzellen.

Humane Gliomzelllinien wurden auf ihre Adhäsionsfähigkeit an ein unbeschichtetes und ein Collagen I-Substrat untersucht. 1h nach Aussaat wurde eine Kristallviolettffärbung zur Zellquantifizierung durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert und die Absorption in einem ELISA Lesegerät gemessen. Es zeigte sich, dass eine Beschichtung mit Collagen I zu einer Zunahme adhärirter Zellen führte.

5.3.1 Collagen I steigert die Adhäsionsrate der Gliomzelllinien

Die Collagen I-Beschichtung steigerte bei allen Zelllinien außer bei G147 die Adhärenzrate (Abb. 5.14). Für LN229 zeigte sich eine Zunahme um 32,0%, für LN18 um 18,3%, für G109 um 17,5%, für LN2308 um 12,2% und für G139 um 3,5%. Bei G147 adhärten 14,4% weniger Zellen an Collagen I als an das unbeschichtete Substrat.

Eine Zunahme adhärterter Zellen auf Collagen I konnte ebenfalls bei den Behandlungen mit EGF und den Inhibitoren beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

5.3.2 Die Hemmung der PI3-Kinase verringert die Adhäsionsrate der Gliomzelllinien

Die Inhibitoren und der Aktivator EGF veränderten das Adhäsionsverhalten der Gliomzelllinien in unterschiedlichem Maße. Wurden die Zellen nach 24stündiger Inkubation mit den Inhibitoren auf unbeschichtete Kulturschalen gegeben, so konnte, mit Ausnahme von LN18, für alle Inhibitoren eine verminderte Adhäsionsrate gemessen werden (vgl. Abb. 5.15). Der größte Effekt konnte dabei durch eine Blockade der PI3-Kinase mit LY294002 erzielt werden. Mit Ausnahme der Zelllinie LN18 konnte im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme adhärterter Zellen um 60% und mehr verzeichnet werden (vgl. Tab. 5.4 und Abb. 5.15). Eine vergleichbar starke Reduktion der Adhäsionsrate konnte nur bei G139 durch Blockade von mTOR mittels Rapamycin und durch Hemmung der p44/42 MAPK mittels PD98059 beobachtet werden. Die Inhibierung der p44/42 MAP-Kinase führte bei G109 und G147 ebenfalls zu einer Verminderung der relativen Adhäsionsrate um ca. die Hälfte (Tab. 5.4 und Abb. 5.15).

Tab. 5.4: Adhäsion von Gliomzellen an ein unbeschichtetes Substrat unter Einfluss von EGF und Inhibitoren.

	Kontrolle	EGF	PD98059	Tyrphostin AG1478	LY294002	Rapamycin
G139	100,0%	80,6%	33,7%	126,4%	28,1%	40,9%
G109	100,0%	52,6%	54,6%	90,4%	5,8%	71,5%
G147	100,0%	95,7%	52,7%	84,0%	41,1%	86,2%
LN18	100,0%	142,0%	209,0%	144,5%	86,8%	157,4%
LN229	100,0%	92,2%	72,9%	58,1%	16,2%	100,3%
LN2308	100,0%	87,5%	75,6%	87,2%	40,1%	69,4%

Angegeben ist die relative Adhäsionsrate der Gliomzelllinien an ein unbeschichtetes Substrat ohne und unter Einfluss von EGF, PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor). Für die Adhäsionsbestimmung wurden die Zellen nach Kristallviolett-Färbung lysiert und ihre Absorption in einem ELISA Lesegerät gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden auf die Kontrolle bezogen und in die relative Adhäsionsrate (in %) übersetzt.

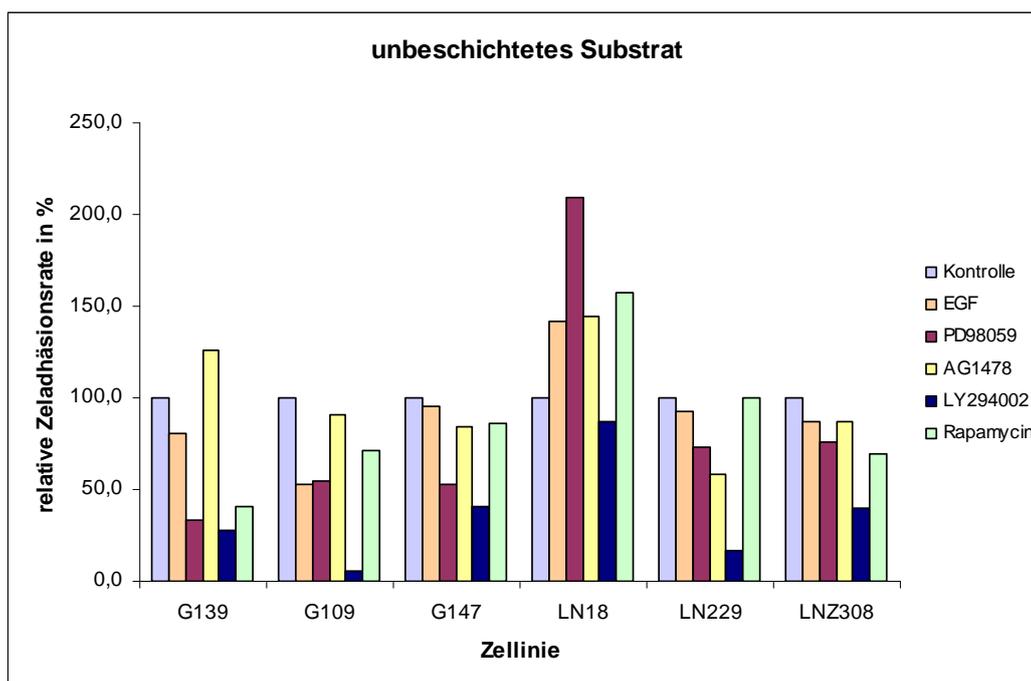


Abb. 5.15: Adhäsionsverhalten der Gliomzelllinien ohne und unter Einfluss von EGF und Inhibitoren auf einem unbeschichteten Substrat.

Humane Gliomzelllinien wurden ohne und unter Einfluss von EGF, PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) auf ihre Adhäsionsfähigkeit an ein unbeschichtetes Substrat untersucht. 1h nach Aussaat wurde eine Kristallviolett färbung zur Zellquantifizierung durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert und die Absorption in einem ELISA Lesegerät gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden auf die Kontrolle bezogen und in die relative Adhäsionsrate (in %) übersetzt. Es zeigte sich, dass die Adhäsion an ein unbeschichtetes Substrat sehr effizient durch die Blockade der PI3-Kinase (dunkelblauer Balken) verringert wurde.

Tab. 5.5: Adhäsion von Gliomzellen an ein Collagen I-Substrat unter Einfluss von EGF und Inhibitoren.

	Kontrolle	EGF	PD98059	Tyrphostin AG1478	LY294002	Rapamycin
G139	100,0%	80,9%	100,8%	125,6%	48,0%	112,1%
G109	100,0%	87,6%	76,1%	146,2%	30,9%	113,3%
G147	100,0%	132,8%	63,8%	84,0%	50,9%	140,4%
LN18	100,0%	124,8%	123,7%	121,3%	36,9%	92,4%
LN229	100,0%	108,9%	65,5%	78,7%	38,6%	100,5%
LN2308	100,0%	68,2%	70,6%	68,6%	40,3%	71,6%

Angegeben ist die relative Adhäsionsrate der Gliomzelllinien an ein Collagen I-Substrat ohne und unter Einfluss von EGF, PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor). Für die Adhäsionsbestimmung wurden die Zellen nach Kristallviolett färbung lysiert und ihre Absorption in einem ELISA Lesegerät gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden auf die Kontrolle bezogen und in die relative Adhäsionsrate (in %) übersetzt.

Auf einem Collagen I-Substrat zeigte sich bei allen Zelllinien, dass der Anteil adhärerter Zellen nach Blockade der PI3-Kinase (durch LY294002) stark reduziert werden konnte (vgl. Tab 5.5 und Abb. 5.16). Die relative Adhäsionsrate lag dabei zwischen 30,9% für G109 und 50,9% für G147. Keiner der anderen hier verwendeten Inhibitoren konnte vergleichbar effizient die Adhäsion der Gliomzelllinien senken.

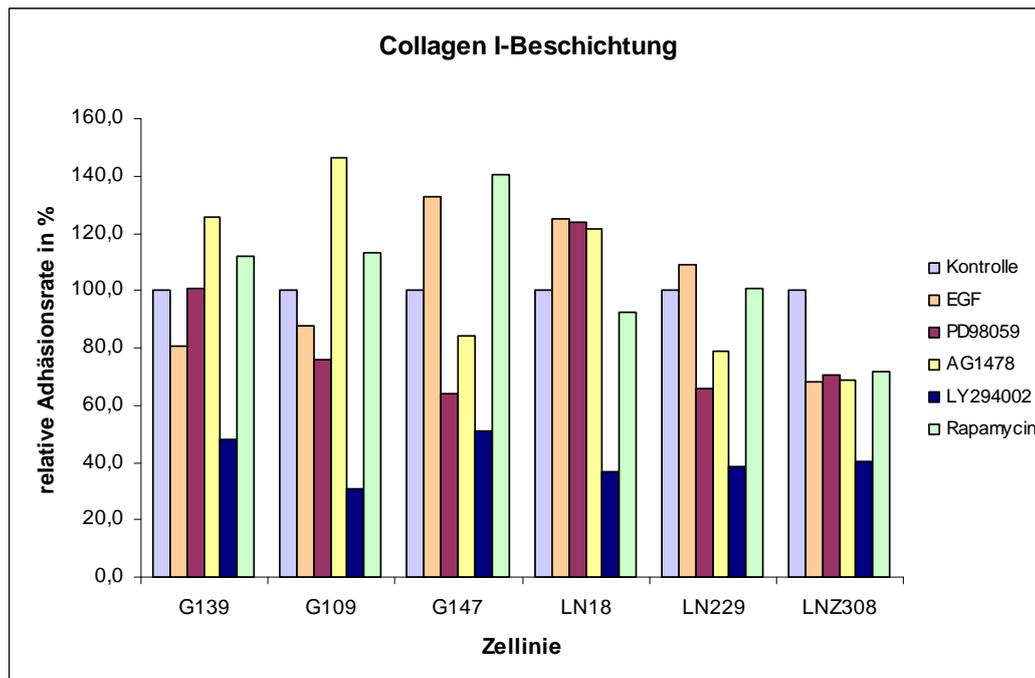


Abb. 5.16: Adhäsionsverhalten der Gliomzelllinien ohne und unter Einfluss von EGF und Inhibitoren auf einem Collagen I-Substrat.

Humane Gliomzelllinien wurden ohne und unter Einfluss von EGF, PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) auf ihre Adhäsionsfähigkeit an ein Collagen I-Substrat untersucht. 1h nach Aussaat wurde eine Kristallviolett-färbung zur Zellquantifizierung durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert und die Absorption in einem ELISA Lesegerät gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden auf die Kontrolle bezogen und in die relative Adhäsionsrate (in %) übersetzt. Es zeigte sich, dass die Adhäsion an ein Collagen I-Substrat sehr effizient durch die Blockade der PI3-Kinase (dunkelblauer Balken) verringert wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Potential der Inhibitoren die Adhäsionsrate zu senken beim unbeschichteten Substrat stärker ausgeprägt war als bei der Collagen I-Beschichtung (vgl. Abb. 5.15 bzw. Abb. 5.16).

5.4 Charakterisierung des Migrations- und Infiltrationsverhaltens der Gliomzelllinien

Ein großes klinisches Problem glialer Hirntumoren ist ihr ausgeprägtes infiltratives Wachstum in das umgebende gesunde Gehirngewebe (Maher *et al.*, 2001).

Deshalb wurde die Bedeutung des EGF-Rezeptor-, PI3-Kinase/Akt- und des MAPK-Signalwegs hinsichtlich des Migrations- und Infiltrationsverhalten der sechs humanen Gliomzelllinien mittels Wundheilungsversuchen, Echtzeitmikroskopie (Lebendzellbeobachtung) und Invasionsversuchen untersucht.

5.4.1 Wundheilungsversuch

In Wundheilungsversuchen wurde das Migrationsverhalten der Gliomzelllinien im zweidimensionalen Raum untersucht. Hierbei wurde die Fähigkeit von Zellen ermittelt einen künstlich zugefügten Spalt im Zellrasen durch Migration teilweise oder ganz zu schließen.

5.4.1.1 Migrationsfähigkeit der Zelllinien im Wundheilungsversuch

Alle Zelllinien zeigten die Fähigkeit durch Migration den Spalt im Zellrasen zu überwachsen. Dabei konnten zwei Zelllinien mit einem relativ hohen Anteil an migrierenden Zellen identifiziert werden: G109 mit 92,1% und LN229 mit 81,4%. Die übrigen Zelllinien zeigten eine ähnlich ausgeprägte Migrationskapazität zueinander mit einem Anteil zwischen 50,8% und 60,6% migrierender Zellen (vgl. Tab. 5.6).

Tab. 5.6: Migrationsrate von Gliomzellen im Wundheilungsversuch ohne und unter Einfluss von EGF.

	G139	G109	G147	LN18	LN229	LNZ308
Kontrolle	60,6%	92,1%	58,3%	59,6%	81,4%	50,8%
EGF	72,0%	105,4%	73,9%	85,8%	83,8%	73,7%

Angegeben ist der absolute Anteil migrierender Zellen im Wundheilungsversuch ohne und unter Einfluss von EGF.

5.4.1.2 EGF erhöht die Migrationsrate der Gliomzelllinien im Wundheilungsversuch

Die Einflussnahme des aktivierten EGF-Rezeptors auf das Migrationsverhalten der Gliomzelllinien wurde durch Zugabe von 100ng/ml EGF untersucht. In allen Zelllinien konnte dabei eine Zunahme der Migration beobachtet werden. Tab. 5.6 zeigt den absoluten Anteil an migrierenden Zellen.

Die größten Auswirkungen der EGF-Stimulation auf die Migration zeigten sich jedoch bei den Zelllinien LN18 und LN2308, die eine relative Zunahme des Anteils der migrierenden Zellen von 44,0% bzw. 45,1% aufwiesen (Abb. 5.17). Bei G147 steigerte sich die Migrationsrate im Vergleich zur Kontrolle um 26,7%, bei G139 um 18,8% und bei G109 um 14,4%. Bei LN229, die einzige der untersuchten Zelllinien mit normalem PKB/Akt-Status, zeigte die Aktivierung durch EGF kaum einen Effekt. Der Anteil der migrierenden Zellen nahm im Vergleich zur Kontrolle um 2,9% zu (Abb. 5.17).

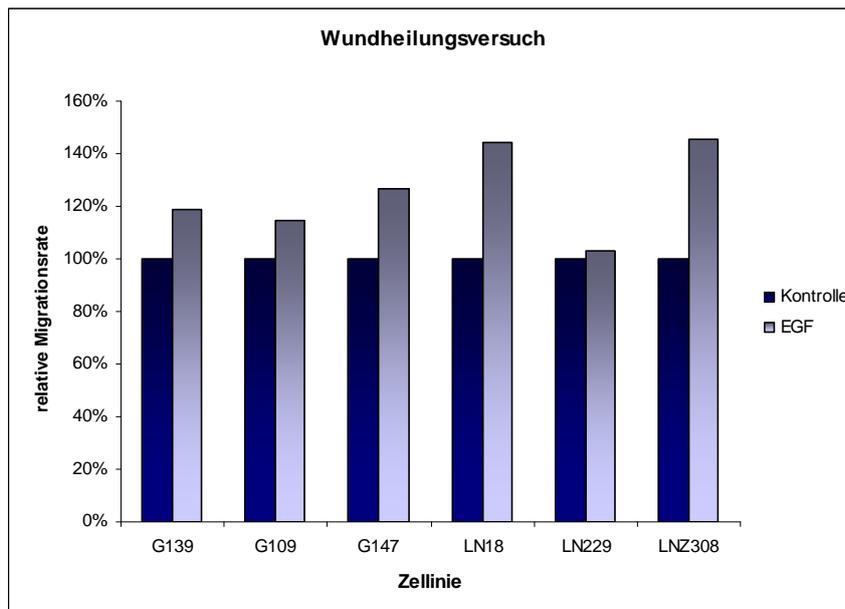


Abb. 5.17: Einfluss von EGF auf das Migrationsverhalten von Gliomzellen im Wundheilungsversuch.

Humane Gliomzelllinien wurden ohne oder mit EGF inkubiert und im Wundheilungsversuch auf ihr Migrationsverhalten untersucht. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit EGF zu einer erhöhten Migrationsrate führte. (Angegeben ist der relative Anteil migrierter Zellen aus den Mittelwerten von je 10 Gesichtsfeldern bezogen auf die Kontrolle).

5.4.1.3 Die Blockade der PI3-Kinase führt zu einer verminderten Migrationsrate der Gliomzelllinien im Wundheilungsversuch

Alle vier Inhibitoren (PD98059, Tyrphostin AG1478, LY294002 und Rapamycin) konnten im Wundheilungsversuch die Migrationsrate der sechs untersuchten Gliomzelllinien in unterschiedlichem Maße reduzieren. In Tab. 5.7 ist der absolute Anteil der migrierenden Zellen ohne und unter Einfluss der untersuchten Inhibitoren aufgelistet.

Tab. 5.7: Migrationsrate von Gliomzellen im Wundheilungsversuch ohne und unter Einfluss von Inhibitoren.

	Kontrolle	PD98059	Tyrphostin AG1478	LY294002	Rapamycin
G139	72,2%	48,4%	61,6%	32,0%	44,1%
G109	92,1%	51,2%	53,6%	27,4%	60,5%
G147	57,5%	40,4%	23,0%	24,4%	34,2%
LN18	77,7%	40,6%	24,4%	31,5%	33,2%
LN229	83,5%	51,3%	51,8%	26,2%	32,8%
LNZ308	66,7%	34,9%	41,2%	24,9%	32,8%

Angegeben ist der absolute Anteil migrierender Zellen im Wundheilungsversuch ohne und unter Einfluss von PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor).

Eine starke Reduktion der Migrationsrate konnte nach Behandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 hervorgerufen werden. In allen Zelllinien nahm hier im Vergleich zur Kontrolle der Anteil der migrierenden Zellen um mehr als die Hälfte ab, bei G109 und LN229 sank er sogar bis zu 70% (vgl. Tab. 5.8 und Abb. 5.18).

Eine Blockade mit Rapamycin des ebenfalls am PI3-Kinase-Signalweg beteiligten mTORs war ebenso sehr effizient. In allen Zelllinien wurde die Migrationsrate um mehr als ein Drittel gesenkt.

Die Inhibierung des EGF-Rezeptors durch Tyrphostin AG1478 hatte bis auf die Zelllinie G139, deren Migrationsverhalten nur unwesentlich verändert wurde, ebenfalls eine Verminderung des Anteils der migrierenden Zellen zur Folge. Im Vergleich zur Kontrolle sank die Migrationsrate um mehr als ein Drittel, wobei Tyrphostin AG1478 bei G147 und LN18 sogar noch effizienter war als LY294002. So konnte hier der relative Anteil der migrierenden Zellen auf 40,0% bzw. 31,4% reduziert werden (vgl. Tab. 5.8 und Abb. 5.18).

Der MAPK-Inhibitor PD98059 konnte in allen Linien ebenfalls den Anteil an migrierten Zellen verringern. Dieser Signalweg scheint jedoch keine so entscheidende Rolle wie PKB/Akt im Migrationsverhalten zu spielen.

Tab. 5.8: Relative Migrationsrate von Gliomzellen im Wundheilungsversuch ohne und unter Einfluss von Inhibitoren.

	Kontrolle	PD98059	Tyrphostin AG1478	LY294002	Rapamycin
G139	100,0%	67,0%	85,3%	44,2%	61,1%
G109	100,0%	55,6%	58,2%	29,8%	65,7%
G147	100,0%	70,2%	40,0%	42,5%	59,5%
LN18	100,0%	52,2%	31,4%	40,5%	42,7%
LN229	100,0%	61,4%	62,0%	31,3%	39,2%
LNZ308	100,0%	52,4%	61,8%	37,4%	49,2%

Angegeben ist die relative Migrationsrate der Gliomzelllinien im Wundheilungsversuch ohne und unter Einfluss von PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) bezogen auf die Kontrolle.

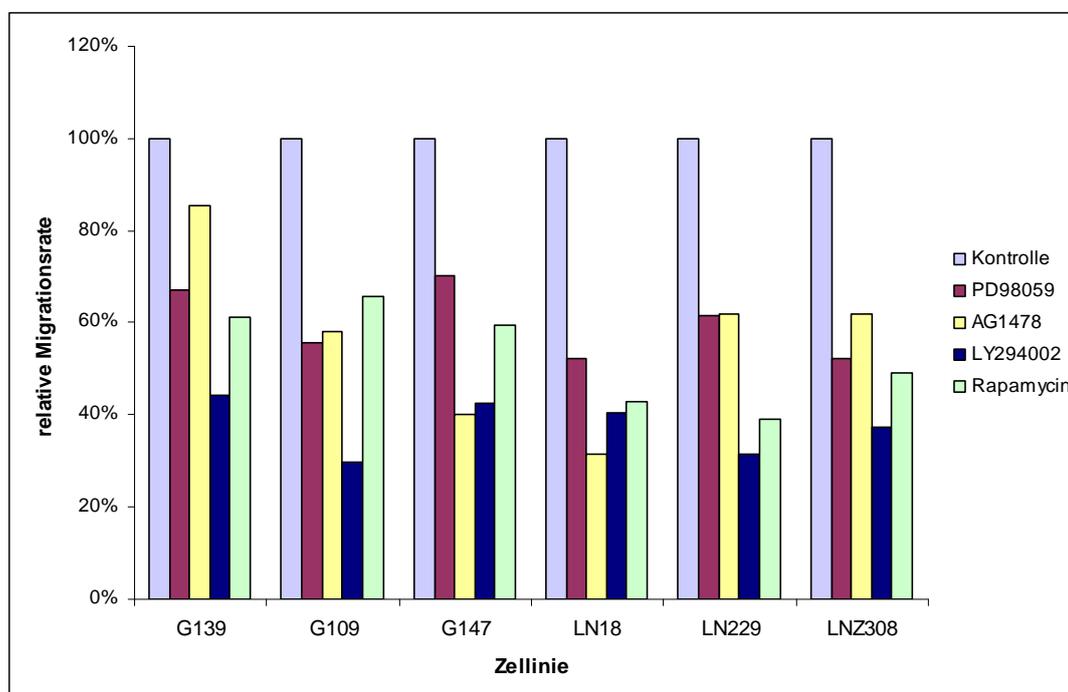


Abb. 5.18: Einfluss der Blockade der p44/42 MAP-Kinase, des EGF-Rezeptors, der PI3-Kinase und von mTOR auf das Migrationsverhalten von Gliomzellen im Wundheilungsversuch.

Humane Gliomzelllinien wurden im Wundheilungsversuch ohne oder unter Einfluss von PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (AG1478, EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) auf ihr Migrationsverhalten untersucht. Es zeigte sich, dass die Migration sehr effizient durch eine Blockade der PI3-Kinase (dunkelblauer Balken) verringert wurde. (Angegeben ist der relative Anteil migrierter Zellen aus den Mittelwerten von je 10 Gesichtsfeldern bezogen auf die Kontrolle).

Abb. 5.19 zeigt exemplarisch Mikroskopbilder von einem Wundheilungsversuch in der Zelllinie G139 nach Fixierung und Färbung der Zellen. Nach Inhibitoreinwirkung ist der ursprüngliche Zellspalt noch gut zu erkennen, am deutlichsten jedoch nach Behandlung mit LY294002

(Hemmung der PI3-Kinase) und Rapamycin (Blockade von mTOR). In der Kontrolle ist er hingegen fast vollständig überwachsen und die ehemaligen Grenzen zum Zellrasen sind nur noch schwer identifizierbar. Auf diesen Bildern ist aber deutlich zu erkennen, dass hier die Zelldichte größer ist als nach Behandlung mit beispielsweise Rapamycin und LY294002.

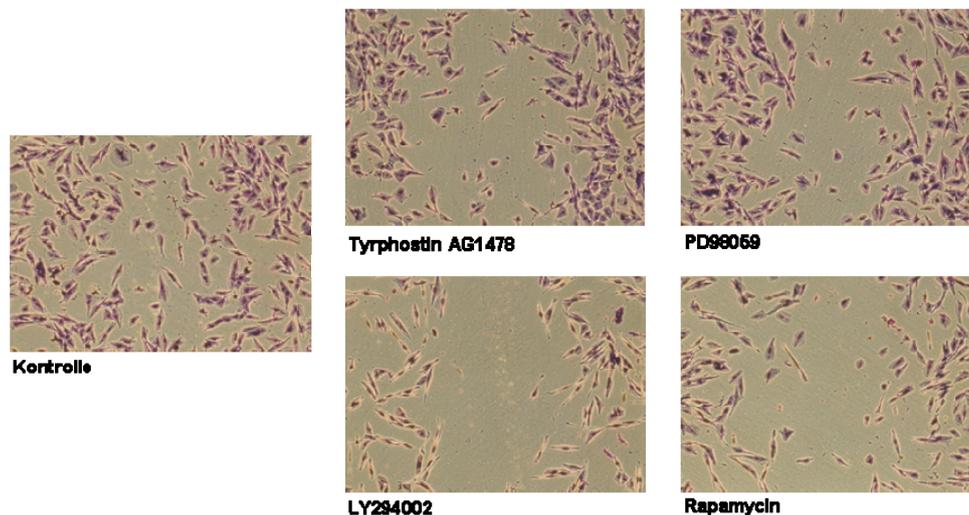


Abb. 5.19: Wundheilungsversuch in der Zelllinie G139.

Gezeigt sind exemplarisch Mikroskopbilder der humanen Gliomzelllinie G139 nach einem Wundheilungsversuch. G139 wurde hierzu ohne und unter Einfluss von Tyrphostin AG1478 (AG1478, EGFR-Inhibitor), PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) inkubiert. Die Auswertung des Migrationsversuchs erfolgte nach Fixierung und Färbung mit Diff-Quik[®]. Es zeigte sich, dass in der Kontrolle der ursprüngliche Zellspace fast vollständig überwachsen war, wohingegen er nach Behandlung mit den Inhibitoren noch deutlich zu erkennen ist. Deutlich ist auch zu sehen, dass die Zelldichte bei LY294002 und Rapamycin geringer ist als bei der Kontrolle. Für diese beiden Inhibitoren wurde gleichfalls eine proliferationshemmende Wirkung festgestellt (Tab. 5.2 und Abb. 5.13). Eine höhere Migrationsrate für die Kontrolle könnte demnach auch dadurch zustande kommen, dass in den Zellspace migrierte Zellen weitere Zellteilungen durchlaufen. (Originalvergrößerung 200fach).

Übereinstimmend mit diesem Ergebnis konnte nach einer Kristallviolett-färbung zur Zellquantifizierung eine proliferationshemmende Wirkung dieser Inhibitoren festgestellt werden (vgl. Tab. 5.3 und Abb. 5.13). Eine höhere Migrationsrate könnte demnach auch dadurch zustande kommen, dass Zellen nach Migration in den Zellspace hinein weitere Zellteilungen durchlaufen, und zwar in Abhängigkeit der proliferationshemmenden Kapazität der gewählten Inhibitoren. Aufgrund dieser möglichen Unzulänglichkeit des Testsystems wurden zusätzlich Motilitätsversuche mittels Echtzeitmikroskopie durchgeführt.

5.4.2 Motilitätsversuche mittels Echtzeitmikroskopie (Lebendzellbeobachtung)

Um die Motilitätsrate der sechs etablierten Gliomzelllinien zuverlässig zu quantifizieren wurde mittels Echtzeitmikroskopie die Fähigkeit der Zelllinien untersucht innerhalb von 8h ihre ursprüngliche Adhärenzstelle vollständig zu verlassen. Die Zellen wurden hierzu über Nacht in einer Inkubationskammer, die an ein konfokales Laserscanningmikroskop (LSM) angeschlossen war, unter Standardzellkulturbedingungen gehalten. Die automatische Aufnahme von Phasenkontrastbildern ergab so einen Zeitrafferfilm über den Zeitraum von 8h. Die Auswertung der Motilitätsstudien erfolgte anschließend mit dem Zeichenprogramm der LSM-Software von Zeiss. Es wurden zwei verschiedene Parameter bestimmt: Zellmotilität und zurückgelegte Wegstrecken, bzw. Zellgeschwindigkeit.

5.4.2.1 Bestimmung der Versuchsbedingungen für die Echtzeitmikroskopie

In Etablierungsexperimenten wurden die Bedingungen für die Durchführung der Motilitätsversuche mittels Echtzeitmikroskopie festgelegt. Es wurde zum einen getestet, ob unterschiedliche Matrices Auswirkungen auf das Motilitätsverhalten hatten, indem die verwendeten Zellkulturschälchen mit poly D-Lysin, einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (ECM, „Matrigel“) oder mit Collagen I beschichtet wurden. Zum anderen wurde untersucht, ob die Dauer der Adhärenz der Zellen an ihre Matrix eine Rolle spielte. Dazu wurden Zellen untersucht, deren Aussaat 3h, 24h oder 48h vor Beginn der Echtzeitmikroskopie erfolgt war.

Aufgrund ihres Migrationsverhaltens in den Wundheilungsversuchen wurden diese Untersuchungen an den beiden Zelllinien G109 und G139 durchgeführt. G109 sollte dabei für die Zelllinie mit dem höchsten Anteil an migrierenden Zellen und G139 als Vertreter für Zelllinien mit einem durchschnittlichen Migrationsverhalten stehen (vgl. Tab. 5.6).

Für beide Zelllinien konnte dabei in der Lebendzellbeobachtung mittels Echtzeitmikroskopie mit zunehmender Adhärenzdauer der Zellen an ihr Substrat ein deutlich vermindertes Motilitätsverhalten beobachtet werden (vgl. Abb. 5.20). G109 zeigte dabei sowohl auf poly D-Lysin- als auch auf Collagen I-Beschichtung eine Abnahme ihres Anteils an motilen Zellen, je länger die Zellen vor Versuchsbeginn ausgesät worden waren (Abb. 5.20 A). In den Motilitätsexperimenten wurden deshalb die Zellen etwa 3h vor Beginn der Echtzeitmikroskopie ausgesät.

Auch die Beschichtung der Glasbodeneinsätze, auf der die Zellen ausgesät worden waren, hatte Einfluss auf das Motilitätsverhalten. So zeigte sich für die Zelllinie G109, dass der Prozentsatz motiler Zellen auf Collagen I um etwa zwei Drittel höher lag als auf einer poly D-Lysin-Beschichtung (Abb. 5.20 A). G139 zeigte auf Collagen I ein gering erhöhtes Motilitätsverhalten

im Vergleich zu einer Matrix aus ECM (Abb. 5.20 C). Für die Motilitätsversuche wurde deshalb als Substrat Collagen I gewählt.

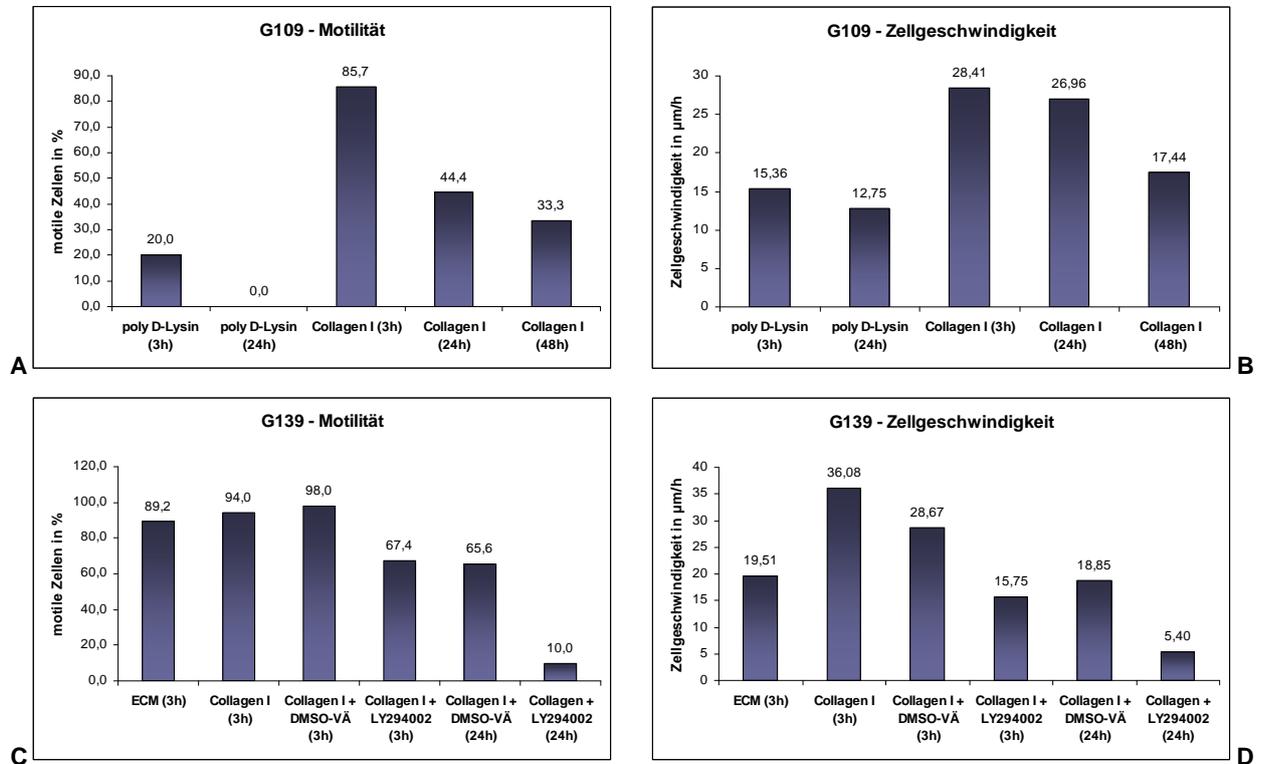


Abb. 5.20: Einfluss der Beschichtung und des Substrats auf die Motilität von G109 und G139.

A und **B**: Prozentualer Anteil motiler Zellen (**A**) sowie die individuelle Zellgeschwindigkeit dieser Zellen (**B**) in Abhängigkeit einer Beschichtung mit poly D-Lysin oder Collagen I und in Abhängigkeit der Adhärenzdauer an das jeweilige Substrat (d.h. vor Beginn der Echtzeitmikroskopie) in der Zelllinie G109.

C und **D**: Prozentualer Anteil motiler Zellen (**C**) sowie die individuelle Zellgeschwindigkeit dieser Zellen (**D**) in Abhängigkeit einer Beschichtung mit ECM („Matrigel“) oder Collagen I und in Abhängigkeit der Adhärenzdauer an das jeweilige Substrat (d.h. vor Beginn der Echtzeitmikroskopie) in der Zelllinie G139.

Es zeigte sich, dass die Motilitätsrate von G109 auf Collagen I um mehr als 65% höher war als auf einer poly D-Lysin-Beschichtung (**A**, **B**). Bei G139 führte die Verwendung von Collagen I im Vergleich zu einer Beschichtung mit ECM ebenfalls zu einer erhöhten Motilität (**C**, **D**). Eine zunehmende Adhärenzdauer der Zellen an ihr Substrat hatte eine verminderte Motilitätsrate zur Folge. DMSO, die Substanz, in der die in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren gelöst waren, steigerte hingegen die Motilität.

[Abkürzungen: ECM, *Extracellular Matrix Basement Membrane* (rekonstituierte extrazelluläre Matrix, „Matrigel“); DMSO-VÄ, Dimethylsulfoxid-Volumenäquivalent (zu 50µM LY294002)].

Ein weiterer zu untersuchender Faktor war der Einfluss von DMSO (Dimethylsulfoxid), in dem die zu untersuchenden Signalwegsinhibitoren gelöst vorlagen. Für G139 konnte dabei im Vergleich zu unbehandelten Proben eine geringe Zunahme an motilen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5.20 C). Aus diesem Grund wurde das Volumenäquivalent von DMSO zu LY294002 als Kontrolle eingesetzt, wenn der Einfluss der Blockade bestimmter Signalwege auf das Motilitätsverhalten untersucht werden sollte.

Für die Motilitätsbestimmung wurde als ein weiterer Parameter die individuelle Zellgeschwindigkeit untersucht. Die dabei im Beobachtungszeitraum zurückgelegte Strecke korrespondierte mit der Motilitätsrate. Eine Abnahme der Motilitätsrate ging demnach auch mit einer Abnahme der Zellgeschwindigkeit einher. Für G139 zeigte sich, dass bei kaum unterschiedlicher Motilitätsrate auf ECM und Collagen I mit 89,2% bzw. 94,0% motilen Zellen (Abb. 5.20 C) eine Beschichtung mit Collagen I zu einer fast doppelt so hohen individuellen Zellgeschwindigkeit im Vergleich zum ECM-Substrat führte (Abb. 5.20 D).

5.4.2.2 Motilitätsbestimmung mittels Lebendzellbeobachtung in den Gliomzelllinien

In Motilitätsversuchen wurde mittels Echtzeitmikroskopie die Fähigkeit der sechs humanen Gliomzelllinien untersucht innerhalb von 8h ihre ursprüngliche Adhärenzstelle vollständig zu verlassen. Dabei konnte G139 mit einem Anteil von 93,1% motilen Zellen als die Zelllinie mit der höchsten Motilitätsrate identifiziert werden (vgl. Abb. 5.21). LN18 und G109 wiesen im Vergleich mit etwa 71,7% bzw. 66,7% eine ebenfalls hohe Motilität auf. Interessanterweise hatte LN229 als Zelllinie mit nicht konstitutiv aktiviertem PKB/Akt-Signalweg einen vergleichsweise geringen Anteil an motilen Zellen (14,4%). Die im Beobachtungszeitraum zurückgelegten Strecken der Zellen korrespondierten mit dem Ausmaß ihrer Motilität. Allgemein konnte eine breite Varianz in der Motilitätsrate festgestellt werden, welche sich beim prozentualen Anteil motiler Zellen von 5,0% bis 93,0% erstreckte (Abb. 5.21 A) und individuelle Zellgeschwindigkeiten zwischen 4,51µm/h und 38,46µm/h erreicht wurden (Abb. 5.21 B).

Bei den drei hochmotilen Zelllinien (G109, G139 und LN18) zeigte sich ein großes Ausmaß von gerichteter Migration einzelner Zellen, d.h. die Zellen hatten hier die Fähigkeit sich zu polarisieren und durch Ausbildung von Lamellipodien ein vorderes Ende am Zellkörper („leading edge“) zu formen. Die Fähigkeit zur Polarisierung war bei den geringer motilen Zelllinien G147, LN229 und LN308 weniger ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

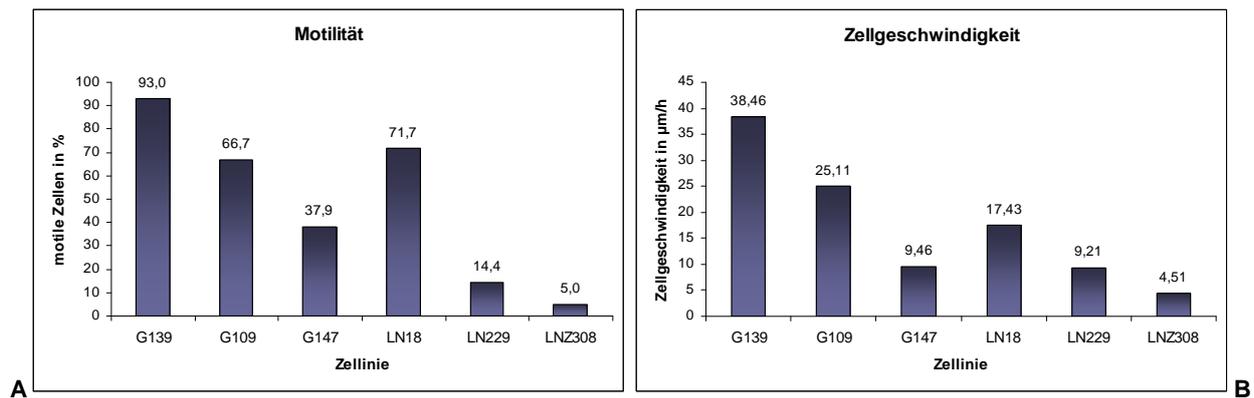


Abb. 5.21: Bestimmung der Motilitätsrate von Gliomzellen mittels Lebendzellbeobachtung.

Das Motilitätsverhalten von humanen Gliomzelllinien wurde mittels Lebendzellbeobachtung nach Echtzeitmikroskopie bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte des Anteils motiler Zellen (**A**) und der individuellen Zellgeschwindigkeit (**B**) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Es zeigte sich ein großer Dynamikumumfang in der Motilitätsrate, die sich von 5,0% und 93,0% erstreckte (**A**). Die zurückgelegte Strecke bzw. individuelle Zellgeschwindigkeit korrespondierte mit dem Anteil motiler Zellen (**B**).

5.4.2.3 Die Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs führt zu einer verminderten Motilitätsrate

In den Wundheilungsversuchen hatte sich die Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs als sehr effizient erwiesen (vgl. Abb. 5.18), so dass dies mittels Echtzeitmikroskopie in der Zelllinie G139 ebenfalls untersucht wurde.

Der PI3-Kinase Inhibitor LY294002 konnte dabei den Anteil der motilen Zellen um mehr als 21% und die individuelle Zellgeschwindigkeit um fast die Hälfte reduzieren. Im Vergleich dazu zeigte der mTOR-Inhibitor Rapamycin bei gleicher Inkubationsdauer einen nur geringen Einfluss auf das Motilitätsverhalten. Erst nach einer zusätzlichen vorherigen 24-stündigen Behandlung konnte eine vergleichbare Reduzierung motiler Zellen beobachtet werden (Abb. 5.22).

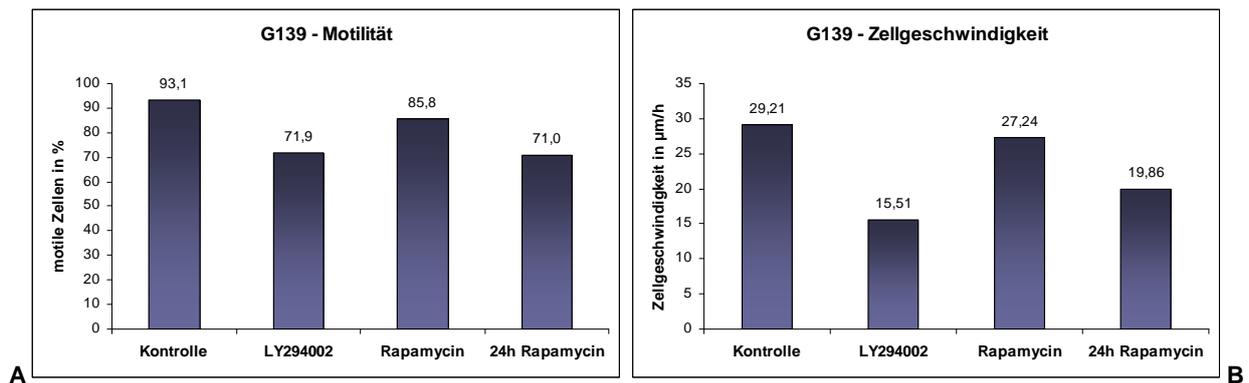


Abb. 5.22: Einfluss der Blockade des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in G139.

Der Einfluss von LY294002 (PI3K-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) auf das Motilitätsverhalten wurde in der humanen Gliomzelllinie G139 mittels Lebendzellbeobachtung untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte des Anteils motiler Zellen (**A**) und der individuellen Zellgeschwindigkeit (**B**) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Es zeigte sich, dass die Blockade der PI3-Kinase eine verminderte Motilität zur Folge hatte. Eine vergleichbar effiziente Blockade von mTOR konnte erst nach einer 24h Inkubation erlangt werden.

5.4.2.4 EGF erhöht die Motilitätsrate

Der Einfluss eines aktivierten EGF-Rezeptors auf die Motilität von LN18 und LN229 wurde durch Zugabe von 100ng/ml EGF untersucht (Abb. 5.23). Dabei konnte bei LN229, einer Zelllinie mit normalem PI3-Kinase/Akt-Status und geringem EGF-Rezeptorstatus, durch die Inkubation mit EGF der Anteil an motilen Zellen um mehr als Dreifache von 14,4% auf 50,9% erhöht werden (Abb. 5.23 A), wobei die individuelle Zellgeschwindigkeit um fast ein Drittel zunahm (Abb. 5.23 B). Bei LN18, einer Zelllinie mit konstitutiv aktiviertem PI3-Kinase/Akt-Signalweg und hohem EGF-Rezeptorstatus, führte diese Behandlung zu einer Zunahme motiler Zellen um etwa 20% (Abb. 5.23 C). Die individuelle Zellgeschwindigkeit wurde fast verdoppelt (Abb. 5.23 D).

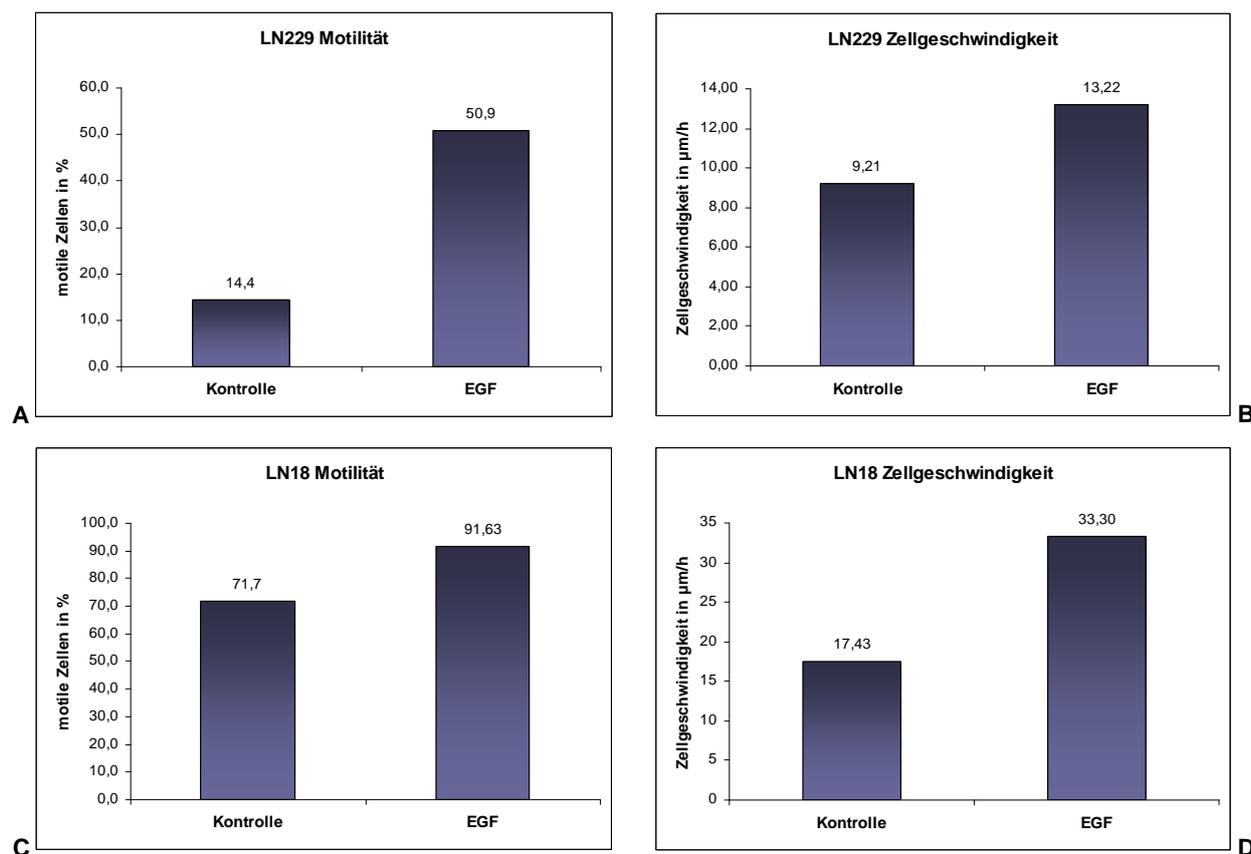


Abb. 5.23: Steigerung der Motilität von Gliomzellen durch EGF.

Die humanen Gliomzelllinien LN229 (A, B) und LN18 (C, D) wurden ohne und unter Einfluss von EGF mittels Le-bendzellbeobachtung auf ihr Motilitätsverhalten untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte des Anteils motiler Zellen (A, C) und der individuellen Zellgeschwindigkeit (B, D) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Es zeigt sich, dass in beiden Zelllinien die Stimulation mit EGF zu einer erhöhten Motilität führte.

5.4.3 Migrations- und Invasionsverhalten im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)

Die Art des Versuchsaufbaus von Migrationsuntersuchungen hat entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse (Friedl und Wolf, 2003), so dass das Migrations- und Invasionsverhalten der sechs etablierten Gliomzelllinien auch im dreidimensionalen Raum untersucht wurde. Hierzu wurde ein Zellkultursystem mit zwei durch eine poröse Membran getrennten Kammern („modifizierte Boydenkammer“) verwendet (Albini *et al.*, 1987). Das Migrationsverhalten der Zelllinien wurde dabei auf unbeschichteten Filtern, das Invasionsverhalten hingegen auf Membranen, die mit einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (ECM, „Matrigel“) beschichtet worden waren, untersucht. Die extrazelluläre Matrix diente dabei als natürliche Barriere, die die Zellen zu

überwinden hatten um über die Membranporen auf die Unterseite der Filter zu gelangen. Die Migrations- und Invasionsrate wurde anschließend mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und semiautomatischer quantitativer Bildanalyse gemessen.

Die Bedeutung des EGF-Rezeptors, des PI3-Kinase-/Akt- und des MAPK-Signalwegs hinsichtlich des Migrations- und Invasionsverhaltens im dreidimensionalen Raum wurde durch die Hemmung mit den spezifischen, chemischen Inhibitoren Tyrphostin AG1478, LY294002, Rapamycin und PD98059 untersucht.

5.4.3.1 Migrationsverhalten der Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)

Alle Gliomzelllinien zeigten im dreidimensionalen Raum die Fähigkeit zur Migration (Tab. 5.). Der Anteil migrierender Zellen erstreckte sich dabei von 29,9% für G109 bis zu 49,7% für G147 (Tab. 5.9).

Tab. 5.9: Absolute Migrationsrate von Gliomzellen in der modifizierten Boydenkammer ohne und unter Einfluss von EGF.

	G139	G109	G147	LN18	LN229	LNZ308
Kontrolle	47,1%	29,9%	49,7%	36,7%	34,3%	38,7%
EGF	65,1%	48,5%	49,4%	42,4%	48,7%	44,0%

Angegeben ist der absolute prozentuale Anteil migrierter Zellen im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“) ohne und unter Einfluss von EGF.

5.4.3.1.1 EGF erhöht die Migrationsrate von Gliomzellen im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)

Durch die Gabe von EGF konnte mit Ausnahme von G147 in allen Zelllinien eine Erhöhung der Migrationsrate festgestellt werden. G109 und LN229, beides Zelllinien mit einem niedrigen EGF-Rezeptorstatus (vgl. Abb. 5.1), wiesen dabei im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme an migrierenden Zellen um 62,1% bzw. 41,8% auf (vgl. Tab. 5.10 und Abb. 5.24). LN18 und LNZ308, beides Zelllinien mit starker EGF-Rezeptor-Expression, zeigten im Vergleich dazu eine relativ geringe Zunahme um 15,4% bzw. 13,7%.

Tab. 5.10: Relative Migrationsrate von Gliomzellen in der modifizierten Boydenkammer ohne und unter Einfluss von EGF.

	G139	G109	G147	LN18	LN229	LNZ308
Kontrolle	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
EGF	138,1%	162,1%	99,4%	115,4%	141,8%	113,7%

Angegeben ist der relative prozentuale Anteil an migrierenden Zellen im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“) ohne und unter Einfluss von EGF bezogen auf die Kontrolle.

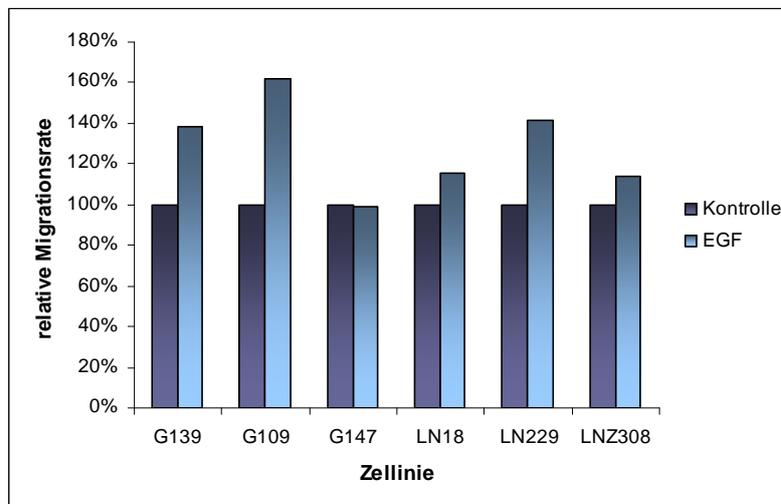


Abb. 5.24: Einfluss von EGF auf das Migrationsverhalten von humanen Gliomzellen in der modifizierten Boydenkammer.

Humane Gliomzelllinien wurden ohne oder mit EGF in der modifizierten Boydenkammer inkubiert und mit unbeschichteten Filtern auf ihr Migrationsverhalten untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie und quantitativer Bildanalyse. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit EGF außer bei G147 zu einer erhöhten Migrationsrate führte. (Angegeben ist der relative Anteil migrierter Zellen aus den Mittelwerten von je 10 Gesichtsfeldern bezogen auf die Kontrolle).

5.4.3.1.2 Die Blockade der Signalwege führt zu einer Verminderung der Migrationsrate im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)

Alle vier Inhibitoren konnten die Migrationsrate der sechs untersuchten Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum in unterschiedlichem Maße verringern. In Tab. 5.11 ist der absolute Anteil der migrierenden Zellen ohne und unter Einfluss der Inhibitoren dargestellt.

Tab. 5.11: Prozentualer Anteil migrierender Gliomzellen ohne und unter Einfluss von Inhibitoren in der modifizierten Boydenkammer.

	Kontrolle	PD98059	Tyrphostin AG1478	LY294002	Rapamycin
G139	47,1%	31,4%	35,7%	15,9%	20,8%
G109	29,9%	20,3%	6,9%	23,9%	21,6%
G147	49,7%	54,3%	1,3%	39,1%	38,2%
LN18	36,7%	34,4%	29,6%	31,9%	41,8%
LN229	34,3%	9,3%	1,5%	1,6%	8,3%
LNZ308	38,7%	24,7%	24,4%	21,4%	18,3%

Angegeben ist die absolute prozentuale Migrationsrate der Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“) ohne und unter Einfluss von PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor).

Eine sehr effektive Abnahme der Migrationsrate in der modifizierten Boydenkammer konnte bei den Zelllinien G109, G147 und LN229 durch die Blockade des EGF-Rezeptors mit Tyrphostin AG1478 erreicht werden. Im Vergleich zur Kontrolle konnte hierbei der Anteil migrierender Zellen für G109 um 77,1% und für G147 und LN229 fast vollständig um 97,5% bzw. 95,7% reduziert werden (Tab. 5.12 und Abb. 5.25). In Western Blot-Analysen konnte dabei genau für diese Zelllinien ein niedriger EGF-Rezeptorstatus gezeigt werden (vgl. Abb. 5.1). Bei den Zelllinien G139 und LN229 erwies sich die Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs sowohl durch LY294002 als auch die Hemmung des nachgeschalteten mTORs durch Rapamycin als sehr effektiv. Die relative Migrationsrate konnte bei G139 für LY294002 im Vergleich zur Kontrolle um fast zwei Drittel auf 33,8% und für Rapamycin um mehr als die Hälfte auf 44,2% gesenkt werden (Tab. 5.12). Bei LN229 ergab sich eine Abnahme der relativen Migrationsrate fast vollständig auf 4,6% für LY294002 und um mehr als zwei Drittel auf 24,1% für Rapamycin. Für LN229 zeigte sich außerdem die Blockade der p44/42 MAP-Kinase durch PD98059 vergleichbar effizient, wohingegen dieser Signalweg bei den übrigen Zelllinien in Bezug auf das Migrationsverhalten in der modifizierten Boydenkammer keine große Rolle zu spielen scheint (vgl. Abb. 5.25).

Tab. 5.12: Relative Migrationsrate von Gliomzellen in der modifizierten Boydenkammer ohne und unter Einfluss von Inhibitoren.

	Kontrolle	PD98059	Tyrphostin AG1478	LY294002	Rapamycin
G139	100,0%	66,6%	75,8%	33,8%	44,2%
G109	100,0%	67,8%	22,9%	80,0%	72,1%
G147	100,0%	109,3%	2,5%	78,6%	76,8%
LN18	100,0%	93,5%	80,7%	86,9%	113,7%
LN229	100,0%	27,2%	4,3%	4,6%	24,1%
LNZ308	100,0%	63,9%	63,1%	55,4%	47,3%

Angegeben ist die relative prozentuale Migrationsrate der Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“) ohne und unter Einfluss von PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) bezogen auf die Kontrolle.

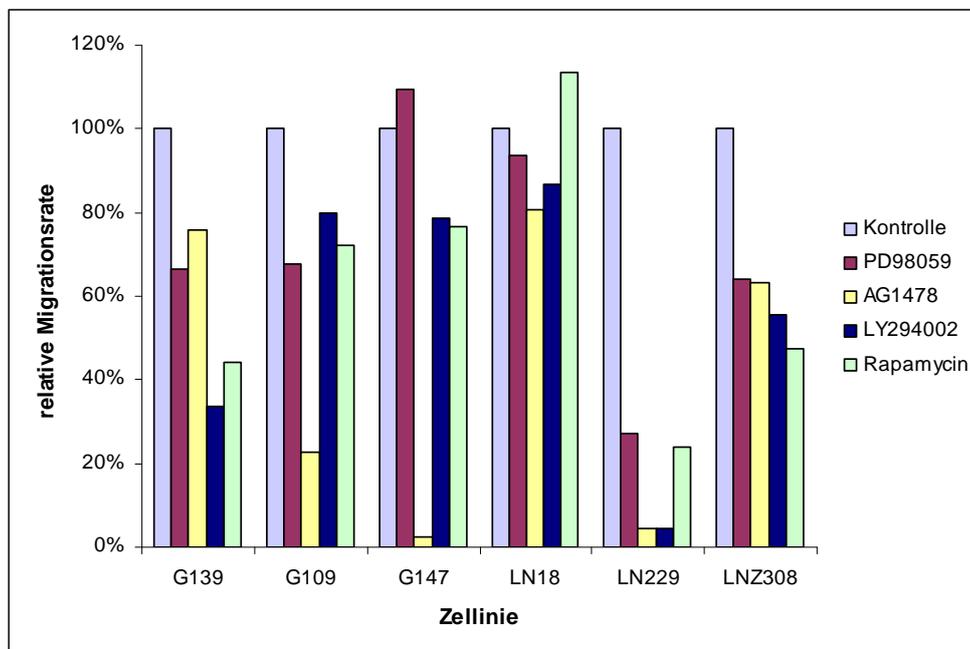


Abb. 5.25: Einfluss der Blockade der p44/42 MAP-Kinase, des EGF-Rezeptors, der PI3-Kinase und von mTOR auf die Migrationsrate von humanen Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum.

Humane Gliomzelllinien wurden mit PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (AG1478, EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) und ohne Inhibitor (Kontrolle) inkubiert. Ihr Migrationsverhalten wurde in der modifizierten Boydenkammer auf unbeschichteten Filtern untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie und quantitativer Bildanalyse. Es zeigte sich, dass die Migration von Zelllinien mit einem niedrigen EGFR-Status (d.h. G109, G147 und LN229, vgl. Abb. 5.1) äußerst effizient durch die Blockade des EGF-Rezeptors gehemmt wurde. (Angegeben ist der relative Anteil migrierter Zellen aus den Mittelwerten von je 10 Gesichtsfeldern bezogen auf die Kontrolle).

5.4.3.2 Invasionsverhalten der Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)

Alle Zelllinien zeigten die Fähigkeit die mit ECM („Matrigel“) verschlossenen Membranporen der modifizierten Boydenkammer zu invadieren und zur Unterseite des Filters zu gelangen. Die Invasionsrate lag zwischen 11,8% für LN229 und 26,6% für LN308 (vgl. Tab. 5.14 und Abb. 5.30).

5.4.3.2.1 EGF erhöht die Invasionsrate der Gliomzelllinien

Die Zugabe von 100ng/ml EGF konnte in allen Zelllinien die Invasionsrate steigern. In Tab. 5.13 ist der absolute prozentuale Anteil invasiver Zellen dargestellt.

Tab. 5.13: Absolute Invasionsrate von Gliomzellen in der modifizierten Boydenkammer ohne und unter Einfluss von EGF.

	G139	G109	G147	LN18	LN229	LN308
Kontrolle	17,7%	21,6%	10,3%	21,6%	11,8%	26,6%
EGF	22,7%	29,5%	24,8%	32,2%	17,0%	31,8%

Angegeben ist der absolute prozentuale Anteil invasiver Zellen im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“) ohne und unter Einfluss von EGF.

Den größten Einfluss auf das Invasionsverhalten hatte die Behandlung mit EGF bei der Zelllinie G147 (vgl. Abb. 5.26). Hier kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einem drastischen Anstieg der invasiven Zellen um fast das 1,5fache (relative Zunahme der Invasionsrate um 140,5%). LN18 und LN229 zeigten eine Steigerung um fast die Hälfte (relative Zunahme um 49,0% bzw. 43,5%). Bei G109 und G139 nahm der Anteil invasiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 36,6% bzw. 27,7% zu. LN308 zeigte nach Behandlung mit EGF die geringste Zunahme der relativen Invasionsrate mit 19,7% (vgl. Abb. 5.26).

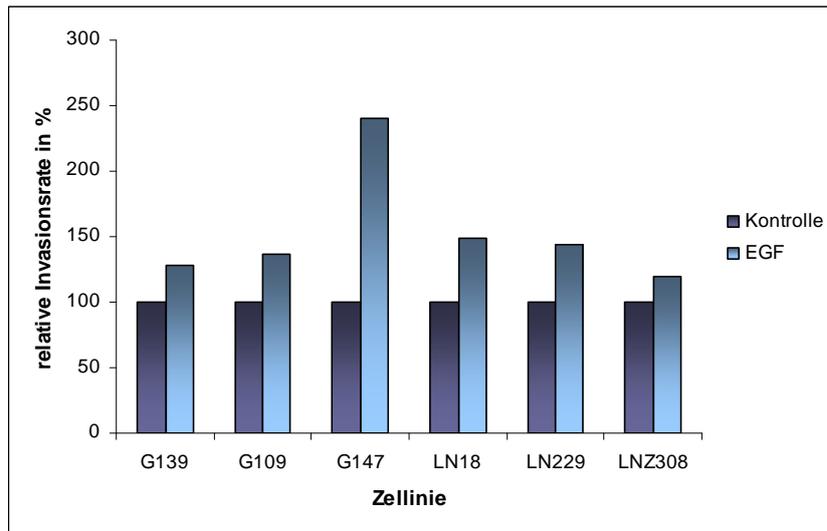


Abb. 5.26: Einfluss von EGF auf das Invasionsverhalten von Gliomzellen.

Humane Gliomzelllinien wurden ohne oder mit EGF in der modifizierten Boydenkammer inkubiert und mit ECM beschichteten Filtern auf ihr Invasionsverhalten untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie und quantitativer Bildanalyse. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit EGF zu einer erhöhten Invasionsrate führte. (Angabe ist der relative Anteil invasiver Zellen aus den Mittelwerten von je 30 Gesichtsfeldern aus drei Filtern bezogen auf die Kontrolle).

5.4.3.2.2 Die Blockade der Signalwege führt zu einer Verringerung der Invasionsrate

Alle vier Inhibitoren (Tyrphostin AG1478, LY294002, Rapamycin und PD98059) konnten in der mit ECM beschichteten modifizierten Boydenkammer die Invasionsrate der untersuchten Gliomzelllinien in unterschiedlichem Maße verringern. In Tab. 5.14 ist der jeweilige absolute Anteil invasiver Zellen ohne und unter Einfluss der Inhibitoren aufgelistet.

Tab. 5.14: Invasionsrate von Gliomzellen ohne und unter Einfluss von Inhibitoren in der modifizierten Boydenkammer.

	Kontrolle	PD98059	Tyrphostin AG1478	LY294002	Rapamycin
G139	17,7%	12,8%	11,8%	6,5%	5,8%
G109	21,6%	12,7%	0,7%	14,5%	11,5%
G147	10,3%	14,4%	0,6%	16,3%	18,0%
LN18	21,6%	14,4%	20,7%	5,1%	8,9%
LN229	11,8%	7,6%	1,2%	1,6%	2,4%
LN2308	26,6%	13,4%	13,9%	10,5%	4,0%

Angabe ist die absolute prozentuale Invasionsrate der Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“) ohne und unter Einfluss von PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor).

Tab 5.15 zeigt die relative Invasionsrate der mit den Inhibitoren behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Tab. 5.15: Relative Invasionsrate von Gliomzellen in der modifizierten Boydenkammer ohne und unter Einfluss von Inhibitoren.

	Kontrolle	PD98059	Tyrphostin AG1478	LY294002	Rapamycin
G139	100,0%	72,3%	66,3%	36,5%	32,4%
G109	100,0%	58,6%	3,1%	67,2%	53,1%
G147	100,0%	139,9%	5,6%	158,2%	173,9%
LN18	100,0%	66,7%	95,6%	23,6%	41,3%
LN229	100,0%	64,6%	10,3%	13,4%	20,7%
LNZ308	100,0%	50,4%	52,1%	39,5%	15,2%

Angegeben ist die relative prozentuale Invasionsrate der Gliomzelllinien im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“) ohne und unter Einfluss von PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) bezogen auf die Kontrolle.

5.4.3.2.3 Die Blockade der PI3-Kinase führt zu einer reduzierten Invasivität der Gliomzelllinien

In Bezug auf das Invasionsverhalten zeigte sich die Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs bei vier (d.h. G139, LN18, LN229, LNZ308) der sechs untersuchten Gliomzelllinien als sehr effizient (vgl. Tab. 5.15 und Abb. 5.27). Bei G109 und G147 hingegen konnten vergleichbare Ergebnisse nur durch Hemmung des EGF-Rezeptors erzielt werden (vgl. Abb. 5.28, siehe Kapitel 5.4.3.2.5).

Für G139, LN18, LN229 und LNZ308 konnte hierbei gleichermaßen eine erfolgreiche Reduzierung der Invasivität sowohl durch die Blockade der PI3-Kinase (mit LY294002) als auch durch die Blockade des nachgeschalteten mTORs (mit Rapamycin) erreicht werden (Abb. 5.27 und Tab. 5.15). Die Blockade des EGF-Rezeptors durch Tyrphostin AG1478 war bei diesen Zelllinien, mit Ausnahme von LN229, weit weniger wirksam. Bei LN229 beispielsweise sank die Invasionsrate bei Behandlung mit LY294002 im Vergleich zur Kontrolle auf 13,4%, mit Rapamycin auf 20,7% und mit Tyrphostin AG1478 auf 10,3% (Tab. 5.15 und Abb. 5.27). Nur bei dieser Zelllinie konnte jedoch sowohl durch Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs als auch durch Blockade des EGF-Rezeptors eine gleichermaßen effiziente Abnahme in der Invasionsrate beobachtet werden (Abb. 5.27 und Abb. 5.28). Dabei war LN229 die einzige der hier untersuchten Zelllinien, die einen unveränderten PKB/Akt-Status aufwies.

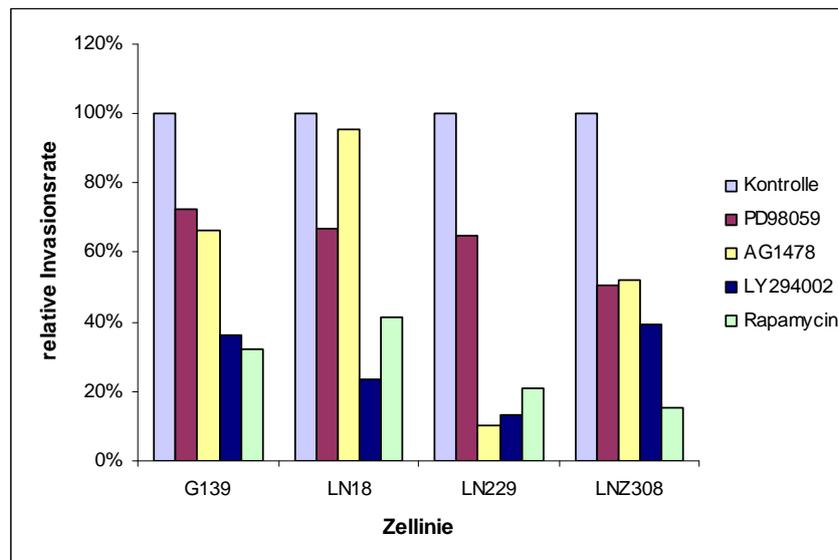


Abb. 5.27: Verringerung der Invasivität von Gliomzellen durch Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs.

Humane Gliomzelllinien wurden mit PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (AG1478, EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) und ohne Inhibitor (Kontrolle) inkubiert. Ihr Invasionsverhalten wurde in der modifizierten Boydenkammer auf mit ECM beschichteten Filtern untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie und quantitativer Bildanalyse. Die Blockade des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs (dunkelblaue und grüne Balken) zeigte sich für G139, LN18, LN229 und LN2308 äußerst effizient in Bezug auf die Verringerung der Invasionsrate. (Angabe ist der relative Anteil invasiver Zellen aus den Mittelwerten von je 30 Gesichtsfeldern aus drei Filtern bezogen auf die Kontrolle).

5.4.3.2.4 Die Invasivität von Gliomzelllinien mit niedrigem EGF-Rezeptorstatus wird durch die Blockade mit Tyrphostin AG1478 gehemmt

Bei den Zelllinien G109, G147 und LN229 konnte die Invasion am effizientesten durch Hemmung des EGF-Rezeptors mittels Tyrphostin AG1478 blockiert werden (Abb. 5.28). Bei LN229 konnte eine vergleichbare Invasionsabnahme jedoch ebenso durch Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs mit LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor) erzielt werden (Abb. 5.28). Der relative Anteil invasiver Zellen betrug nach Behandlung mit Tyrphostin AG1478 bei G109 3,1%, bei G147 5,5% und bei LN229 10,3% (vgl. Tab. 5.15). Interessanterweise sind das die Zelllinien, bei denen in Western Blot-Analysen ein niedriger EGF-Rezeptorstatus gezeigt wurde (Abb. 5.1). Für G139, LN18 und LN2308, d.h. für die Zelllinien mit hoher EGF-Rezeptor-Expression (vgl. Abb. 5.1), scheint die Blockade des EGF-Rezeptors in Bezug auf die Invasivität keine große Rolle zu spielen. Für LN18 beispielsweise konnte die Behandlung mit Tyrphostin AG1478 die Invasionsrate im Vergleich zur Kontrolle um nur 4,4% herabsetzen (Tab. 5.15 und Abb. 5.27).

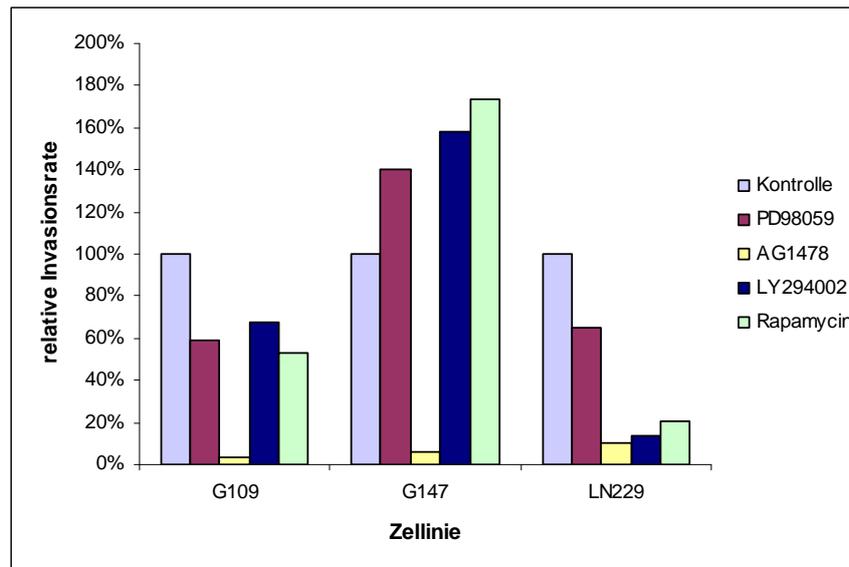


Abb. 5.28: Invasionsverhalten der Gliomzelllinien mit einem niedrigem EGF-Rezeptorstatus (G109, G147 und LN229).

Humane Gliomzellen wurden mit PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor), Tyrphostin AG1478 (AG1478, EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) und ohne Inhibitor (Kontrolle) inkubiert. Ihr Invasionsverhalten wurde in der modifizierten Boydenkammer auf mit ECM beschichteten Filtern untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie und quantitativer Bildanalyse. Es zeigte sich, dass die Blockade des EGF-Rezeptors (gelber Balken) in Zelllinien mit einem niedrigen EGF-Rezeptorstatus (d.h. G109, G147 und LN229, Abb. 5.1) äußerst effizient in Bezug auf die Verminderung der Invasionsrate ist. (Angegeben ist der relative Anteil invasiver Zellen aus den Mittelwerten von je 30 Gesichtsfeldern aus drei Filtern bezogen auf die Kontrolle).

5.4.3.3 Aktivierung der Signalwege im Migrations- und Invasionsversuch in der modifizierten Boydenkammer

Um zu prüfen, ob nach Blockade der Signalwege das erfolgreiche Ansprechen der Verringerung der Invasivität auf den Aktivierungsstatus von EGFR, PKB/Akt und p44/42 MAPK zurückzuführen ist, wurden Western Blot-Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

5.4.3.3.1 Die Reduktion der Invasivität ist nicht abhängig vom Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors

Nach einer 24stündigen Blockade des EGF-Rezeptors durch Tyrphostin AG1478, der PI3-Kinase durch LY294002, von mTOR durch Rapamycin und der p44/42 MAP-Kinase durch PD98059 zeigte mit Ausnahme von LN229 keine der Zelllinien eine Aktivierung des EGF-

Rezeptors an der Tyr1086-Phosphorylierungsstelle. Nur LN229, die einzige der untersuchten Zelllinien mit normalem PKB/Akt-Status, wies sowohl nach Behandlung mit allen Inhibitoren als auch nach Aktivierung mit EGF eine positive Immunreaktion der Tyr1086-Phosphorylierungsstelle des EGF-Rezeptors auf (vgl. Abb. 5.29).

Nach Inkubation mit EGF konnte außerdem bei G139 eine starke Aktivierung des EGF-Rezeptors festgestellt werden. Ansonsten war nur noch bei G109 eine positive Immunreaktion zu beobachten, die jedoch sehr gering war.

Bei allen Zelllinien zeigte sich, dass die 24stündige Behandlung mit EGF eine teilweise drastische Abnahme der Signalstärke des Gesamtproteins zur Folge hatte, wohingegen die Inkubation der Inhibitoren keinen Einfluss darauf hatte (Abb. 5.29).

Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors und dem Invasionsverhalten nach Blockade der Signalwege festgestellt.

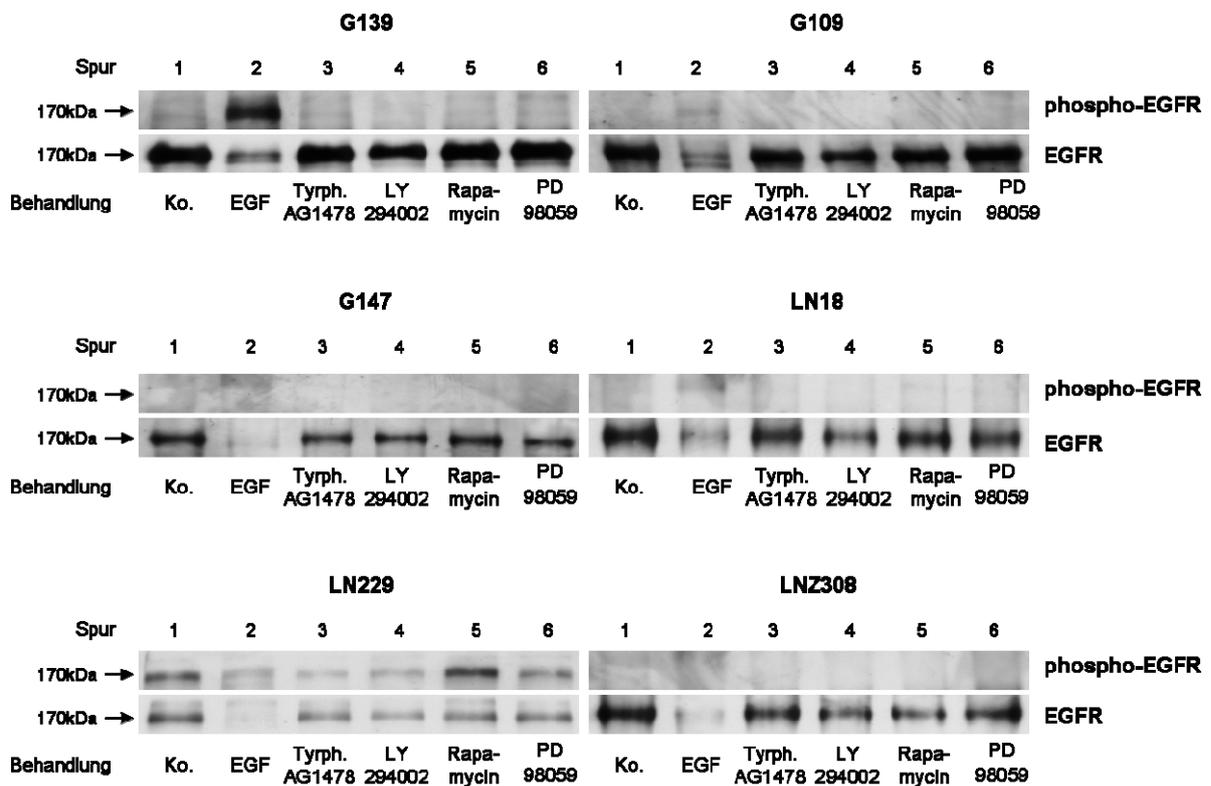


Abb. 5.29: Nachweis von phospho-EGFR und EGFR in Gliomzelllinien mittels Western Blot-Analysen.

Humane Gliomzelllinien wurden 24h mit EGF, Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor), PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor) behandelt. Als Kontrolle (Ko.) wurde das DMSO-Volumenäquivalent zu LY294002 eingesetzt. Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei denen im Migrations- und Invasionsversuch im dreidimensionalen Raum mittels modifizierter Boydenkammer. 5µg Gesamtprotein aus den Zellysaten wurde in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der phospho-EGFR-Antikörper detektiert den an Tyrosin 1086 phosphorylierten EGF-Rezeptor. Es zeigte sich, dass LN229 eine konstitutive Aktivierung des EGF-Rezeptors aufwies und G139 erst nach EGF-Stimulation (Spur 1) an EGFR phosphoryliert wurde.

5.4.3.3.2 Die Hemmung der Invasivität ist abhängig vom Aktivierungsstatus der Proteinkinase B (PKB)/Akt

Eine effiziente Blockade der PI3-Kinase durch LY294002, welches dadurch die Phosphorylierung von PKB/Akt verhindert, wurde für G139, LN18, LN229 und LN308 nachgewiesen (Abb. 5.30 jeweils Spur 3). Diese Zelllinien reagierten auch mit einer stark reduzierten Invasivität auf die Hemmung der PI3-Kinase an (Abb. 5.27). Für G109 und G147 zeigte sich bei gleicher Behandlung nur eine geringe Abnahme des Signals (Abb. 5.30, jeweils Spur 3).

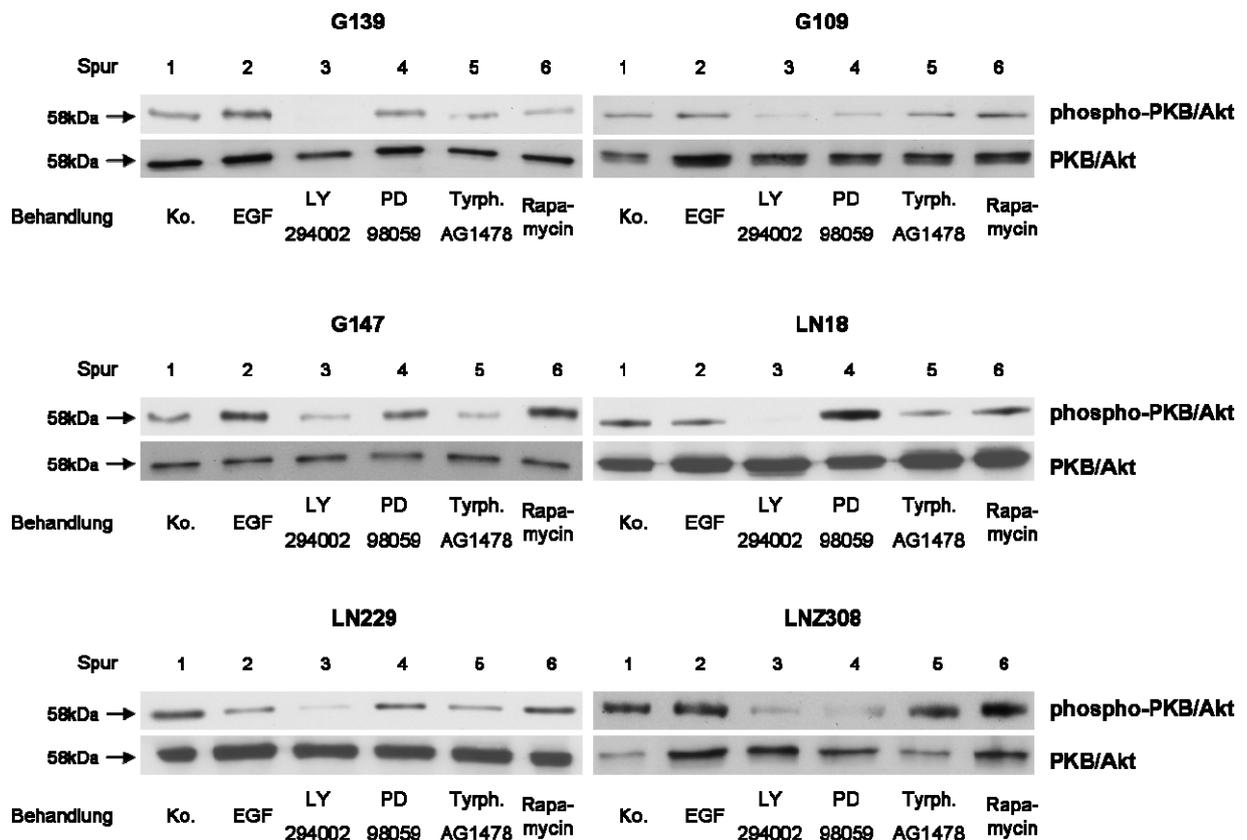


Abb. 5.30: Nachweis von phospho-PKB/Akt und PKB/Akt in Gliomzelllinien mittels Western Blot-Analysen.

Humane Gliomzelllinien wurden 24h mit EGF, Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor), PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor) behandelt. Als Kontrolle (Ko.) wurde das DMSO-Volumenäquivalent zu LY294002 eingesetzt. Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei denen im Migrations- und Invasionsversuch im dreidimensionalen Raum mittels modifizierter Boydenkammer. 5µg Gesamtprotein aus den Zellysaten wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der phospho-PKB/Akt-Antikörper detektiert die an Serin 473 phosphorylierte Proteinkinase B/Akt. Es zeigte sich für G139, LN18, LN229 und LN308 eine effiziente Blockade der PI3-Kinase (Spur 3).

Eine Blockade des EGF-Rezeptors mit Tyrphostin AG1478 hatte bei G147, LN18 und LN229 ebenfalls Auswirkungen auf den Aktivierungsstatus von PKB/Akt. Hier war eine leichte Abschwächung des Signals zu erkennen.

Eine Inkubation mit EGF zeigte nur bei den Zelllinien G109, G139 und G147 eine geringe Zunahme der Signalstärke von phospho-(Ser473)-PKB/Akt (Abb. 5.30).

5.4.3.3 Aktivierungsstatus der p44/42 MAP-Kinase (MAPK)

Eine effiziente Blockade der phospho-p44/42 MAP-Kinase konnte nur in den Zelllinien G147 und LN229 beobachtet werden, wobei dies sowohl durch Inhibierung des vorgeschalteten EGF-Rezeptors mittels Tyrphostin AG1478 als auch durch die Hemmung der p44/42 MAP-Kinase selbst erreicht wurde. Bei G147 konnte außerdem durch Gabe von EGF eine verstärkte Aktivierung, d.h. Phosphorylierung von p44/42 MAPK bewirkt werden (Abb. 5.31).

Das Ansprechen einer reduzierten Invasivität stand nicht im Zusammenhang mit dem Aktivierungsstatus der p44/42 MAP-Kinase.

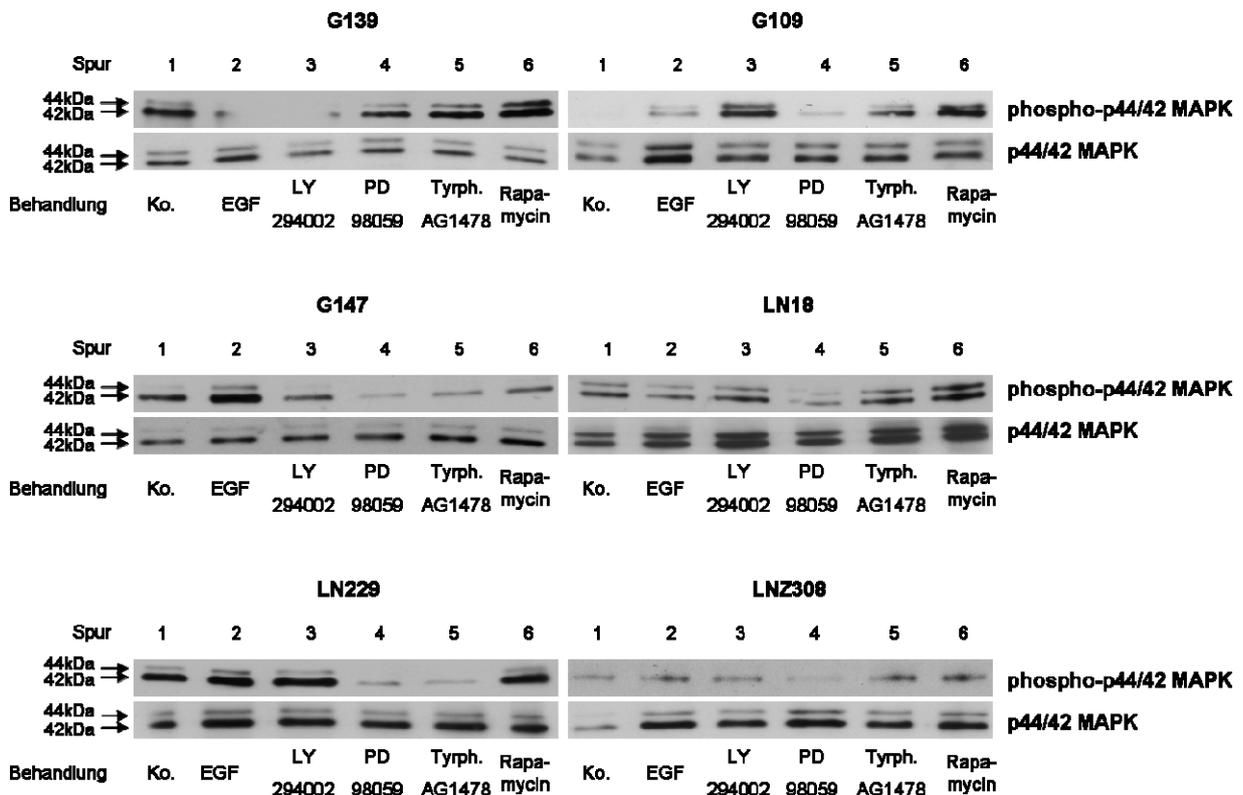


Abb. 5.31: Nachweis von phospho-p44/42 MAPK und p44/42 MAPK in Gliomzelllinien mittels Western Blot-Analysen.

(Fortsetzung folgende Seite).

Abb. 5.31 Nachweis von phospho-p44/42 MAPK und p44/42 MAPK in Gliomzelllinien mittels Western Blot-Analysen. (Fortsetzung).

Humane Gliomzelllinien wurden 24h mit EGF, Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3-Kinase-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor), PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor) behandelt. Als Kontrolle (Ko.) wurde das DMSO-Volumenäquivalent zu LY294002 eingesetzt. Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei denen im Migrations- und Invasionsversuch im dreidimensionalen Raum mittels modifizierter Boydenkammer. 5µg Gesamtprotein aus den Zellysaten wurde in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der phospho-p44/42 MAPK-Antikörper detektiert die an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphorylierte p44/42 MAP-Kinase (ERK1/ERK2). Es zeigte sich nur für die Zelllinien G147 und LN229 eine effiziente Blockade der phospho-p44/42 MAP-Kinase sowohl durch PD98059 als auch durch Tyrphostin AG1478. (Molekulargewicht von p44/42 MAPK: 44 bzw. 42kDa).

5.5 Herunterregulierung des Tumorsuppressors PTEN mittels *small interfering* RNA (siRNA)

Der Funktionsverlust des Tumorsuppressors PTEN führt durch Erhöhung des intrazellulären PIP3-Levels zu einer übermäßigen Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB)/Akt und somit zu einer Verstärkung der von PKB/Akt regulierten zellulären Prozesse (Brazil *et al.*, 2002), zu denen auch die Zellmotilität gerechnet wird (Vivanco und Sawyers, 2002).

Der Einfluss von PTEN auf das Motilitäts- und Invasionsverhalten wurde deshalb nach transients Transfektion von zwei verschiedenen *small interfering* (si)RNAs (siPTEN1 und siPTEN2) in die Zelllinie LN229, einer Zelllinie mit normalem PKB/Akt-Status, untersucht. Die erfolgreiche Expressionshemmung von PTEN war zuvor auf Proteinebene anhand von Western Blot-Analysen bestätigt worden (Daten nicht gezeigt).

5.5.1 Die Expressionshemmung von PTEN führt zu einer erhöhten Motilität in der Gliomzelllinie LN229

In Motilitätsversuchen mittels Echtzeitmikroskopie führte die Expressionshemmung von PTEN in der Gliomzelllinie LN229 zu einer gesteigerten Motilitätsrate (vgl. Abb. 5.32). Der Anteil motiler Zellen konnte im Vergleich zur Kontrolle um mehr als das Doppelte von 16,4% auf 38,6% gesteigert werden (Abb. 5.32 A). Die individuelle Zellgeschwindigkeit nahm übereinstimmend von 10,38µm/h um fast das Doppelte auf 19,29µm/h zu (Abb. 5.32 B).

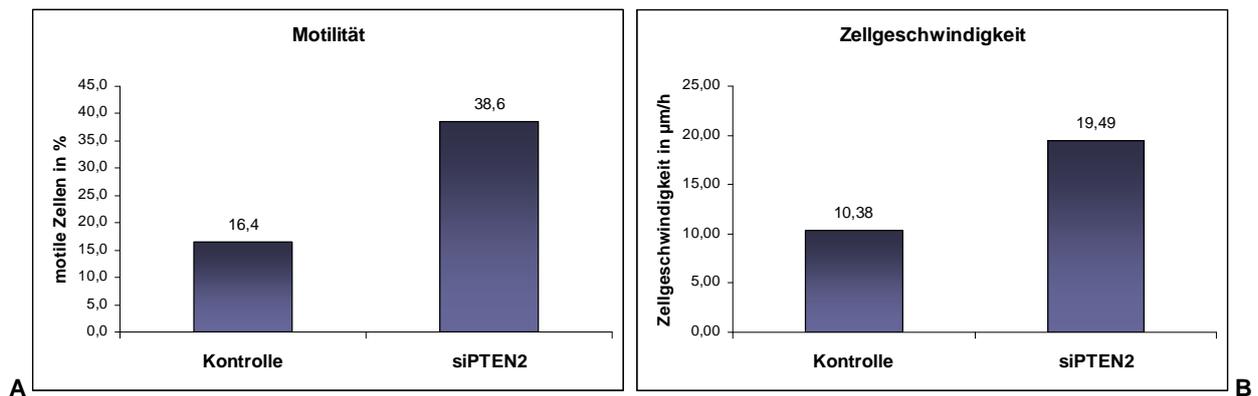


Abb. 5.32: Steigerung der Motilität von LN229 durch Expressionshemmung des Tumorsuppressors PTEN.

Die Zelllinie LN229 wurde mit einer siRNA des Tumorsuppressors PTEN (siPTEN2) transient transfiziert. Lebendzellbeobachtungen nach Echtzeitmikroskopie zeigten eine Steigerung der Motilitätsrate um mehr als das Doppelte durch die Expressionshemmung von PTEN. Angegeben sind die Mittelwerte des Anteils motiler Zellen (**A**) und der individuellen Zellgeschwindigkeit (**B**) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

5.5.2 Die Expressionshemmung von PTEN führt zu einer erhöhten Migration der Gliomzelllinie LN229 im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“)

Die Migrationsrate von LN229 in der modifizierten Boydenkammer wurde auf unbeschichteten Filtern untersucht.

In zwei verschiedenen Versuchsansätzen zeigte sich, dass die Migrationsrate von LN229 im dreidimensionalen Raum („modifizierte Boydenkammer“) durch eine Expressionshemmung von PTEN gesteigert wurde (Abb. 5.33). Nach Transfektion der siPTEN2 siRNA im ersten Versuchsansatz erhöhte sich der Anteil der migrierenden Zellen von 35,8% in der Kontrolle auf 53,9% (Abb. 5.33 A). Im zweiten Versuchsansatz wurde der Einfluss von zwei verschiedenen siRNAs von PTEN (siPTEN1 und siPTEN2) auf das Migrationsverhalten untersucht (Abb. 5.33 B). Auch hier nahm im Vergleich zur Kontrolle (39,1%) bei beiden siRNAs der Anteil migrierender Zellen zu. Für siPTEN1 zeigte sich eine Erhöhung auf 43,8%, für siPTEN2 auf 46,1% (Abb. 5.33 B).

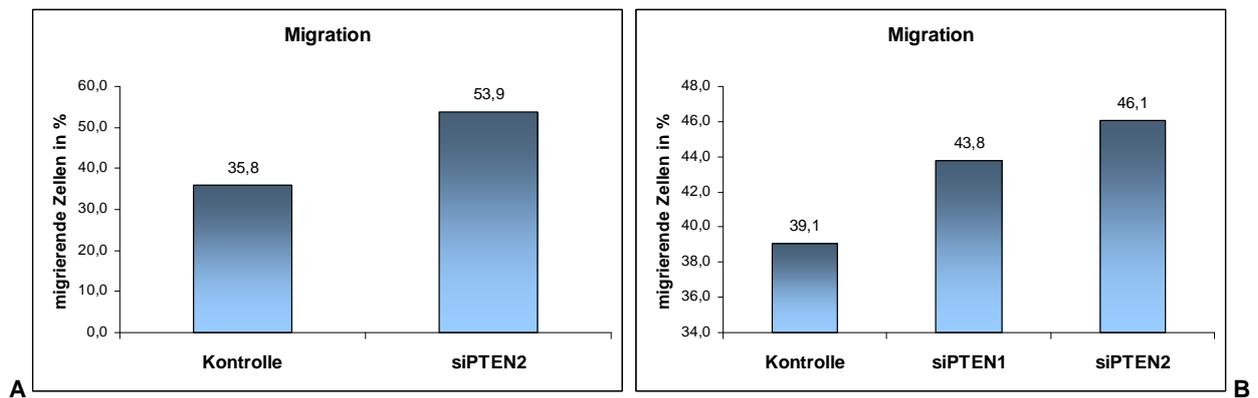


Abb. 5.33: Steigerung der Migrationsrate von LN229 durch Expressionshemmung des Tumorsuppressors PTEN.

Die Zelllinie LN229 wurde mit einer siRNAs des Tumorsuppressors PTEN (siPTEN1 und siPTEN2) transient transfiziert und in der modifizierten Boydenkammer auf ihr Migrationsverhalten untersucht. Mittels konfokaler Mikroskopie und quantitativer Bildanalyse zeigte sich in zwei verschiedenen Versuchsansätzen (**A** bzw. **B**), dass die Expressionshemmung von PTEN zu einer Erhöhung der Migrationsrate führt. (Angegeben sind die Mittelwerte des Anteils migrierender Zellen von je 10 Gesichtsfeldern).

5.5.3 Die Expressionshemmung von PTEN führt zu einer verminderten Invasivität der Gliomzelllinie LN229

Die Invasionsrate von LN229 in der modifizierten Boydenkammer wurde auf Filtern bestimmt, die mit einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (ECM, „Matrigel“) beschichtet waren.

Im Gegensatz zu den Motilitätsversuchen mittels Echtzeitmikroskopie und den Migrationsuntersuchungen im dreidimensionalen Raum in der modifizierten Boydenkammer führte die Expressionshemmung von PTEN zu einer Abnahme der Invasivität von LN229 (vgl. Abb. 5.34). Die Transfektion von siPTEN2 konnte im ersten Versuchsansatz den Anteil invasiver Zellen von 16,3% auf 12,2% verringern (Abb. 5.34 A). Im zweiten Versuchsansatz nahm die Invasionsrate um etwa die Hälfte von 19,2% auf 10,3% für siPTEN1 bzw. auf 9,7% für siPTEN2 ab (Abb. 5.34 B).

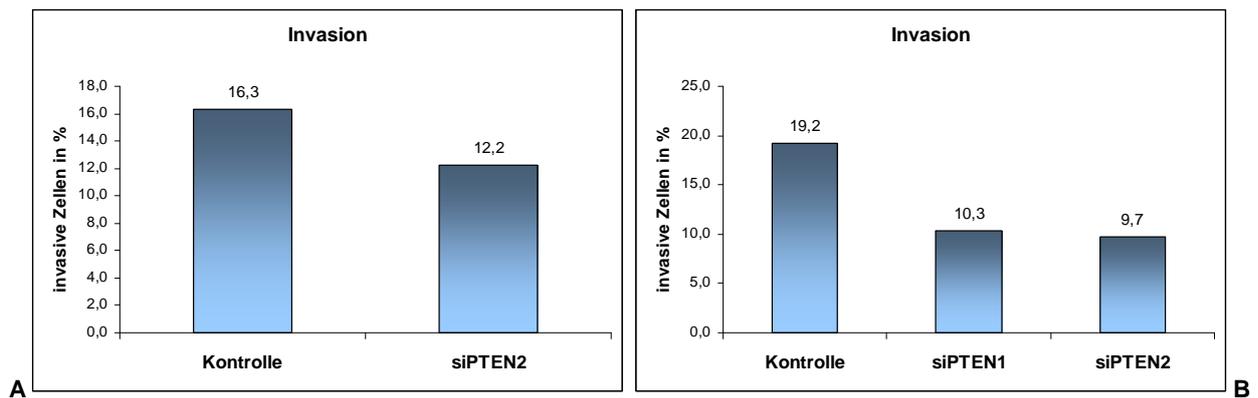


Abb. 5.34: Verringerung der Invasionsrate von LN229 durch Expressionshemmung des Tumorsuppressors PTEN.

Die Zelllinie LN229 wurde mit einer siRNAs des Tumorsuppressors PTEN (siPTEN1 und siPTEN2) transient transfiziert und in der modifizierten Boydenkammer auf ihr Invasionsverhalten untersucht. Mittels konfokaler Mikroskopie und quantitativer Bildanalyse zeigte sich in zwei verschiedenen Versuchsansätzen (**A** bzw. **B**), dass die Expressionshemmung von PTEN zu einer Verminderung der Invasionsrate führt. (Angegeben sind die Mittelwerte des Anteils invasiver Zellen von je 30 Gesichtsfeldern aus drei Filtern).

5.6 Ausbildung des Aktinzytoskeletts in den Gliomzelllinien

Filo- und Lamellipodien sind maßgeblich am Motilitätsgeschehen beteiligt (Lauffenburger und Horwitz, 1996), so dass die Ausbildung des Aktinzytoskeletts in den Gliomzelllinien durch F-Aktinfärbung untersucht wurde.

5.6.1 Das Aktinzytoskelett ist in den Gliomzelllinien unterschiedlich angeordnet

Allgemein konnten in den unbehandelten Gliomzelllinien zwei unterschiedliche Morphotypen für die Anordnung des Aktinzytoskeletts beobachtet werden. G109, G139 und LN229 wiesen eine fibroblastenähnliche, d.h. spindelförmige Zellform auf (vgl. Abb. 5.35). Bei G109 und G139 waren dabei in hoher Anzahl Aktinfasern zu erkennen, bei LN229 waren diese weniger stark ausgeprägt. Alle diese drei Zelllinien verfügten aber über deutlich erkennbare Filopodien. Bei G147, LN18 und LN2308 hingegen verteilte sich das F-Aktin eher ringförmig und diffus. Hier waren auch keine Aktinfasern zu beobachten wie dies bei dem ersten Erscheinungstyp der Fall war. Als einzige der untersuchten Zelllinien wies LN18 eine große Anzahl von Zell-Zell-Kontakten auf (Abb. 5.35).

5.6.2 Collagen I führt zu einer veränderten Ausbildung des Aktinzytoskeletts

Da die Motilitätsuntersuchungen mittels Echtzeitmikroskopie nach Aussaat auf Collagen I durchgeführt wurden, wurde auch der Einfluss dieser Matrix auf das Aktinzytoskelett untersucht. Eine derartige Kultivierung hatte im Vergleich zum unbehandelten Substrat bei allen Zelllinien eine Änderung des Aktinzytoskeletts und zum Teil auch der Morphologie zur Folge (vgl. Abb. 5.35). So konnte für die auf einem unbehandelten Substrat spindelförmigen Zelllinien G109, G139 und LN229 auf Collagen I eine mehr gedrungene, d.h. weniger länglich ausgeprägte Zellform beobachtet werden. Bei G139 und LN229 zeigte sich dabei eine verstärkte Akkumulation von F-Aktin am Zytoplasmarand. Bei G139 erfolgte dies jedoch nur auf einer Seite des Zellkörpers, wohingegen bei LN229 das F-Aktin fast gleichmäßig an allen Seiten des Zellkörpers akkumulierte. Außerdem zeigte sich für G139, dass der Zellkern auf der gegenüberliegenden Seite dieser F-Aktin-Akkumulation (Lamellipodium) lokalisiert war, wohingegen er sich bei LN229 in der Mitte des Zellkörpers befand. Bei G147 und LN308 konnte ebenfalls eine verstärkte Verlagerung des F-Aktins vom Zytoplasma zum Zellrand festgestellt werden. Auch hier verteilte sich das F-Aktin verstärkt entweder gleichmäßig an allen Seiten oder auf zwei sich gegenüberliegenden Seiten des Zellkörpers. Auffallend war dabei, dass sich der Zellkern zumeist in der Mitte des Zytoskeletts befand. G147, LN229 und LN308 sind die Zelllinien, die sich in den Motilitätsuntersuchungen mittels Echtzeitmikroskopie als gering motil erwiesen (vgl. Abb. 5.21). Diese Motilitätsversuche wurden ebenfalls auf einem Collagen I-Substrat durchgeführt.

LN18, welche auf dem unbehandelten Substrat eine flächenförmige Anordnung mit vielen Zell-Zell-Kontakten hatte, zeigte auf Collagen I eine Abnahme dieser Zell-Zell-Kontakte (vgl. Abb. 5.35). Ebenso zeigte sich eine Veränderung in der Ausbildung des Zytoskeletts. War das F-Aktin auf dem unbehandelten Substrat noch diffus und vorwiegend am Zellsaum verteilt, kam es auf Collagen I zu einer verstärkten Ausbildung von Aktinfasern und der Lokalisation des Zellkerns auf einer Seite des Zellkörpers. LN18 zeigte in den Motilitätsuntersuchungen mittels Lebzellbeobachtung eine hohe Motilitätsrate (vgl. Abb. 5.21).

5.6.3 Einfluss der Blockade der PI3-Kinase auf das Aktinzytoskelett

Bei den Zelllinien G109, G139 und LN18, die im Motilitätsversuch mittels Echtzeitmikroskopie eine hohe Anzahl von motilen Zellen aufwiesen (vgl. Abb. 5.21), wurde der Einfluss der PI3-Kinase durch Blockade mit LY294002 auf einer Collagen I-Matrix untersucht.

Im Vergleich zu den Versuchsreihen mit einem Collagen I-Substrat zeigte sich für G109 und G139 keine Veränderung in der Anordnung der Aktinfasern, wenn die Zellen mit LY294002 behandelt wurden (vgl. Abb. 5.35). Bei LN18 hingegen konnte eine Umverteilung des F-Aktins

beobachtet werden. So wies diese Zelllinie nach LY294002-Behandlung eine verstärkte Akkumulation von F-Aktin am gesamten Zellsaum auf. Außerdem konnte eine diffuse Verteilung des F-Aktins im Zytoplasma und einhergehend eine Abnahme der Aktinfasern beobachtet werden. Auffallend war bei LN18 auch, dass nach Blockade der PI3-Kinase wieder vermehrt Zell-Zell-Kontakte gezeigt werden konnten.

Abb. 5.35: Darstellung des Aktinzytoskeletts in Gliomzellen mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin.

(Abb. folgende Seite).

Humane Gliomzelllinien wurden nach Inkubation auf einem unbeschichteten Substrat (linke Spalte), auf Collagen I (mittlere Spalte) und auf Collagen I mit LY294002 (rechte Spalte) mit Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin gefärbt. Für das unbeschichtete Substrat zeigte sich, dass G109, G139 und LN229 eine spindelförmige Zellform sowie die Ausbildung von Aktinfasern aufweisen. Bei G147, LN18 und LN2308 verteilte sich das F-Aktin hingegen ringförmig um den Zellkern und diffus im Zytoplasma. Die Inkubation auf Collagen I führte zu einer Umverteilung des F-Aktins. Bei G139 und LN18 kam es zu einer verstärkten Akkumulation des F-Aktins an einer Stelle des Zytoplasmarands und zur Lokalisation des Zellkerns auf der entgegengesetzt liegenden Seite. Diese beiden Zelllinien wiesen in den Motilitätsversuchen mittels Lebendzellbeobachtung eine hohe Motilitätsrate auf (Abb. 5.21). Bei LN229, LN2308 und G147, also bei Zelllinien mit geringer Motilität (Abb. 5.21), verteilte sich das F-Aktin gleichförmig am Zytoplasmarand und der Zellkern in der Mitte. Für LN18 kam es auf Collagen I zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte, was durch die Blockade der PI3-Kinase mittels LY294002 wieder aufgehoben wurde. (Der Maßstabsbalken entspricht 20µm).

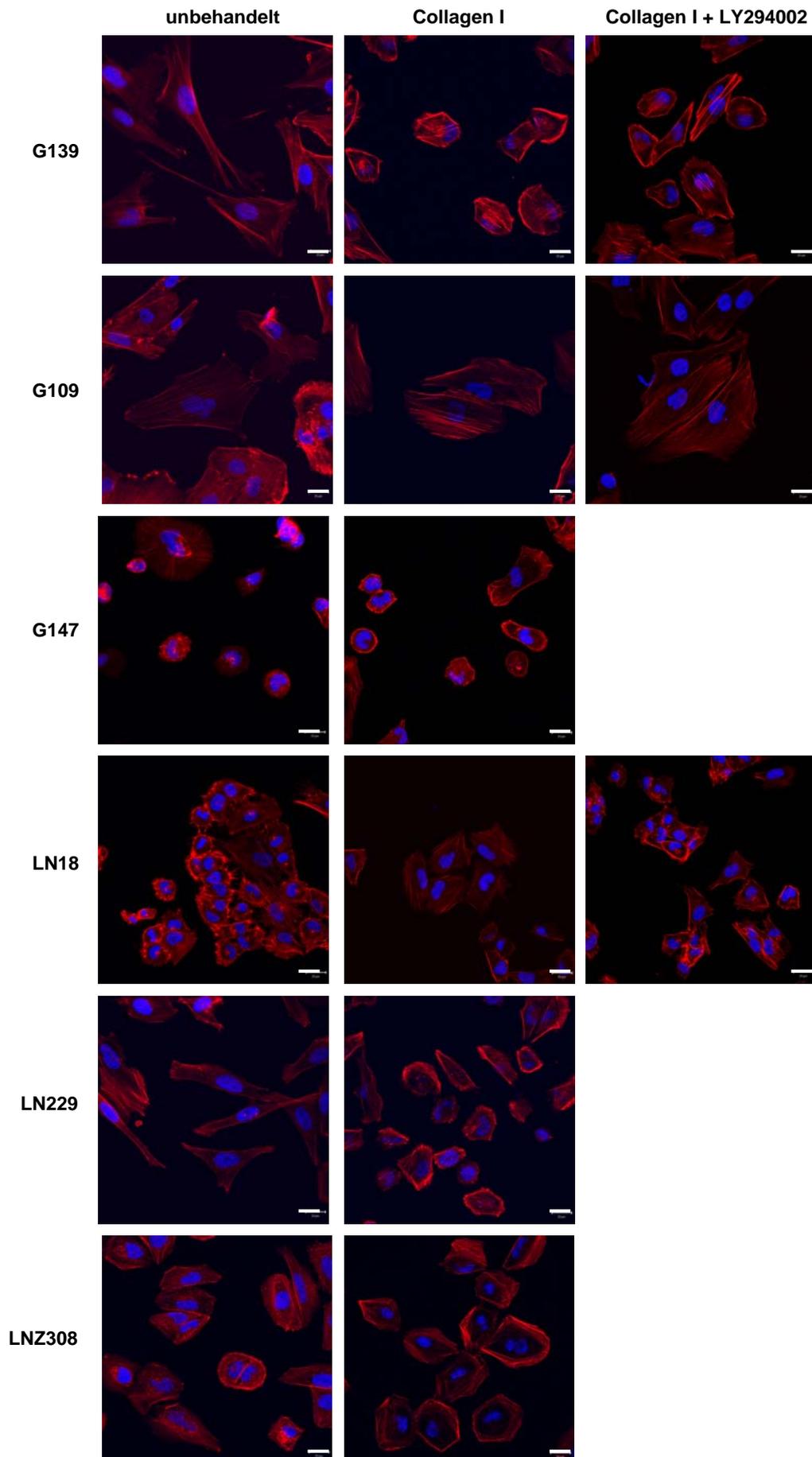


Abb. 5.35

6 Diskussion

Das Glioblastom ist der häufigste und bösartigste primäre Hirntumor beim erwachsenen Menschen. Es ist meist therapieresistent und führt innerhalb von einem Jahr zum Tod (Maher *et al.*, 2001). Zugleich macht sein ausgeprägt infiltratives Wachstum in das angrenzende gesunde Hirngewebe eine großzügige, operative Gewebeentfernung nahezu unmöglich und ist mit hauptverantwortlich für den schlechten Verlauf dieser Krankheit. Auf molekularer Ebene zählen Überexpression und Amplifikation des EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptor-Onkogens und Deletionen des Tumorsuppressors PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*) zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Glioblastomen (Ohgaki *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2001; Kleihues und Ohgaki, 1999). Beide Veränderungen führen zu funktionellen Konsequenzen in der intrazellulären Signaltransduktion, die unter anderem Zellproliferation, -überleben und -motilität betreffen (Vivanco und Sawyers, 2002; Prenzel *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des PI3K (Phosphatidylinositol-3'-Kinase)/Akt- und des MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinase)-Signalwegs auf das infiltrative und proliferative Verhalten von humanen glialen Tumorzelllinien untersucht. Beide Signalwege werden vom EGF-Rezeptor vermittelt, wobei der anti-apoptotische PI3K/Akt-Signalweg durch PTEN negativ reguliert wird (Cully *et al.*, 2006), und die MAP-Kinasen sowohl mitogene Signale vermitteln, als auch am Motilitätsprozess beteiligt sind (Kolch, 2005; Sebolt-Leopold und Herrera, 2004). Der Aktivierungsstatus dieser Signalwege in sechs Gliomzelllinien wurde ohne und unter Blockade von spezifischen chemischen Inhibitoren sowie nach Stimulation mit EGF in biochemischen Studien charakterisiert. Die Auswirkungen einer solchen Hemmung bzw. Aktivierung auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten wurden anschließend in funktionellen Studien untersucht.

6.1 Bedeutung der Aktivierung des PI3K- und p44/42 MAPK-Signalwegs

Der biochemische Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors sowie der nachgeschalteten PI3-Kinase- und p44/42 MAPK-Signalwege wurde in Western Blot-Analysen mittels phosphospezifischer Antikörper analysiert. Eine konstitutive Aktivierung des EGF-Rezeptors unter Serumentzug wurde dabei für keine der sechs etablierten Gliomzelllinien gezeigt, wobei drei davon (G139, LN18 und LN2308) eine starke Expression aufwiesen (Abb. 5.1). Bis auf LN229 konnten alle Zelllinien nach EGF-Stimulation an Tyrosin1086 von EGFR, das als Bindungsstelle für

GRB2 an der Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signalwegs beteiligt ist (Hynes und Lane, 2005; Rodrigues *et al.*, 2000), phosphoryliert werden. Dabei korrelierte der Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors nach Stimulation mit EGF sehr gut mit seiner Expression. Die drei Zelllinien mit Überexpression zeigten dementsprechend eine starke Aktivierung (Abb. 5.1).

Mit Ausnahme von LN18 war der Phosphorylierungsstatus der Proteinkinase B (PKB)/Akt, die durch die PI3-Kinase aktiviert wird (Cantley, 2002), unter Serumentzug gleichsinnig zum Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors nach EGF-Stimulation (Abb. 5.1 und Abb. 5.2). LN229 zeigte dementsprechend keine konstitutive Aktivierung von PKB/Akt (Abb. 5.2). LN18, die nach Inkubation mit EGF eine starke Phosphorylierung des EGF-Rezeptors aufwies, hatte hingegen eine verhältnismäßig schwache konstitutive Aktivierung von PKB/Akt (Abb. 5.2). Übereinstimmend aber mit dem Phosphorylierungsstatus von PKB/Akt unter Serumentzug verfügen LN18 und LN229 über ein funktionelles PTEN-Protein (Ishii *et al.*, 1999), welches der negative Regulator der PI3-Kinase ist und daher die Phosphorylierung von PKB/Akt (Cantley und Neel, 1999) inhibiert.

Wie erwartet konnte durch die Blockade der PI3-Kinase mittels LY294002 eine Phosphorylierung von PKB/Akt unterbunden werden (Abb. 5.2). Mit Ausnahme von LN2308 erwies sich die Hemmung des EGF-Rezeptors durch Tyrphostin AG1478 jedoch als vergleichbar effizient. Die konstitutive Aktivierung des PI3-Kinase-/Akt-Signalwegs scheint in den untersuchten Gliomzelllinien bis auf LN2308 abhängig vom Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors zu sein.

In allen sechs Zelllinien konnte unter serumfreien Bedingungen eine konstitutive Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase (p44/42 MAPK) beobachtet werden, wobei drei davon eine sehr starke Phosphorylierung zeigten (Abb. 5.3). Mit Ausnahme von G139 und G147 wurde hier eine inverse Korrelation zum Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors nach EGF-Gabe deutlich. Bei diesen beiden konnte sowohl eine starke Aktivierung des EGF-Rezeptors als auch eine starke konstitutive Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase festgestellt werden. PD98059, das die Aktivierung von MEK1 und damit die Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung der p44/42 MAPK verhindert (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995), hemmte, unter serumfreien Bedingungen, erwartungsgemäß die Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase in den Zelllinien. Interessanterweise erwies sich aber nach EGF-Stimulation eine Blockade von p44/42 MAPK mit dem EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478 effektiver als eine Hemmung mittels PD98059. Die Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase erfolgt über die EGFR-/Ras-/Raf-/MEK1/2-Signalkaskade (vgl. Abb. 2.2). Eine direkte Inhibierung des Zielmoleküls sollte effizienter im Vergleich zu einer Blockade mehrere Ebenen höher sein. Möglicherweise kompensiert aber eine zusätzliche EGF-Stimulation über mehrere Ebenen die direkte Hemmung der p44/42 MAP-Kinase. Mittels EGF ist der EGF-Rezeptor bereits aktiviert und kann so das Signal trotzdem bis zur p44/42 MAP-Kinase weiterleiten. Wird der EGF-Rezeptor jedoch selber inhibiert, kann er auch von dem Liganden EGF nicht aktiviert werden und die Signalweiterleitung kommt zum Erliegen.

Unter serumfreien Bedingungen zeigte sich mit Ausnahme von G139 und LN18 eine inverse Korrelation des Aktivierungsstatus von PKB/Akt und der p44/42 MAP-Kinase (Abb. 5.2 und Abb. 5.3). Zelllinien mit starker konstitutiver Aktivierung von p44/42 MAPK verfügten über eine verhältnismäßig schwache Phosphorylierung von PKB/Akt. Sowohl PKB/Akt als auch p44/42 MAPK sind an der Regulation verschiedener Zielproteine beteiligt, die u.a. Zellproliferation, -wachstum, -überleben und -motilität regulieren (Kolch, 2005; Sebolt-Leopold und Herrera, 2004; Vivanco und Sawyers, 2002). Die konstitutive Aktivierung bereits eines der beiden Signalwege kann somit das Überleben der Zellen sicherstellen und möglicherweise zu der Therapieresistenz in humanen glialen Tumoren beitragen. Bei G139 hingegen war sowohl p44/42 MAPK (ERK1/2, *extracellular regulated kinase 1 and 2*) als auch PKB/Akt stark konstitutiv aktiviert. Interessanterweise führte hier aber die spezifische Blockade der PI3-Kinase mittels LY294002 zugleich zu einer verminderten Aktivierung der p44/42 MAPK (vgl. Abb. 5.3). Dies spricht dafür, dass die PI3-Kinase in dieser Zelllinie sowohl den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg als auch den PKB/Akt-Signalweg zu aktivieren vermag.

Übereinstimmend zu den etablierten Gliomzelllinien wurde in den in dieser Arbeit untersuchten humanen glialen Tumoren und primären Zellkulturen ebenfalls die konstitutive Aktivierung sowohl des PI3K/Akt- als auch des p44/42 MAPK-Signalwegs nachgewiesen (Abb. 5.6., Abb. 5.7, Abb. 5.8 und Abb. 5.9). Diese Ergebnisse spiegeln die klinische Bedeutung dieses Überlebensmechanismus in glialen Tumoren wider. So wurde bei 55% der Gliome die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs nachgewiesen, wobei Gliom-Patienten mit aktiviertem PI3K/Akt-Signalweg eine deutlich kürzere Überlebensrate haben (Bellacosa *et al.*, 2005; Chakravarti *et al.*, 2004).

Der in den etablierten humanen Gliomzelllinien mittels Western Blot-Analysen ermittelte Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors (EGFR) konnte in der Immunfluoreszenz bestätigt werden (Abb. 5.5 und Anhang Abb. 8.1). Weder im Western Blot noch in der Immunfluoreszenz war unter serumfreien Bedingungen eine positive Immunreaktivität festzustellen. Nach EGF-Stimulation zeigten sich in Western Blot-Analysen für G139, LN18 und LN2308 stark positive immunreaktive Banden, für G109 und G147 schwach positive Banden, und für LN229 war keine Phosphorylierung nachzuweisen (Abb. 5.1). In den Immunfluoreszenzfärbungen konnte dies verifiziert werden (Abb. 5.5 und Anhang Abb. 8.1). Es zeigte sich jedoch, dass die in den Western Blot-Analysen qualitative Bewertung der Immunreaktivität quantitativen Ursprungs ist. Bei G139, LN18 und LN2308 wies in der Immunfluoreszenz jede Zelle eine positive Reaktion für phospho-EGFR auf (Abb. 5.5 und Anhang Abb. 8.1). Betrachtet man aber die positiven Zellen von G109 und G147, stellt man fest, dass sich die Stärke des Signals nicht von der in G139, LN18 und LN2308 unterscheidet. Tatsächlich ist in G109 und G147 nur ein Teil der Zellen positiv, wohingegen die restlichen Zellen negativ sind. Diese sind wiederum in den Proteinlysaten

für einen Verdünnungseffekt verantwortlich und führen so in Western Blot-Analysen zu einer schwächeren Immunreaktivität. Aus klinischer Sicht könnte dieses Ergebnis für Tumoren, die aus verschiedenen Populationen bestehen, von Bedeutung sein. Je nach Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors könnten die verschiedenen Tumorzellpopulationen unterschiedlich auf Chemotherapeutika ansprechen. Tumorpopulationen, die nicht auf das Therapeutikum reagieren, hätten einen Überlebensvorteil gegenüber denen, die darauf ansprechen, und wären der Ausgangspunkt für neue Rezidive nach erfolgter Behandlung. Interessanterweise zeigte sich in den Invasionsversuchen für G109, G147 und LN229, welche die Zelllinien mit geringem bzw. keinem Anteil an aktiviertem EGF-Rezeptor sind, eine höchst effiziente Verringerung der Invasion nach Hemmung des EGF-Rezeptors durch Tyrphostin AG1478 (Abb. 5.28).

Ein weiteres Ergebnis der Kinetikstudien mittels Doppel-Immunfluoreszenzanalysen war, dass die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch EGF ein sehr schneller Prozess ist. Bei LN18, LN2308 und G147 war bereits nach einer Minute, bei G109 und G139 nach drei Minuten eine positive Immunreaktion an der Zellmembran festzustellen (Abb. 5.5 und Anhang Abb. 8.1). Bei vier dieser Zelllinien zeigte sich eine Internalisierung des EGF-Rezeptors bereits nach fünf Minuten, was durch die Kollokalisierung mit der mit den frühen Endosomen assoziierten GTPase Rab5 nachweisbar war (Abb. 5.5 und Anhang Abb. 8.1). Die Messung des Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors in den Western Blot-Analysen fällt damit schon in den Zeitraum der Internalisierung, wobei verschiedene Arbeiten zeigen, dass die Signalweiterleitung von EGFR im Endosom bestehen bleibt und nicht abgebrochen wird (Schoeberl *et al.*, 2002; Sorkin *et al.*, 2000). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors in den Endosomen konnte auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Für G109 und G147 zeigten sich in der Immunfluoreszenz eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und seine Kollokalisierung mit Rab5 zuletzt in den Präparaten mit 15minütiger EGF-Inkubation. Für G139, LN18 und LN2308 war dies auch noch in den Präparaten mit 30min Inkubation zu sehen (Abb. 5.5 und Anhang Abb. 8.1). Diese Ergebnisse lassen also bei G109 und G147 auf eine zeitlich kürzere Signalweiterleitung und gegebenenfalls auch auf einen schnelleren Abbau des Rezeptors schließen. Unterschiedliche Transportkinetiken könnten für Unterschiede in der Signalantwort verantwortlich sein (Wiley, 2003; Hendriks *et al.*, 2003, Muthuswarny *et al.*, 1999; Olayioye *et al.*; 1998). Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch der weitere Verlauf des EGF-Rezeptors in den Gliomzelllinien. Über das Recycling-Endosom wird er entweder wieder an die Zellmembran zurücktransportiert oder über das späte Endosom im Lysosom degradiert (Miaczynska *et al.*, 2004b) (vgl. Abb. 2.3). Kinetikstudien mit Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen für phospho-EGFR und Rab4 und Rab11 bzw. Rab7 und Rab9 sollten Aufschluss über das Recycling bzw. über die Degradierung im späten Endosom geben.

6.2 Zentrale Stellung der PI3-Kinase im Proliferations-, Adhäsions-, Migrations- und Invasionsverhalten der glialen Tumorzellen

Der Einfluss von EGF, Tyrphostin AG1478 (EGFR-Inhibitor), LY294002 (PI3K-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) und PD98059 (p44/42 MAPK-Inhibitor) auf das Proliferations-, Adhäsions-, Migrations- und Invasionsverhalten wurde in sechs humanen glialen Zelllinien untersucht. Es zeigte sich, dass die PI3-Kinase eine zentrale Stellung einnahm.

Die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs spielt bei der Pathogenese verschiedener Tumortypen eine große Rolle, wobei dies bei 55% der Gliome nachgewiesen werden konnte (Luo *et al.*, 2003; Bellacosa *et al.*, 2005).

6.2.1 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für das proliferative Verhalten von Gliomzellen

Alle angewandten Inhibitoren konnten die Proliferation der untersuchten Gliomzelllinien in unterschiedlichem Maße verringern. Am effizientesten zeigte sich aber die Blockade der PI3-Kinase mit dem spezifischen Inhibitor LY294002. Die Proliferationsrate erstreckte sich dabei von 13,7% für LN18 bis 36,7% für G147 (Tab. 5.2). Die Inhibierung von mTOR und der p44/42 MAP-Kinase war jeweils nur für einzelne Zelllinien vergleichbar proliferationshemmend, jedoch unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von PKB/Akt, das mTOR aktiviert, und der p44/42 MAP-Kinase (Abb. 5.2 und Abb. 5.3). Ripple und Kollegen konnten in ihrer Arbeit an Mammakarzinom-Zelllinien ebenfalls zeigen, dass das Wachstum der Zellen nicht vom Aktivierungsstatus von PKB/Akt und p44/42 MAPK abhängig ist (Ripple *et al.*, 2005). Sogar eine 7tägige Hemmung der PI3-Kinase ließ die Zellen nicht absterben, führte aber zu einer verminderten Proliferationsrate. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferationsrate nach 3tägiger Inkubation mit den Inhibitoren bestimmt. Auch hier waren keine Anzeichen von einem Absterben der Zellen festzustellen. Wie in den Western Blot-Analysen gezeigt wurde, sind der PI3K/Akt- und der p44/42 MAPK-Signalweg in den Gliomzelllinien unterschiedlich aktiviert (Abb. 5.2 und Abb. 5.3). Möglicherweise schützt diese konstitutive Aktivierung der Signalwege die Zellen vor dem Zelltod und stellt ihr Überleben sicher.

Des Weiteren zeigte die Blockade des EGF-Rezeptors eine effizientere Proliferationshemmung für die Zelllinien mit niedriger EGF-Rezeptor-Expression (G109, G147 und LN229) als für die Zelllinien mit hoher EGF-Rezeptor-Expression (vgl. Tab. 5.2 und Abb. 5.1). Dieser Befund steht jedoch im Widerspruch zu Arbeiten, in denen das Ansprechen von EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren nicht mit dem Expressionsstatus des EGF-Rezeptors in Verbindung gebracht werden konnte (Goudar *et al.*, 2005; Rich *et al.*, 2004; Arteaga, 2003; Cappuzzo *et al.*, 2003). Eine

Erklärung könnte die Arbeit von Li *et al.* geben, die belegen konnte, dass die meisten Gliomzelllinien resistent gegenüber dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib sind. Eine Wachstumshemmung nach Behandlung mit Gefitinib konnte nur in Konzentrationen erreicht werden, die höher waren als diejenigen, die für eine Blockade der EGFR-Aktivierung notwendig waren (Li *et al.*, 2003). Möglicherweise führt eine höhere Tyrophostin AG1478-Konzentration in den Zelllinien mit hoher EGF-Rezeptor-Expression ebenfalls zu einer Hemmung der Proliferation.

6.2.2 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für das Adhäsionsverhalten von Gliomzellen

Zellmigration spielt eine entscheidende Rolle bei pathologischen Prozessen, so wie bei der Entstehung von Tumorrezidiven. Die Migration von Tumorzellen benötigt dabei das Zusammenspiel von zellulären Adhäsionsmolekülen, die durch Umgestaltung des Aktinzytoskeletts die Adhäsion am vorderen Ende der Zelle („leading edge“) und den Kontaktverlust zur Matrix am hinteren Ende der Zelle („trailing edge“) steuern (Friedl und Wolf, 2003; Lauffenburger und Horwitz, 1996). In der vorliegenden Arbeit hatte das Substrat, auf dem die Gliomzelllinien ausgesät waren, entscheidenden Einfluss auf das Motilitätsverhalten. So zeigte sich im Motilitätsversuch mittels Echtzeitmikroskopie für G109 auf Collagen I eine um mehr als 60% gesteigerte Motilitätsrate als im Vergleich zu einer poly D-Lysin-Beschichtung (Abb. 5.20).

In Adhäsionsversuchen wurde 1h nach Aussaat auf verschiedene Substrate die Zellzahl gemessen. Für Collagen I konnte hierbei in den Gliomzelllinien eine erhöhte Adhäsionsrate gemessen werden (Abb. 5.14). Das Ausmaß der Zelladhäsion hängt von der Konzentration der Integrine und Proteine der extrazellulären Matrix ab (Palecek *et al.*, 1997). Je geringer die Konzentration dieser Proteine und Integrine ist, desto schwächer ist die Bindung der Zellen an ihr Substrat und die Zugkraft, mit der sich eine Zelle fortbewegt. Eine ausgeglichene Umsatzrate der einzelnen Adhäsions- und Deadhäsionsvorgänge führt dabei zu einer optimalen Migrationsrate (Palecek *et al.*, 1997; Lauffenburger und Horwitz, 1996). Die hier gezeigte Erhöhung der Motilität auf Collagen I ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei diesem Protein das notwendige Maß an Adhäsions- und Deadhäsionsvorgängen gewährleistet war.

Fluoreszenzfärbungen von F-Aktin zeigten darüber hinaus, dass es auf einer Collagen I-Matrix zu einem Umbau des Aktinzytoskeletts kam. Auf einem unbeschichteten Substrat wiesen G109, G139 und LN229 eine fibroblastenähnliche, d.h. spindelförmige Zellform auf (Abb. 5.35). Bei G109 und G139 waren dabei in hoher Anzahl Aktinfasern zu erkennen, bei LN229 waren diese geringer ausgeprägt (Abb. 5.35). Auf Collagen I änderte sich dieser Morphotyp zu einer weniger länglich ausgeprägten Zellform. Bei G139 zeigte sich dabei eine verstärkte Akkumulation von F-Aktin an einer Stelle am Zytoplasmarrand (Lamellipodium). Der Zellkern befand sich auf der entgegengesetzt liegenden Seite (Abb. 5.35). In den Motilitätsuntersuchungen mittels

Lebendzellbeobachtung auf einem Collagen I-Substrat konnte übereinstimmend hierzu festgestellt werden, dass sich das Lamellipodium am vorderen Ende („leading edge“) in Bewegungsrichtung der Zelle befand und der Zellkern am hinteren Ende („trailing edge“) lokalisiert war (Polarisierung der Zelle). G139 zeigte ein hohes Maß an gerichteter Migration und hatte einen hohen Anteil an motilen Zellen (93,0%; Abb. 5.21). Bei LN229 war das F-Aktin vorwiegend gleichmäßig am Zytoplasmarrand verteilt und der Zellkern befand sich in der Mitte des Zytoplasmas. Hier kam es nicht zu einer Ausbildung eines Lamellipodiums und somit zu einem „leading edge“. Die geringe Motilitätsrate mit 14,4% spiegelt dies wider (Abb. 5.21).

Ähnliche Befunde zeigten sich für G147, LN18 und LN2308, bei denen sich das F-Aktin auf einem unbeschichteten Substrat ringförmig und diffus im Zytoplasma verteilte. Auf Collagen I bildeten G147 und LN2308 kein Lamellipodium aus und hatten geringe Motilitätsraten von 37,9% bzw. 5,0% (Abb. 5.35; Abb. 5.21). Bei der Zelllinie LN18 mit einem hohen Anteil von 71,7% motilen Zellen kam es zur Ausbildung eines Lamellipodiums und zur Lokalisation des Zellkerns an der gegenüberliegenden Seite. Auffallend war hier auch der Verlust der Zell-Zell-Kontakte, der zu der hohen Motilitätsrate beigetragen haben dürfte. So konnten Arbeiten in Mammakarzinomzelllinien zeigen, dass Mutationen in dem Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin zu einer Abnahme der Zelladhäsion und einhergehend damit zu einer gesteigerten Motilität führen (Luber *et al.*, 2000, Handschuh *et al.*, 1999). Weiterführende Untersuchungen zum Status von Adhäsionsmolekülen in den Gliomzelllinien könnten hierbei Aufschluss geben, welche Bedeutung diese für das Motilitätsverhalten haben.

Die Hemmung der PI3-Kinase hatte in den Gliomzelllinien sowohl eine Abnahme der Motilitätsrate als auch eine verringerte Adhäsionsrate zur Folge (Tab. 5.4., Tab. 5.5, Tab. 5.8 und Abb. 5.23). Qian *et al.* stellten in Hühnerembryofibroblasten fest, dass die Aktivierung der PI3-Kinase den Umbau der Aktinfilamente induzierte und dadurch die Zellmigration gesteigert wurde (Qian *et al.*, 2004). Anhand eigener Versuche konnte nach Blockade der PI3-Kinase bei der Zelllinie LN18 ebenfalls eine Veränderung des Aktinzytoskeletts nachgewiesen werden (Abb. 5.35). So kam es auf einer Collagen I-Matrix nach der Inkubation von LY294002 (PI3K-Inhibitor) nicht mehr zur Ausbildung eines Lamellipodiums und auch nicht mehr zu vermehrten Zell-Zell-Kontakten. Beides führt zu einer reduzierten Migration (Lauffenburger und Horwitz, 1999; Luber *et al.*, 2000).

Zusammengefasst zeigen diese Befunde, dass das korrekte Zusammenspiel der Zelladhäsionsmoleküle sowie ihre Interaktion mit dem Aktinzytoskelett notwendig für eine effiziente Migration der Gliomzelllinien sind. Der Tumorsuppressor PTEN und die PI3-Kinase scheinen dabei in den Prozess der Zellpolarisierung involviert zu sein (Janetopoulos *et al.*, 2004). Chemotaxisuntersuchungen in *Dictyostelium discoideum* zeigten die Lokalisation der PI3-Kinase und ihres Produkts PIP3 am vorderen Ende („leading edge“) von migrierenden Zellen, wobei sich PTEN ausschließlich an den Seiten und am hinteren Ende des Zellkörpers befand. In ruhenden Zellen

hingegen verteilte sich die PI3-Kinase gleichmäßig im Zytoplasma und PTEN über den gesamten Zellrand (Iijima *et al.*, 2002; Funamoto *et al.*, 2002). Inwiefern diese Befunde auf die Situation in den Gliomzelllinien zutreffen bleibt zu klären.

6.2.3 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalwegs für das Migrations- und Invasionsverhalten von Gliomzellen

Gliomzellen, die aus der soliden Tumormasse in das umgebende gesunde Gehirngewebe hineinwandern, tragen hauptsächlich zur Therapieresistenz der meisten Glioblastome bei (Maher *et al.*, 2001). Deshalb wurde die Bedeutung des EGF-Rezeptors sowie des nachgeschalteten PI3-Kinase/Akt- und des p44/42 MAPK-Signalwegs auf das Migrations- und Invasionsverhalten von humanen Gliomzelllinien untersucht.

6.2.3.1 Die Blockade des PI3K/Akt-Signalwegs führt zu einer verringerten Migration

Im Wundheilungsversuch konnten alle verwendeten Inhibitoren die Migration der Gliomzelllinien herabsetzen. Am effektivsten erwies sich aber die Hemmung der PI3-Kinase mit LY294002. Der Anteil der migrierten Zellen nahm in allen Zelllinien um mehr als die Hälfte ab (Tab. 5.8 und Abb. 5.18). Eine Blockade mit Rapamycin des ebenfalls am PI3-Kinase-Signalweg beteiligten mTORs war auch sehr effizient: Die Migrationsrate wurde in allen Zelllinien um mehr als ein Drittel gesenkt.

Sowohl der PI3K/Akt- als auch der p44/42 MAPK-Signalweg werden über den EGF-Rezeptor aktiviert (Cully *et al.*, 2006, Sebolt-Leopold und Herrera, 2004). Die Stimulation mit EGF hatte in allen Zelllinien eine Zunahme der Migrationsrate zur Folge (Abb. 5.17). Die Blockade des EGF-Rezeptors ergab jedoch nur für G147 und LN18 vergleichbare Befunde wie die Hemmung der PI3-Kinase. Die Inhibierung der p44/42 MAP-Kinase war hingegen weniger erfolgreich. Eine effiziente Verringerung der Migration erfolgte also nur durch Hemmung des PI3-Kinase-Signalwegs. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Migrationsverhalten in den Gliomzelllinien über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert wird. Dafür sprechen auch die Befunde der Motilitätsversuche mittels Lebendzellbeobachtung nach Echtzeitmikroskopie. Die Stimulierung mit EGF führte hier ebenfalls zu einer erhöhten und die Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs zu einer verringerten Motilitätsrate (Abb. 5.22 und Abb. 5.23). Die Herunterregulierung von PTEN mittels siRNA in einer Zelllinie mit normalem PKB/Akt-Status und funktionellem PTEN (Ishii *et al.*, 1999) hatte erwartungsgemäß eine erhöhte Motilität zur Folge (Abb. 5.32). Durch den Funktionsverlust von PTEN, dem Inhibitor der PI3-Kinase, wird der intrazelluläre PIP3-Level erhöht

(Cantley und Neel, 1999). Dies resultiert in einer übermäßigen Phosphorylierung von PKB/Akt und damit auch in einer Verstärkung der von PKB/Akt regulierten zellulären Prozesse (Brazil *et al.*, 2002).

Übereinstimmend zu den vorliegenden Daten zeigten Joy und Kollegen in ihrer Arbeit, dass die Proteinkinase B (PKB/Akt), die von der PI3-Kinase phosphoryliert wird, in migrierenden Gliomzellen aktiviert ist (Cully *et al.*, 2006; 2002; Joy *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde in zwei der vier Glioblastome, bei denen getrennte Proben aus dem soliden Tumor und aus der Infiltrationszone untersucht wurden, eine deutlich stärkere Aktivierung von PKB/Akt im Bereich der infiltrierenden Zellen als in der Tumormasse festgestellt. Der Phosphorylierungsstatus von PKB/Akt scheint also entscheidenden Einfluss auf das Migrations- und Invasionsverhalten glialer Tumorzellen zu haben. Die klinische Relevanz des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs in Glioblastomen konnten Chakravarti und Kollegen in einer Studie an 92 Patienten zeigen (Chakravarti *et al.*, 2004). So war die Aktivierung von PI3K, PKB/Akt und der p70S6-Kinase, die von mTOR phosphoryliert wird, in Glioblastomen signifikant häufiger zu finden als in niedergradigen Astrozytomen. Der aktivierte PI3-Kinase-Signalweg korrelierte sogar mit einem kürzerem Überleben der Patienten (Chakravarti *et al.*, 2004).

6.2.3.2 Die Blockade des EGFR/PI3K/Akt-Signalwegs führt zu einer reduzierten Invasion

Das Invasionsverhalten der Gliomzelllinien wurde mittels der „modifizierten Boydenkammer“ im dreidimensionalen Raum untersucht (Albini *et al.*, 1997). Es zeigte sich, dass alle Zelllinien die Fähigkeit hatten durch die mit ECM (*extracellular matrix basement membrane*, „Matrigel“) überschichteten Membranporen auf die Unterseite des Filters zu gelangen.

Die sechs untersuchten Gliomzelllinien ließen sich hinsichtlich ihres Invasionsverhaltens in zwei Gruppen einteilen. Zelllinien mit niedrigem EGF-Rezeptorstatus (vgl. Abb. 5.1) reagierten höchst sensitiv auf eine Blockade mit dem EGF-Rezeptor-Inhibitor Tyrphostin AG1478 (Abb. 5.28). Hierbei handelte es sich um G109, G147 und LN229, deren Invasionsrate äußerst effektiv auf 10,3% und weniger gesenkt wurde (Tab. 5.15).

Für die Zelllinien mit einem hohen EGFR-Status (d.h. für G139, LN18 und LN2308), aber auch für LN229, zeigte sich hingegen die Blockade des PI3-Kinase-Signalwegs als sehr effizient (Abb. 5.27). Sowohl die Hemmung der PI3-Kinase als auch die Hemmung des nachgeschalteten mTORs führten zu einer stark reduzierten Invasivität (Tab. 5.15). LN229, eine Zelllinie ohne EGFR-Expression und normalem PKB/Akt-Status, reagierte gleichermaßen sensibel sowohl auf die Blockade des EGF-Rezeptors als auch auf die Inhibierung der PI3-Kinase (Abb. 5.1, Abb. 5.2, Abb. 5.27 und Abb. 5.28).

Eine Inhibierung des p44/42 MAP-Kinase-Signalwegs mittels PD98059 führte in den Zelllinien ebenfalls zu einer verringerten Invasionsrate. Jedoch konnte hier keine vergleichbare Bedeutung für das Invasionsverhalten der Gliomzellen wie bei einer Blockade des EGF-Rezeptors oder des PI3-Kinase-Signalwegs festgestellt werden (Tab. 5.15, Abb. 5.27 und 5.28).

Western Blot-Analysen zeigten, dass der PI3-Kinase-Signalweg bei G139, LN18, LN229 und LN2308, also den Zelllinien, die mit einer stark reduzierten Invasivität auf die Blockade der PI3-Kinase reagierten, nicht bzw. nur gering aktiviert ist (Abb. 5.30). Die erfolgreiche Beeinflussung des Invasionsverhaltens scheint in diesen Zelllinien vom Aktivierungsstatus der PI3-Kinase abhängig zu sein.

Der Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors hatte allerdings keinen Einfluss auf das Ansprechen einer wirksamen Verringerung der Invasionsrate nach Blockade der Signalwege (Abb. 5.29). Doppel-Immunfluoreszenzanalysen nach EGF-Stimulation zeigten jedoch eine unterschiedliche Kinetik in der Internalisierung und im Abbau des aktivierten EGF-Rezeptors. So konnte für G109 und G147 in der Immunfluoreszenz der phosphorylierte EGF-Rezeptor zuletzt in den Präparaten mit 15minütiger EGF-Stimulation festgestellt werden, wohingegen dies für G139, LN18 und LN2308 auch noch in den Präparaten mit 30min Inkubation zu sehen war (Abb. 5.5 und Anhang Abb. 8.1). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass der EGF-Rezeptor nach Aktivierung internalisiert und zu den frühen Endosomen, mit denen die kleine GTPase Rab5 assoziiert ist, transportiert wird (Benmerah, 2004; Clague und Urbé, 2001). Im frühen Endosom erfolgt die Sortierung entweder in das Recycling-Endosom, das den Rezeptor wieder an die Zellmembran zurücktransportiert, oder in das späte Endosom, das den Abbau im Lysosom steuert (Miaczynska *et al.*, 2004b). Die Ergebnisse aus den Kinetikstudien weisen darauf hin, dass die zeitlich kürzere Signalweiterleitung und der schnellere Abbau des aktivierten EGF-Rezeptors in den Zelllinien G109 und G147 ein Grund für das bessere Ansprechen auf eine EGFR-Blockade sein könnte.

Zusammengefasst sprechen diese Befunde dafür, dass in den Gliomzelllinien unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sind, die das Invasionsverhalten nach Blockade des EGF-Rezeptors und des PI3-Kinase-Signalwegs steuern.

6.2.4 Vergleich der Migrationsuntersuchungen in den Gliomzelllinien hinsichtlich der vier verwendeten Versuchsansätze

Das Migrationsverhalten der sechs Zelllinien zeigte in Bezug auf den verwendeten Versuchsansatz eine sehr große Varianz. So erstreckte sich die Migrationsrate im Wundheilungsversuch zwischen 50,8% und 92,1%. In der Lebendzellbeobachtung mittels Echtzeitmikroskopie konnten Werte von 5,0% bis zu 93,0% motiler Zellen beobachtet werden. In den dreidimensionalen

Migrations- und Invasionsversuchen mittels modifizierter Boydenkammer lag die Migrationsrate zwischen 29,9% und 47,1% und die Invasionsrate zwischen 10,3% und 26,6% (Tab. 6.1 und Abb. 6.1). Der Dynamikumfang bei den zweidimensionalen Methodenansätzen war somit größer als der bei den dreidimensionalen. Die Fähigkeit zur Invasion scheint ein spezifisches Merkmal von Gliomzellen zu sein. Dies spiegelt auch die klinische Situation wider: Das ausgeprägt infiltrative Wachstum in das angrenzende gesunde Hirngewebe macht eine operative Gewebeentfernung nahezu unmöglich und ist mit hauptverantwortlich für die Therapieresistenz dieser Krankheit (Maher *et al.*, 2001).

Des Weiteren erwiesen sich Invasion und Motilität als unabhängige Parameter in den Gliomzelllinien. Es ließ sich keine Korrelation zwischen der Migrationsrate im Wundheilungsversuch, der Motilitätsrate in der Lebendzellbeobachtung und der Migrations- und Invasionsrate in der modifizierten Boydenkammer nachweisen (vgl. Tab. 6.1 und Abb. 6.1). So konnte beispielsweise die Zelllinie LN229 im Wundheilungsversuch mit einem Anteil von 81,4% migratorischer Zellen als eine der hochmotilen Zelllinien bewertet werden, wohingegen sie sich in der Lebendzellbeobachtung mittels Echtzeitmikroskopie mit einer Motilitätsrate von 14,4% als eher gering motil erwies. Umgekehrt war bei G139 der Anteil motiler Zellen von 93,0% in der Echtzeitmikroskopie um einiges höher als im Wundheilungsversuch mit einem Anteil migratorischer Zellen von 60,6%. Im dreidimensionalen Raum mittels modifizierter Boydenkammer lag die Migrationsrate hingegen bei 47,1%. Diese Abweichungen könnten auch auf die unterschiedliche Methodik zurückzuführen sein (Friedl und Wolf, 2003).

Tab. 6.1: Vergleich Migrations-, Motilitäts- und Invasionsrate von Gliomzellen aus vier verschiedenen Versuchsansätzen.

	G139	G109	G147	LN18	LN229	LNZ308
Migration 2D im Wundheilungsversuch	60,6%	92,1%	58,3%	59,6%	81,4%	50,8%
Migration 3D in der Boydenkammer	47,1%	29,9%	49,7%	36,7%	34,3%	38,7%
Motilität 2D in der Echtzeitmikroskopie	93,0%	66,7%	37,9%	71,7%	14,4%	5,0%
Invasion 3D in der Boydenkammer	17,7%	21,6%	10,3%	21,6%	11,8%	26,6%

Angegeben ist jeweils der absolute prozentuale Anteil migrierter, motiler und invasiver Zellen wie er in den vier verschiedenen Versuchsanordnungen mittels Wundheilungsversuch (Migration 2D), Motilitätsversuch mittels Lebendzellbeobachtung (Motilität 2D), Migrationsversuch in der modifizierten Boydenkammer (Migration 3D) und Invasionsversuch in der modifizierten Boydenkammer (Invasion 3D) bestimmt wurde.

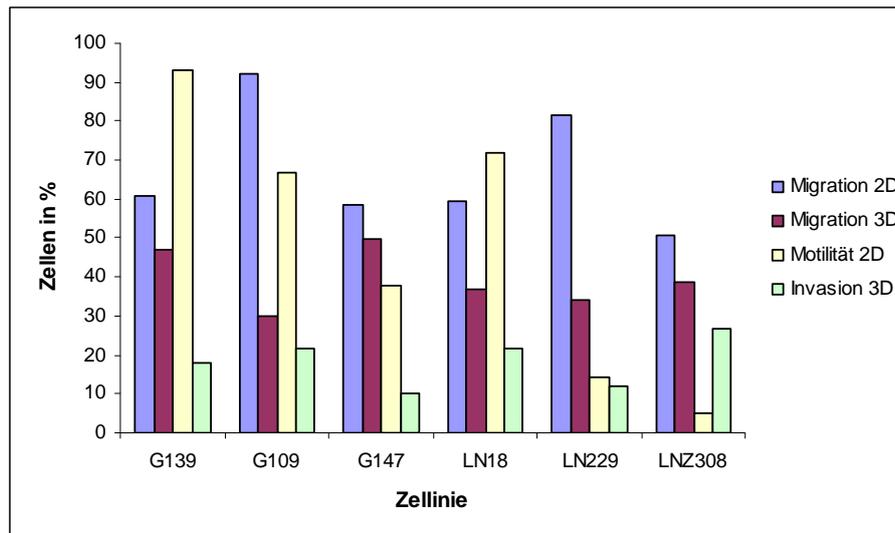


Abb. 6.1: Vergleich des Migrations-, Motilitäts- und Invasionsverhalten der Gliomzelllinien.

Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil migratorischer, motiler und invasiver Zellen wie er in den vier verschiedenen Versuchsansätzen ermittelt wurde. Es zeigte sich, dass innerhalb einer Zelllinie eine große Varianz zwischen den einzelnen Methodikansätzen besteht. Deutlich ist auch zu sehen, dass der Dynamikumfang bei den dreidimensionalen Versuchsanordnungen deutlich geringer ist als bei den zweidimensionalen. Dies weist darauf hin, dass die Invasionskapazität ein spezifisches Merkmal von Gliomzellen ist.

(Migration 2D: Migrationsuntersuchungen mittels Wundheilungsversuchen; Migration 3D: Migrationsuntersuchungen mittels modifizierter Boydenkammer im dreidimensionalen Raum; Motilität 2D: Motilitätsuntersuchungen mittels Lebendzellbeobachtung in der Echtzeitmikroskopie; Invasion 3D: Invasionsuntersuchungen mittels modifizierter Boydenkammer im dreidimensionalen Raum).

Im Wundheilungsversuch wurde die Fähigkeit der Zellen ermittelt einen künstlich zugefügten Spalt im Zellrasen durch Migration teilweise oder ganz zu schließen. Diese Versuche fanden im zweidimensionalen Raum in Zellkulturschalen ohne zusätzliche Beschichtung statt. Eine Einschränkung der Bewertung der Ergebnisse ergab sich aufgrund der Tatsache, dass die eingesetzten signalwegsspezifischen Inhibitoren auch eine proliferationshemmende Wirkung hatten (Abb. 5.13). So war in den Präparaten, die z.B. mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 behandelt worden waren, der ursprünglich gezogene Spalt im Zellrasen noch deutlich erkennbar. In den Kontrollen war diese Lücke hingegen vollständig überwachsen und die ehemaligen Grenzen nur schwer identifizierbar. Hier zeigte sich auch eine höhere Zelldichte als bei einer Behandlung mit den Inhibitoren (vgl. Abb. 5.19). Zellen, die in den Zellspalt hineingewandert sind, durchlaufen möglicherweise noch weitere Zellteilungen und erhöhen somit die tatsächliche Migrationsrate zum Zeitpunkt der Auswertung.

Mit dem Motilitätsversuch mittels Lebendzellbeobachtung in der Echtzeitmikroskopie wurde eine zuverlässigere Methode verwendet. Auf einem Collagen I-Substrat ausgesäte Zellen wurden unter Standardzellkulturbedingungen in einer an ein konfokales Laserscanningmikroskop

angeschlossenen Inkubationskammer gehalten. Über die Mikroskopsoftware gesteuert ergab sich ein Zeitrafferfilm über 8h und die Auswertung erfolgte quantitativ mit dem Zeichenprogramm der Mikroskopsoftware. Zellen wurden als motil bewertet, wenn sie innerhalb dieses Beobachtungszeitraums ihre ursprüngliche Adhärenzstelle vollkommen verlassen hatten. Der Vorteil dieser Methode besteht hier vor allem in ihrer Objektivität. Durch die Echtzeitmikroskopie wurde jede einzelne Zelle bewertet und Zellen, die sich während des Versuchs in Teilung befanden, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Im Wundheilungsversuch und Motilitätsversuch mittels Lebendzellbeobachtung wurde der Anteil motiler Zellen auf zweidimensionaler Ebene bestimmt. Der Nachteil für beide Versuchsanordnungen besteht jedoch darin, dass dies nicht der tatsächlichen Situation im Gehirngewebe entspricht. Im zweidimensionalen Raum ist der Migrationsprozess von Adhäsions- und Deadhäsions-Prozessen abhängig (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Im dreidimensionalen Raum hingegen sind die Zellen in eine extrazelluläre Matrix eingebettet und treten in direkten Kontakt mit den sie umgebenden Strukturen. Fortbewegungsprozesse werden hier also von morphodynamischen Mechanismen gesteuert und beinhalten auch die Invasion von natürlichen Gewebearrieren (z.B. Basalmembran) (Friedl und Wolf, 2003).

Aus diesen Gründen wurde das Migrations- und Invasionsverhalten der Zelllinien im dreidimensionalen Raum mittels eines modifizierten Boydenkammer-Zellkultursystems untersucht. Hier wurde die Fähigkeit der Zellen bestimmt durch die Poren der Filtermembranen auf die Unterseite zu gelangen.

Für die Bestimmung der Migrations- und Invasionsrate im modifizierten Boydenkammerversuch wurden hierbei folgende Überlegungen in Betracht gezogen. In bisher veröffentlichten Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen wurde bei Invasionsversuchen mittels modifizierter Boydenkammer immer nur eine Seite des Filters ausgewertet. So wurden die Zellen von der Oberseite der Membran weggewischt und die auf der Unterseite verbliebenen Zellen gefärbt und lichtmikroskopisch ausgezählt (Nicolle *et al.*, 2006; Yoeli-Lerner *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2004; Worthylake und Burrige, 2003; Giehl *et al.*, 2000; Maier *et al.*, 1999). Aufgrund eigener Versuche mit dieser Methode wurde jedoch festgestellt, dass dieses Verfahren in der Genauigkeit eingeschränkt war. Einerseits wurde die Proliferation der Zellen außer Acht gelassen und andererseits lieferte die Lichtmikroskopie keine gute Differenzierung. Behandlungen mit signalwegspezifischen Inhibitoren beeinflussen auch das Zellwachstum (Abb. 5.13). Die Anzahl der Zellen auf der Unterseite des Filters mit den Kontrollen konnte bereits aus dem Grund höher sein, da hier keine Wachstumseinschränkung wie bei den verwendeten Inhibitoren vorlag. Bei lichtmikroskopischer Auswertung bestand zudem aufgrund der geringeren Auflösung der einzelnen Ebenen das Problem, dass Zellen, die nicht von der Filteroberseite entfernt werden konnten, den Zellen der Unterseite zugerechnet wurden und so ein falsch positives Ergebnis ergeben konnten. Aufgrund dessen wurde hier eine neuartige Methode zur Auswertung von modifizierten

Boydenkammerversuchen etabliert. Die Filtermembranen wurden mittels optischer Schnittbildtechnik der konfokalen Laserscanningmikroskopie ausgewertet, indem der gesamte Filter in Stapeln von je 18 Einzelbildern aufgenommen wurde. Der Vorteil eines solchen Vorgehens ist, dass sowohl die Zellen auf der Membranunterseite als auch die Zellen auf der Oberseite erhalten bleiben und ausgewertet werden können. So wurde die Anzahl der Zellen auf beiden Seiten ermittelt und zueinander in Bezug gesetzt werden. Die Auszählung der Zellen erfolgte semiautomatisch mittels quantitativer Bildanalyse.

Im dreidimensionalen modifizierten Boydenkammerversuch wurde die Migrationsfähigkeit der Zellen auf unbeschichteten Filtern untersucht und die Invasionsfähigkeit auf Filtern, die mit einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (ECM, „Matrigel“) beschichtet waren. Durch die Beschichtung mit ECM sollte sich der tatsächlichen Situation im Gehirngewebe experimentell angenähert werden. Im Gegensatz zur Migration ist die Invasion ein aktiver Prozess, in dem die Zellen die die Filterporen umschließende extrazelluläre Matrix erst auflösen müssen um auf die untere Seite des Filters zu kommen. Im Migrationsversuch ohne Beschichtung der Filter könnten Zellen, die sich bei der Aussaat direkt über einer Filterpore festsetzen, ungerichtet, d.h. aufgrund eines zufälligen Migrationsprozesses, auf die Unterseite des Filters gelangen. Dafür sprechen auch die höheren Werte der Migrationsrate im Vergleich zur Invasionsrate (vgl. Tab. 6.1).

Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass die in der vorliegenden Arbeit unterschiedlich erhaltenen Migrationsraten unter anderem auf die verschiedenen Versuchsanordnungen zurückzuführen sein könnten. Beim Wundheilungsversuch kann es aufgrund des proliferationshemmenden Einflusses der signalwegsspezifischen Inhibitoren zu Einschränkungen in der Bewertung der Ergebnisse kommen. Der dreidimensionale Migrationsversuch in der modifizierten Boydenkammer nähert sich zwar der tatsächlichen Situation im Gehirn an, ist aber durch einen möglichen ungerichteten Migrationsvorgang aufgrund der fehlenden Beschichtung der Filter ebenfalls eingeschränkt. Aus den oben genannten Gründen scheinen der Motilitätsversuch mittels Lebendzellbeobachtung und der Invasionsversuch in der modifizierten Boydenkammer die zuverlässigsten Ergebnisse zu liefern.

6.3 Ausblick

In der Gesamtheit lässt sich feststellen, dass Proliferation, Migration und Invasion in den Gliomzelllinien voneinander unabhängige Parameter sind. Die Blockade des PI3K/Akt-Signalwegs zeigte sich in allen Versuchsanordnungen als sehr effizient. Für die Mehrheit der Zelllinien konnte eine Verminderung des jeweiligen tumorbiologischen Verhaltens nachgewiesen werden. Das erfolgreiche Ansprechen auf diese Inhibierung aufgrund des Phosphorylierungsstatus des PI3-

Kinase- und des p44/42 MAPK-Signalwegs konnte jedoch nicht zuverlässig vorhergesagt werden. Auch auf klinischer Ebene ist die Vorhersage des Ansprechens einer Therapie anhand nur eines einzelnen Markers nicht möglich. Hier scheint das Zusammenspiel mehrerer molekularer Faktoren verantwortlich zu sein, das zur Therapieresistenz glialer Tumoren führt. Mögliche Ursachen hierfür könnten in der durch verschiedene Mechanismen vermittelten Aktivierung der Signalwege liegen (Nicholas *et al.*, 2006).

Mellinghoff *et al.* konnten in ihrer Studie an Gliompatienten zeigen, dass eine erfolgreiche Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren auf eine Koexpression der EGFRvIII-mutierten Variante des EGF-Rezeptors und des Tumorsuppressors PTEN zurückzuführen ist (Mellinghoff *et al.*, 2005; Mellinghoff *et al.*, 2007). Weitere Untersuchungen zum PTEN- und EGFRvIII-Status in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gliomzelllinien würden beitragen, ob dieser Befund auch hier zutrifft, und somit die experimentelle Grundlage für die Aufklärung weiterer therapeutischer Zielmoleküle bereiten.

Wie die Befunde aus den Invasionsversuchen gezeigt haben, ist das erfolgreiche Ansprechen nicht nur alleine vom EGF-Rezeptorstatus abhängig, sondern auch von der nachgeschalteten PI3-Kinase (Abb. 5.1, Abb. 5.27, Abb. 5.28 und Abb. 5.30). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass sowohl der PI3K/Akt- als auch der p44/42 MAPK-Signalweg in den Gliomzelllinien aktiviert sind (Abb. 5.2 und Abb. 5.3). Die Aktivierung mindestens eines dieser Signalwege trägt möglicherweise zur Therapieresistenz in glialen Tumoren bei. Eine Kombinationstherapie könnte hier zu einer besseren Effizienz führen als eine Einzelkomponententherapie. Verschiedene experimentelle Arbeiten haben gezeigt, dass die gleichzeitige Blockade des EGF-Rezeptors und der PI3-Kinase sowie des Ras/MAPK- und des PI3-Kinase-Signalwegs äußerst erfolgreich war (Edwards *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Goudar *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2003; She *et al.*, 2003). In diesen Studien wurden jedoch maximal drei Zelllinien parallel untersucht, so dass die Aussagekraft in Anbetracht der Komplexität der Signalwege glialer Tumorzellen eingeschränkt bleibt. Außerdem wurden in den meisten dieser Arbeiten nur Teilaspekte des tumorbiologischen Verhaltens betrachtet, d.h. es wurde nur das Proliferations- oder das Migrations-/Invasionsverhalten der Zelllinien bestimmt. Die in dieser Arbeit untersuchten sechs Gliomzelllinien und etablierten Methoden könnten in ihrer Gesamtheit weitere Klarheit über die Effekte einer Kombinationstherapie bieten.

7 Literaturverzeichnis

- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1997;**47**:3239-45.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1995;**270**:27489-94.
- Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005;**24**:7455-64.
- Arteaga CL. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* 2003;**284**:122-30.
- Arteaga CL, Baselga J. Tyrosine kinase inhibitors: why does the current process of clinical development not apply to them? *Cancer Cell* 2004;**5**:525-31.
- Baumann P, West SC. DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:14066-70.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2003;**361**:323-31.
- Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005;**94**:29-86.
- Benmerah A. Endocytosis: signaling from endocytic membranes to the nucleus. *Curr Biol* 2004;**14**:R314-6.
- Bishayee A, Beguinot L, Bishayee S. Phosphorylation of tyrosine 992, 1068, and 1086 is required for conformational change of the human epidermal growth factor receptor c-terminal tail. *Mol Biol Cell* 1999;**10**:525-36.
- Bradford M. A rapid and sensitive method to the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248-54.
- Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 2002;**111**:293-303.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;**296**:1655-7.
- Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**:4240-5.
- Cappuzzo F, Gregorc V, Rossi E, Cancellieri A, Magrini E, Paties CT, Ceresoli G, Lombardo L, Bartolini S, Calandri C, de Rosa M, Villa E, Crino L. Gefitinib in pretreated non-small-cell lung cancer (NSCLC): analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic NSCLC. *J Clin Oncol* 2003;**21**:2658-63.
- Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:4947-51.
- Chakravarti A, Zhai G, Suzuki Y, Sarkesh S, Black PM, Muzikansky A, Loeffler JS. The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol* 2004;**22**:1926-33.

- Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, Waterfield MD, Backer JM, Zerial M. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* 1999;**1**:249-52.
- Clague MJ, Urbe S. The interface of receptor trafficking and signalling. *J Cell Sci* 2001;**114**:3075-81.
- Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;**6**:184-92.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:7686-9.
- Edwards LA, Verreault M, Thiessen B, Dragowska WH, Hu Y, Yeung JH, Dedhar S, Bally MB. Combined inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways results in synergistic effects in glioblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 2006;**5**:645-54.
- Fan QW, Specht KM, Zhang C, Goldenberg DD, Shokat KM, Weiss WA. Combinatorial efficacy achieved through two-point blockade within a signaling pathway—a chemical genetic approach. *Cancer Res* 2003;**63**:8930-8.
- Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004;**23**:3151-71.
- Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L, Firtel RA. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 2002;**109**:611-23.
- Giehl K, Skripczynski B, Mansard A, Menke A, Gierschik P. Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* 2000;**19**:2930-42.
- Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 1998;**12**:502-13.
- Goudar RK, Shi Q, Hjelmeland MD, Keir ST, McLendon RE, Wikstrand CJ, Reese ED, Conrad CA, Traxler P, Lane HA, Reardon DA, Cavenee WK, Wang XF, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN. Combination therapy of inhibitors of epidermal growth factor receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (AEE788) and the mammalian target of rapamycin (RAD001) offers improved glioblastoma tumor growth inhibition. *Mol Cancer Ther* 2005;**4**:101-12.
- Gregory CR, Huang X, Pratt RE, Dzau VJ, Shorthouse R, Billingham ME, Morris RE. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement. *Transplantation* 1995;**59**:655-61.
- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;**4**:361-70.
- Gurney JG, Kadan-Lottick N. Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology. *Curr Opin Oncol* 2001;**13**:160-6.
- Handschuh G, Candidus S, Lubber B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Hofler H, Becker KF. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 1999;**18**:4301-12.
- Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* 2005;**8**:179-83.

- Hendriks BS, Opresko LK, Wiley HS, Lauffenburger D. Coregulation of epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels and locations: quantitative analysis of HER2 overexpression effects. *Cancer Res* 2003; **63**:1130-7.
- Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 2004; **117**:4619-28.
- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**:341-54. Erratum in: *Nat Rev Cancer* 2005; **5**:580.
- Iijima M, Huang YE, Devreotes P. Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev Cell* 2002; **3**:469-78.
- Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, Van Meir EG. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999; **9**:469-79.
- Janetopoulos C, Ma L, Devreotes PN, Iglesias PA. Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:8951-6.
- Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S, Sebti S. Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol* 2004; **24**:5565-76.
- Jiang X, Huang F, Marusyk A, Sorkin A. Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell* 2003; **14**:858-70.
- Joy AM, Beaudry CE, Tran NL, Ponce FA, Holz DR, Demuth T, Berens ME. Migrating glioma cells activate the PI3-K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis. *J Cell Sci* 2003; **116**:4409-17.
- Kari C, Chan TO, Rocha de Quadros M, Rodeck U. Targeting the epidermal growth factor receptor in cancer: apoptosis takes center stage. *Cancer Res* 2003; **63**:1-5.
- Kleihues P, Cavenee WK (2000) Pathology and genetics of tumours of the nervous system (WHO). Published by the International Agency for Research on Cancer (IARC Press), Lyon
- Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1999; **1**:44-51.
- Kraus A, Neff F, Behn M, Schuermann M, Muenkel K, Schlegel J. Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells. *Int J Cancer* 1999; **80**:930-4
- Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 1993; **73**:585-96.
- Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984; **10**:203-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**:680-5.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; **84**:359-69.
- Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995; **267**:1782-8.
- Li B, Chang CM, Yuan M, McKenna WG, Shu HK. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res* 2003; **63**:7443-50

- Lönn S, Klæboe L, Hall P, Mathiesen T, Auvinen A, Christensen HC, Johansen C, Salminen T, Tynes T, Feychting M. Incidence trends of adult primary intracerebral tumors in four Nordic countries. *Int J Cancer* 2004;**108**:450-5.
- Luber B, Candidus S, Handschuh G, Mentele E, Hutzler P, Feller S, Voss J, Hofler H, Becker KF. Tumor-derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhes Commun* 2000;**7**:391-408.
- Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 2003;**4**:257-62.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;**350**:2129-39.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 2001;**15**:1311-33.
- Maier D, Jones G, Li X, Schönthal AH, Gratzl O, Van Meir EG, Merlo A. The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res* 1999;**59**:5479-82.
- Manning BD. Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J Cell Biol* 2004;**167**:399-403. Erratum in: *J Cell Biol* 2004;**167**:1255.
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liao LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhi R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 2005;**353**:2012-24. Erratum in: *N Engl J Med* 2006;**354**:884.
- Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Mischel PS. PTEN-mediated resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2007;**13**:378-81.
- Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 2004a;**116**:445-56.
- Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2004b;**16**:400-6.
- Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS: Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol* 1999;**19**:6845-57.
- Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther* 2003;**2**:S169-77.
- Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:7261-70.
- Nicolle G, Daher A, Maillé P, Vermey M, Loric S, Bakkar A, Wallerand H, Vordos D, Vacherot F, Diez de Medina SG, Abbou CC, Van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F, Chopin DK. Gefitinib inhibits the growth and invasion of urothelial carcinoma cell lines in which Akt and MAPK activation is dependent on constitutive epidermal growth factor receptor activation. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:2937-43.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf

- UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004;**64**:6892-9.
- Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;**64**:479-89.
- Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE: ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 1998;**18**:5042-51.
- Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 1997;**385**:537-40. Erratum in: *Nature* 1997;**388**:210.
- Podsypanina K, Lee RT, Politis C, Hennessy I, Crane A, Puc J, Neshat M, Wang H, Yang L, Gibbons J, Frost P, Dreisbach V, Blenis J, Gaciong Z, Fisher P, Sawyers C, Hedrick-Ellenson L, Parsons R. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten^{+/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:10320-5.
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001;**8**:11-31.
- Qian Y, Corum L, Meng Q, Blenis J, Zheng JZ, Shi X, Flynn DC, Jiang BH. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;**286**:C153-63.
- Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancey JE, McLendon RE, Kao JC, Stenzel TT, Ahmed Rasheed BK, Tourt-Uhlig SE, Herndon JE 2nd, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2004;**22**:133-42.
- Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 2001;**114**:2713-22.
- Ripple MO, Kalmadi S, Eastman A. Inhibition of either phosphatidylinositol 3-kinase/Akt or the mitogen/extracellular-regulated kinase, MEK/ERK, signaling pathways suppress growth of breast cancer cell lines, but MEK/ERK signaling is critical for cell survival. *Breast Cancer Res Treat* 2005;**93**:177-88.
- Rodrigues GA, Falasca M, Zhang Z, Ong SH, Schlessinger J. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* 2000;**20**:1448-59.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;**103**:211-25.
- Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;**103**:253-62.
- Schoeberl B, Eichler-Jonsson C, Gilles ED, Muller G. Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nat Biotechnol* 2002;**20**:370-5.
- She QB, Solit D, Basso A, Moasser MM. Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling. *Clin Cancer Res* 2003;**9**:4340-6.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;**344**:783-92.

- Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst* 2001;**93**:1246-56.
- Sorkin A, McClure M, Huang F, Carter R. Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr Biol* 2000;**10**:1395-8.
- Sorkin A, Von Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;**3**:600-14.
- Spaargaren M, Bos JL. Rab5 induces Rac-independent lamellipodia formation and cell migration. *Mol Biol Cell* 1999;**10**:3239-50.
- Versteeg HH, Nijhuis E, van den Brink GR, Evertzen M, Pynaert GN, van Deventer SJ, Coffey PJ, Peppelenbosch MP. A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein. *Biochem J* 2000;**350**:717-22.
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;**20**:719-26.
- Wang MY, Kan VL, Zhu S, Dia EQ, Vivanco I, Shackleford GM, Cavenee WK, Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel P. Mammalian target of rapamycin inhibition to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in PTEN-deficient and PTEN-intact glioblastoma cells. *Cancer Res* 2006;**66**:7864-9.
- Wiley HS. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* 2003;**284**:78-88.
- Worthylake RA, Burridge K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* 2002;**278**:13578-84.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**:127-37.
- Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinowitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* 2005;**20**:539-50.
- Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**:107-17. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**:216.

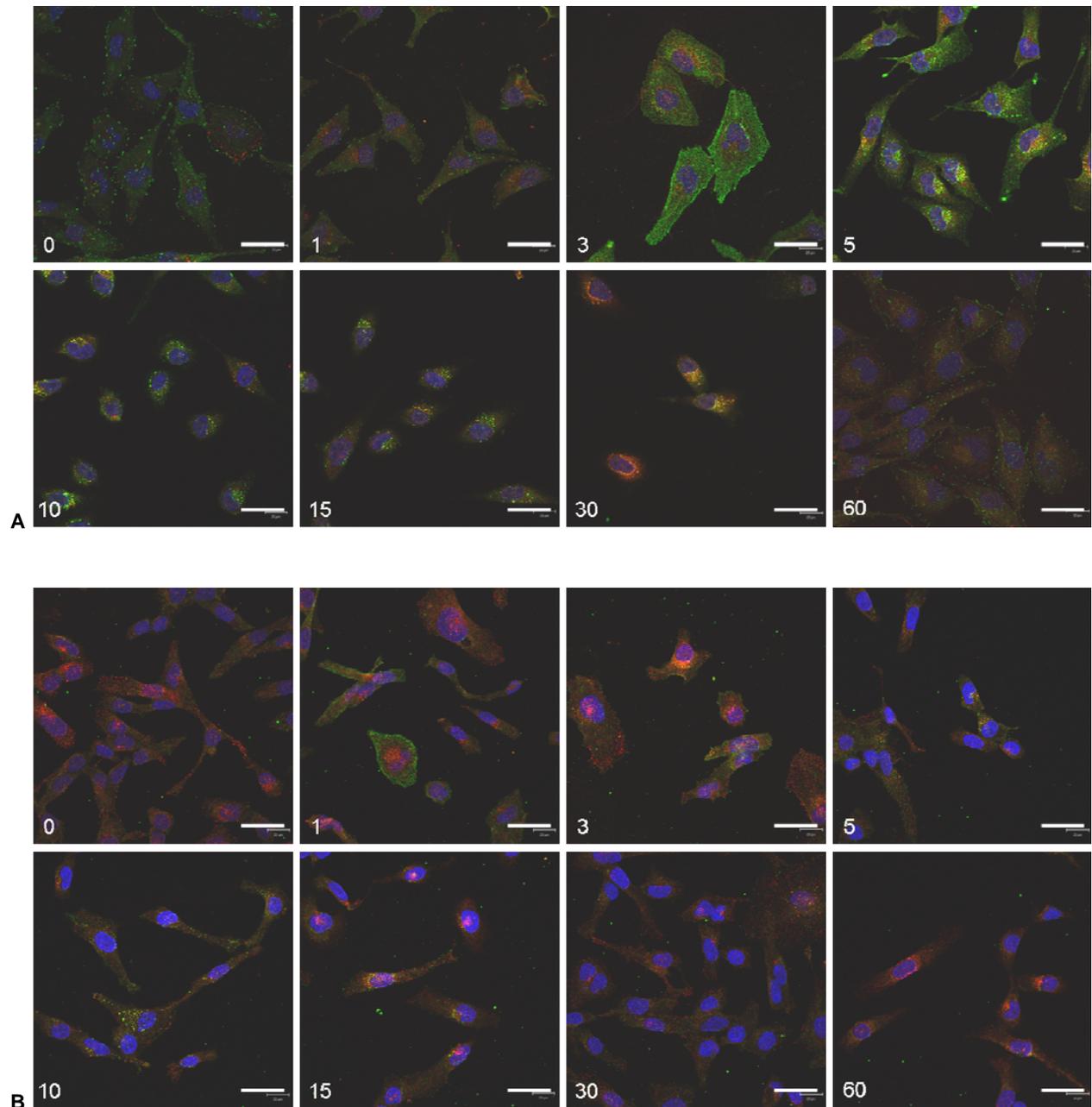
8 Anhang

Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-VÄ	Dimethylsulfoxid-Volumenäquivalent
DTT	Dithiothreitol
ECM	<i>Extracellular Matrix Basement Membrane</i>
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
LSM	Laserscanningmikroskop
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PI3	Phosphatidylinositol-3'
PMSF	Phenylmethan-Sulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Rothwell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Tab.	Tabelle

TBS	trisgepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin B Isothiocyanat
TUM	Technische Universität München
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
U	<i>Unit</i>
ÜN	über Nacht
VÄ	Volumenäquivalent
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organization</i>)

Kinetikstudien zur Internalisierung des aktivierten EGF-Rezeptors mittels Doppel-Immunfluoreszenzanalysen



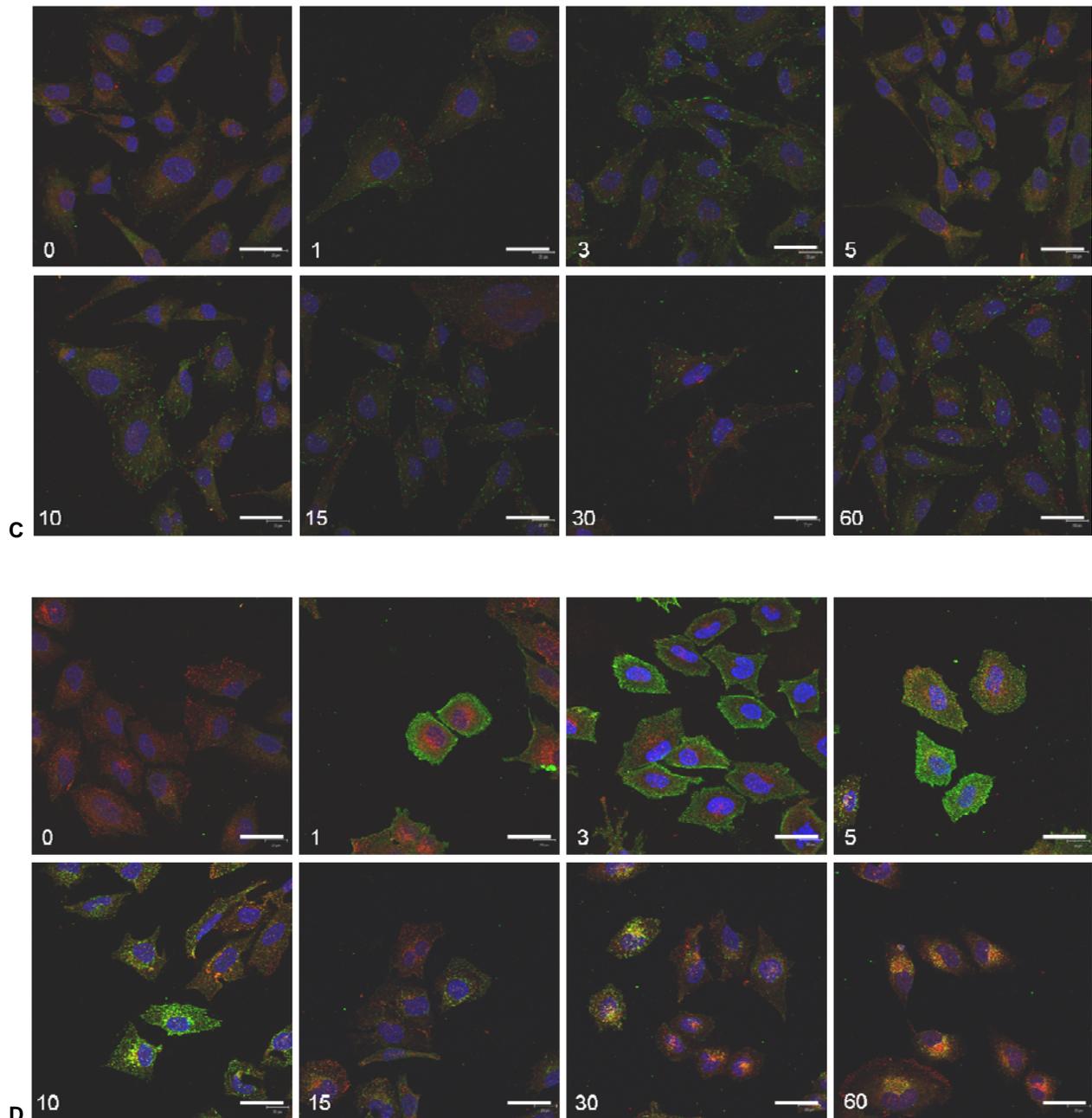


Abb. 8.1: Zeitliche Kinetik der Aktivierung des EGF-Rezeptors und seiner Internalisierung in das frühe Endosom.

Die humanen Gliomzelllinien G139 (A), G147 (B), LN229 (C) und LN308 (D) wurden 24h unter serumfreien Bedingungen inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 und 60min nach EGF-Stimulation wurde eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung für den an Tyr1086 phosphorylierten EGF-Rezeptor (goat-anti-rabbit FITC; grüne Signale) und der mit den frühen Endosomen assoziierten kleinen GTPase Rab5 (goat-anti-mouse CY3, rote Signale) durchgeführt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt und der Maßstabsbalken entspricht 40 μ m. Es zeigte sich, dass bei LN229 keine Aktivierung des EGF-Rezeptors stattfand. Bei G147 und LN308 erfolgte die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors 1min und bei G139 3min nach Stimulation. Die Aktivierung blieb nach Internalisierung bestehen und folgte einer unterschiedlichen Kinetik. Bei G139 und LN308, Zelllinien mit hohem EGFR-Status, war der aktivierte EGF-Rezeptor noch nach 30 Minuten nachzuweisen, bei G147 wurde dies hingegen zuletzt in den Präparaten mit 15minütiger EGF-Stimulation festgestellt.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Wolfgang Wurst für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der TU München.

Prof. Dr. Jürgen Schlegel danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, seine Anregungen und sein in mich gesetztes Vertrauen.

Mein aufrichtiger Dank geht an Prof. Dr. Heinz Höfler, an dessen Instituten in der TU und in der GSF ich die Möglichkeit hatte diese Doktorarbeit zu erstellen.

Prof. Dr. Manfred Gratzl möchte ich für mein Stipendium im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 333 „Biologie menschlicher Erkrankungen“ danken, ebenso wie Dr. Martina Haasemann und Dr. Karen Schmidt-Bäse, die immer für ein abwechslungs- und lehrreiches Rahmenprogramm gesorgt haben.

Mein besonderer Dank geht außerdem an PD Dr. Birgit Luber, Dr. Peter Hutzler und Dr. Giti Fuchs, die mich jederzeit methodisch und wissenschaftlich bei den Motilitätsassays unterstützt haben.

Ernst Mannweiler danke ich für die Erstellung des Bildanalyseprogramms, das mir die Auswertung der Invasionsversuche erheblich erleichtert hat.

Bei Dr. Gülnihal Yüksesdag möchte ich mich herzlich für das kritische Lesen meines Manuskripts, ihre wertvollen Anregungen, sowie für ihre moralische Unterstützung bedanken.

Guido Piontek danke ich für die Bereitstellung der mit siRNA transfizierten Zellen, Nina Laar für ihre Mithilfe bei Western Blot-Analysen.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Karin Bink, Uli Buchholz, Ingrid Höpner, Dr. Holger Laux, Dr. Frauke Neff, Dr. Erika Rosivatz, PD Dr. Axel Walch, Andreas Voss sowie allen weiteren Kollegen, die am Institut für Pathologie in der Trogerstraße und in der GSF arbeiten oder gearbeitet haben, für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Gerrit Vollmer, der meinen Laptop startklar gemacht hat und immer ein offenes Ohr für PC-Fragen hat.

Meinen lieben Freunden und Freundinnen danke ich ganz besonders für ihr Verständnis, wenn ich mich in den letzten Jahren zu oft rar gemacht habe.

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Mutter für ihre großzügige Unterstützung und ihren immerwährenden Glauben an mich bedanken.

I. m. O.