

Aus dem Zentrum für Neurologie, Neurologische Klinik und Hertie-Institut
für Klinische Hirnforschung, Abteilung Allgemeine Neurologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Weller

**Co-Inhibition von *epidermal growth factor receptor* (EGFR)
und *insulin-like growth factor-I receptor* (IGF-IR):**

Ein neuer Ansatz für die Reduktion der Zelltodresistenz humaner
maligner Gliomzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

CHRISTINE EISENMANN
aus Wolfach

2007

Dekan : Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Weller

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Belka

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNG UND GLOSSAR.....	4
2	EINLEITUNG	8
2.1	Maligne Gliome	8
2.2	Apoptose	9
2.2.1	Definition	9
2.2.2	Rolle der Caspasen	10
2.2.3	Das Tumorsupressorgen p53	10
2.3	CD95 und CD95-Ligand.....	10
2.3.1	CD95 (Fas/APO-1)	10
2.3.2	CD95-Ligand	11
2.3.3	Die CD95-vermittelte Signalkaskade	11
2.3.4	Die Bedeutung der CD95-induzierten Apoptose.....	14
2.4	Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren.....	14
2.4.1	Rezeptortyrosinkinasen	14
2.4.2	MAPK-Signalweg.....	16
2.4.3	Der PI3K/ PKB/ Akt-Signalweg	17
2.4.4	Wachstumsfaktorrezeptoren und Tumorgenese.....	18
2.4.5	Rezeptortyrosinkinasen und Tumorthherapie	21
2.4.6	Zusammenspiel der Rezeptortyrosinkinasen EGFR und IGF-IR	22
2.5	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	24
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	Geräte	25
3.2	Materialien.....	26
3.3	Reagenzien und Chemikalien	26
3.4	Antikörper	28
3.5	Verzeichnis der Lieferanten.....	29
3.6	Puffer, Medien und Lösungen	29
3.7	Zellkultur	32
3.7.1	Zelllinien	32
3.7.2	Kultivierung der Zellen.....	32

3.8	Untersuchung von Zytotoxizität	33
3.8.1	Kristallviolettassays	33
3.8.2	LDH-Assay	34
3.9	Proteinbiochemische Methoden	34
3.9.1	Herstellung von Proteinlysaten	34
3.9.2	Messung der Proteinkonzentration	35
3.9.3	Westernblot	35
3.9.3.1	Probenvorbereitung	35
3.9.3.2	Gießen des Gels und Elektrophorese	35
3.9.3.3	Transfer auf die Nitrozellulosemembran.....	37
3.9.3.4	Visualisierung gelelektrophoretisch aufgetrennter Gele	37
3.10	Durchflusszytometrie zum CD95-Nachweis	38
3.11	Annexin V-Assay	39
4	ERGEBNISSE.....	40
4.1	Wachstum und Überleben von Gliomzellen in Vollmedium und unter Serumentzug.....	40
4.1.1	Wachstumskurven mit Vollmedium und unter Serumentzug	40
4.1.2	Überleben von Gliomzellen in Vollmedium und unter Serumentzug.....	42
4.2	Stimulation mit Wachstumsfaktoren.....	43
4.2.1	Behandlung mit einzelnen Wachstumsfaktoren.....	43
3.2.2	Stimulation durch kombinierte Behandlung mit Wachstumsfaktoren	46
4.3	Effekt der Inhibition des EGFR auf das Zellwachstum in serumfreiem Medium und Vollmedium.....	48
4.4	Effekte der Inhibition des IGF-IR auf das Zellwachstum in serumfreiem Medium und Vollmedium.....	50
4.5	Effekte einer kombinierte Blockade von EGFR und IGF-IR	52
4.5.1	Wachstumshemmung durch kombinierte Blockade von EGFR und IGF-IR.....	52
4.6	Synergistische Sensitivierung gegenüber CD95L-induzierter Apoptose durch Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR.....	54
4.7	Effekte der Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR auf die Zelltodprogramme	57
4.7.1	Untersuchung auf apoptotischen Zelltod	57
4.7.2	Untersuchung auf Abhängigkeit von Caspasen.....	59
4.7.3	Die Rolle von p53 für die synergistische Sensitivierung gegenüber CD95L durch Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR.....	61

4.8	Effekte der IGF-IR- und EGFR-Inhibition auf nachgeschaltete Signalkaskaden	63
5	DISKUSSION.....	65
5.1	Serumentzug.....	65
5.2	Stimulation mit Wachstumsfaktoren.....	66
5.3	Effekte einer kombinierten Blockade von EGFR und IGF-IR	67
5.4	Synergistische Sensibilisierung gegenüber CD95L-induzierter Apoptose durch Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR.....	67
5.5	Effekte der Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR auf die Zelltodprogramme	68
5.6	Die Rolle von p53 bei der Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR.....	68
5.7	Effekte der IGF-IR- und EGFR-Inhibition auf nachgeschaltete Signalkaskaden	69
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	70
7	LITERATUR.....	71
	DANKSAGUNG	78
	LEBENS LAUF	79

1 Abkürzung und Glossar

AIF *Apoptosis-inducing factor*. Freisetzung aus geschädigten Mitochondrien. Induziert Caspasen-unabhängigen Zelltod vor allem während der Entwicklung.

Apo2L/ TRAIL *Apo 2 Ligand/ Tumor necrosis factor alpha related apoptosis-inducing ligand*. Aktiviert über die agonistischen Rezeptoren DR4/DR5 den extrinsischen Zelltodweg.

APAF-1 *Apoptotic protease activating factor-1*. Notwendig für die Aktivierung von Caspase 9 nach Cytochrom c-Freisetzung. Apaf-1-Zellen sind chemoresistent.

BAD Proapoptotisches Mitglied der BCL-2-Familie. Wird von PKB/Akt durch Phosphorylierung inaktiviert.

BAK/BAX Proapoptotische Moleküle der BCL-2-Familie. Vermitteln die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran. Essentielle Mediatoren der Chemotherapie-induzierten Apoptose.

BCL-2/ BCL-X_L Antagonisieren BAK/BAX und inhibieren die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran. Bei vielen Tumoren einschliesslich Gliomen überexprimiert. Potente Inhibitoren von Chemotherapie- und Todesliganden-induzierter Apoptose.

BID Proapoptotisches Mitglied der BCL-2 Familie. Wird durch Caspase 8 aktiviert und vermittelt die Co-Aktivierung des intrinsischen Zelltodwegs.

CAD *Caspase-activated deoxyribonuclease*. Eine Caspase-aktivierende DNase im Mausmodell

Caspase 8 Von Todesliganden aktivierte Initiator-Caspase des extrinsischen Zelltodwegs.

Caspase 9 Wird nach Freisetzung von Cytochrom c in Anwesenheit von ATP am Apoptosom aktiviert. Koppelt den intrinsischen Zelltodweg an Effektorcaspasen.

Caspasen 3/7 Effektorcaspasen, Aktivierung über Caspase 8 oder Caspase 9. Spalten essentielle Proteine und führen damit zu den Charakteristika der Apoptose.

CD95L/CD95 CD95-Ligand bindet nach Trimerisierung an seinen Rezeptor CD95 und aktiviert den extrinsischen Zelltodweg.

c-FLIP *Cellular FLICE-inhibitory protein*. Endogener Inhibitor des extrinsischen Zelltodwegs. Bei vielen Tumortypen überexprimiert. Durch PKB/Akt transkriptionell positiv reguliert.

CrmA *Cytokine response modifier A*. Virusprodukt, das Apoptose inhibiert.

Cytochrom c Wird aus geschädigten Mitochondrien freigesetzt und aktiviert am Apoptosom in Anwesenheit von ATP Caspase 9.

DISC *Death-inducing signaling complex*. Vermittelt die Aktivierung von Caspase 8 nach Bindung der Todesliganden an ihre Rezeptoren.

DR4/DR5 Agonistische Rezeptoren für Apo2L/TRAIL, aktivieren den extrinsischen Zelltodweg. Präferentielle Expression von DR4/DR5 gegenüber den antagonistischen Rezeptoren DcR1 und DcR2 DR2 könnte die Sensitivität von Gliomzellen gegenüber Apo2L/TRAIL erklären.

4EBP1 *eIF4E-binding protein*. Negativer Regulator von eIF4E, wird von mTOR durch Phosphorylierung inaktiviert.

EGFR *Epidermal growth factor receptor*. Rezeptor für Wachstums- und Überlebensfaktoren. Aktiviert die MAPK- und PI3K-PKB/Akt-Kaskaden. Bei malignen Gliomen häufig amplifiziert/ überexprimiert.

eIF4E *Eukaryotic initiation factor 4E*. Limitierender Faktor für die Translationsinitiation, durch mTOR positiv reguliert.

FADD *Fas-associated death domain*. FADD, auch bekannt als MORT- 1, ein apoptotisches Adaptormolekül, das Caspase 8 oder Caspase 10 an aktiviertes CD95 oder TNF- Rezeptoren rekrutiert.

FGFR *Fibroblast growth factor receptor* : verantwortlich für eine Vielzahl von Funktionen: Wundheilung, Angiogenese und Tumorgenese.

FKHR *Forkhead homolog 1 (auch FOXO1A)*. Teil einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch PKB/Akt inaktiviert werden.

GRB2 *Growth factor receptor-bound protein 2*. Adapterprotein, dass Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR mit Ras/Raf verbindet.

IAPs *Inhibitor of apoptosis proteins*. Inhibieren die Aktivierung von Effektor-Caspasen. Überexpression bei vielen Tumortypen einschließlich Gliomen häufig.

IGF-IR *Insulin-like growth factor-I receptor*. Rezeptortyrosinkinase, aktiviert v.a. die PI3K-MAPK-Kaskade.

JNK *Jun N-terminal kinase*. Mitglied der MAPK-Familie, Beteiligung bei Apoptose, Proliferation und Tumorgenese. JNK wird über SEK (*stress-activated protein kinase*) aktiviert.

MEK1/2 *MAPK-kinase 1/2*. Vermittelt RAS/RAF-abhängig die Aktivierung von p40/42MAPK.

MTOR *Mammalian target of rapamycin*. Wichtiger Regulator von translationalen Antworten auf verändertes Angebot an Wachstumsfaktoren, Nährstoffen und Sauerstoff. Bei Glioblastomen häufig aktiviert.

p53 Sensor für genotoxischen Stress. Vermittelt Apoptose über den intrinsischen Zelltodweg oder Zellzyklus-Arrest. Bei sekundären Glioblastomen häufig mutiert.

PDGFR *Platelet-derived growth factor receptor*. PDGF scheint ein Regulator der Entwicklung von Gliazellen, insbesondere der Oligodendrozyten zu sein.

PDK1/2 *Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1/2*. Phosphoryliert PKB/Akt in Anwesenheit von PIP₃.

PI3K *Phosphatidylinositol-3-Kinase*. Katalysiert die Bildung von *Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP₃)* aus *Phosphatidyl-inositol-2-Phosphat (PIP₂)*.

PIP₃ *Phosphatidylinositol-3-Phosphat*. Wird PI3K-vermittelt aus *Phosphatidyl-inositol-2-Phosphat (PIP₂)* gebildet und vermittelt u.a. die Aktivierung des PKB/Akt-Signalwegs.

PKB/Akt *Protein Kinase B/ Akt*. Zentraler Bestandteil einer dem EGFR nachgeschalteten PI3K-abhängigen Kaskade, vermittelt antiapoptotische und metabolische Effekte.

p40/42MAPK *p40/42 mitogen-activated protein kinase*. Zentraler Bestandteil einer dem EGFR nachgeschalteten RAS-abhängigen Kaskade, vermittelt v.a. proliferative Signale.

p90^{RSK} *p90ribosomal S6 kinase*, kontrolliert für den Zellzyklus wichtige Proteine.

p70S6K *p70 S6 kinase 1/2*. Aktiviert mTOR-abhängig RPS6.

PTEN *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*. Dephosphoryliert PIP₃ und reguliert damit PKB/Akt negativ. Bei malignen Gliomen häufig deletiert. Der Verlust von PTEN führt zur Resistenz gegenüber vielen pro-apoptotischen Stimuli.

RAS Kleines GTP-bindendes Protein, dass nach Aktivierung durch Rezeptortyrosinkinasen über **RAF** die MAPK- und PI3K-PKB/Akt-Kaskaden aktivieren kann. Bei Gliomen und anderen Tumoren häufig überexprimiert.

RPS6 *Ribosomal protein S6*. Teil der 40S-Untereinheit der Ribosomen, vermittelt translationelle Effekte von mTOR.

Smac *Second mitochondria-derived activator of caspase*. Mitochondrialer Todesfaktor, inhibiert IAPs. Smac-Agonisten sensibilisieren Tumorzellen gegenüber Apoptose.

SOS *Son of sevenless homolog 1*. Adapterprotein, dass Signale von Rezeptortyrosinkinasen und GRB2 mit RAS/RAF verbindet.

STAT *Signaltransducer and activation of transduction*. Werden durch Rezeptortyrosinkinasen aktiviert.

XIAP *X-linked IAP*. Endogener Inhibitor von Caspase 9 und Effektorcaspasen. Vermittelt bei Gliomzellen Resistenz gegenüber Todesliganden.

2 Einleitung

2.1 Maligne Gliome

Maligne Gliome sind Tumoren des Zentralnervensystems. Sie entwickeln sich aus Gliazellen oder deren Vorstufen und werden nach der WHO-Klassifikation in Grad III und IV eingeteilt (39). Die anaplastischen Astrozytome, Oligodendrogliome, Oligoastrozytome und Ependymome entsprechen den Grad III-Gliomen, die Glioblastome den Grad IV-Gliomen. Glioblastome sind unter den malignen Gliomen wegen ihrer Häufigkeit und ihres aggressiven Wachstums von besonderer Bedeutung. Typische histologische Merkmale der Glioblastome und zugleich Zeichen der Malignität dieser Tumoren sind hohe Zelldichte, Pleomorphie, erhöhte Mitoseaktivität, Nekrosen und pathologische Gefäße. Die Prognose insbesondere der Glioblastome ist schlecht: Bei unselektierten Patienten liegt der Median der Überlebenszeit unter 12 Monaten. Als Standardtherapie für Glioblastome gilt die makroskopische Resektion des Tumors, soweit möglich, und die postoperative Strahlentherapie. Die Chemosensitivität der Glioblastome ist insgesamt gering. Eine konkomitante und adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid verlängerte das mediane Überleben von 12.1 auf 14.6 Monate. Der Anteil von Patienten, die zwei Jahre überlebten, erhöhte sich von 10 % auf 26 % (79).

Entscheidend für die mangelnde Wirksamkeit der Chemotherapie bei Glioblastomen ist eine primäre Resistenz auf zellulärem Niveau. Insbesondere sind die Tumorzellen resistent gegenüber der Induktion von Apoptose. Bei der Resistenzentwicklung kann der Funktionsverlust von proapoptotischen Proteinen oder Tumorsuppressoren wie p53 und die gesteigerte Expression antiapoptotischer Proteine wie BCL-2 wesentlich sein. Eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt auch die Deregulation der Signaltransduktionskaskaden über Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor- α* (TGF- α), *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor-I/II* (IGFI/II) und *platelet-derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor* (FGF) und ihre Rezeptoren wie *epidermal growth factor receptor* (EGFR),

insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-IR), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGF) und *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) und der nachgeschalteten Signalwege *Phosphatidylinositol-3-Kinase* (PI3K), *Protein Kinase B/ Akt* (PKB/Akt), *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und andere.

2.2 Apoptose

2.2.1 Definition

Der Begriff Apoptose als Bezeichnung für eine eigenständige Art des Zelltods wurde erstmals 1972 von Kerr und Mitarbeitern (37) verwendet. Apoptose (griechisch: „Herabfallen der Blätter“) beschreibt die morphologischen Abbauvorgänge in der Zelle, die durch einen „programmierten Zelltod“ ausgelöst werden. Die Apoptose definiert sich morphologisch durch Zellschrumpfung und Chromatinkondensation, Destabilisierung der Zellmembran und daraus resultierenden Zellausstülpungen, die sich abschnüren (*Blebbing*), sowie schließlich den vollständigen Zerfall der Zelle in apoptotische Vesikel, die von Nachbarzellen phagozytiert werden. Ein besonderes biochemisches Merkmal stellt die „oligonukleosomale Degradation“, eine durch eine zelleigene Endonuklease verursachte DNA-Fragmentierung, dar. Charakteristisch für die Apoptose ist der Erhalt der Membranintegrität, so dass es zu keiner Entzündungsreaktion durch das Austreten von Zellinhaltsstoffen kommt. Dies und die oben erwähnten Merkmale unterscheiden die Apoptose von der Nekrose, bei der die Zellen lytisch sterben und daher das gesamte Nachbargewebe in Mitleidenschaft gezogen wird.

Apoptose kann bei physiologischem (programmiertem) Zelltod während der Embryonalentwicklung auftreten. Doch auch viele exogene Einflüsse können zu apoptotischem Zelltod führen, wie z.B. Chemotherapeutika, ionisierende Strahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren und bestimmte Zytokine wie CD95-Ligand (CD95L).

2.2.2 Rolle der Caspasen

Ein klassischer Mechanismus der Apoptose ist eine Aktivierung bestimmter Proteasen, der Caspasen, unter anderem durch CD95L (siehe Abschnitt 2.3). Caspasen sind Cystein-Asparginasen, die in der Zelle in einer inaktiven Proform vorliegen. Durch proteolytische Spaltung werden sie aktiv; die Initiatorcaspasen wie Caspase 8 und 10 spalten nachgeschaltete Effektorcaspasen wie Caspase 3 und 7, die wiederum eine Vielzahl zellulärer Proteine spalten und damit letztlich den Zelltod herbeiführen.

Durch Caspasen werden auch Endonukleasen aktiviert, die in den Zellkern wandern und dort zur DNA-Fragmentierung führen. Eine dieser Endonukleasen ist CAD (*caspase-activated deoxyribonuklease*). Bei Bindung an den Inhibitor ICAD (*inhibitor of CAD*) liegt CAD in inaktiver Form vor. Durch Caspasenaktivierung wird ICAD gespalten, CAD wird aktiv und führt zur DNA-Fragmentierung (70).

2.2.3 Das Tumorsuppressorgen p53

P53 wird als „*cellular gatekeeper for growth and division*“ bezeichnet und ist das am häufigste mutierte Gen in menschlichen Tumoren. Seine Inaktivierung führt nicht nur zur Tumorprogression, sondern auch zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapie. Eine der wichtigsten Funktionen von p53 ist die Induktion von Zellzyklusarrest oder Apoptose bei DNA-Schäden. Die Mechanismen der p53-abhängigen Apoptose sind noch nicht völlig aufgeklärt. Die Anwesenheit von Wildtyp-p53 ist in vielen Zelltypen eng gekoppelt mit einer effizienten Induktion der CD95L-induzierten Apoptose (56, 84), jedoch nicht bei malignen Gliomzellen (64).

2.3 CD95 und CD95-Ligand

2.3.1 CD95 (Fas/APO-1)

CD95, auch Fas oder APO-1 genannt ist ein differenziell glykosyliertes Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 42 bis 52 kDa. CD95 gehört zur *tumor necrose faktor (TNF)-/nerve growth factor (NGF)*-Rezeptorfamilie. Charakteristisch für diese Familie sind zwei bis sechs

extrazelluläre cysteinreiche Domänen. Die biologischen Effekte, die von den Rezeptoren dieser Familie vermittelt werden, sind sehr unterschiedlich. Sie umfassen verschiedene Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Aktivierung oder Apoptose. Eine Subfamilie der TNF-/NGF-Rezeptorsuperfamilie bilden die sogenannten Todesrezeptoren (neben CD95 CD27, CD30, CD40, 4-1BB und weitere). Diese zeichnen sich durch ligandenvermittelte Induktion von Apoptose aus. Strukturell wichtig für die Auslösung von Apoptose ist eine ungefähr 80 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne der Todesrezeptoren, die als Todesdomäne (*death domain*) bezeichnet wird. Exprimiert wird CD95 vor allem auf der Zelloberfläche aktivierter T- und B-Lymphozyten und bei lymphoiden und nichtlymphoiden Tumorzellen (58).

2.3.2 CD95-Ligand

Der Ligand von CD95, CD95L (APO-1L/FasL) ist ein glykosyliertes Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 40 kDa. CD95L gehört zur TNF-Familie, wie auch TNF- α , Lymphotoxin- α und β , CD27-Ligand, CD30-Ligand, CD40-Ligand, 4-1BB-Ligand, OX40-Ligand und Apo-2-Ligand. Außer Lymphotoxin- α sind diese Liganden alle Typ-II-Membranproteine, d.h. sie besitzen N-terminal eine zytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne und C-terminal eine Extrazellulärdomäne. CD95L ist ein membranständiger Ligand, kann jedoch bei proteolytischer Spaltung auch als löslicher CD95L vorliegen (57). Exprimiert wird CD95L auf aktivierten T-, B-, und NK-Zellen (80), sowie auf Zellen nichtlymphoider Organe wie Hoden (82) und vordere Augenkammer (25) und an der Oberfläche von lymphoiden und nichtlymphoiden Tumorzellen (90, 93).

2.3.3 Die CD95-vermittelte Signalkaskade

Das erste Signal zur Apoptoseinduktion durch CD95 stellt eine Trimerisierung oder eine Multimerisierung des Rezeptors dar. Dies kann entweder durch Bindung von CD95L oder von agonistischen, stimulierenden Antikörpern ausgelöst werden. Die Trimerisierung führt dazu, dass die intrazellulär gelegenen Todesdomänen in unmittelbare Nähe gelangen und das Adaptorprotein *Fas-associated-protein with death domain* (FADD) rekrutiert

wird. FADD besteht aus einer Domäne mit Homologie zur Todesdomäne, mittels der die Bindung an CD95 erfolgt, und einer Todeseffektordomäne (DED) am C-Terminus. Diese bindet die Protease Caspase 8. In dem *death-inducing signaling complex* (DISC) wird Procaspase 8 autokatalytisch gespalten und in ein aktives Enzym, die Caspase 8, überführt. Caspase 8 wird auch als Initiatorcaspase bezeichnet, da sie die erste Caspase einer Caspasenkaskade ist. Diese kann direkt weitere Caspasen wie die Caspasen 3 und 7 (Effektorcaspasen) spalten und aktivieren, die wiederum zelluläre Substrate spalten (extrinsischer Weg).

Neben der direkten Aktivierung der Effektorcaspasen über Caspase 8 kann die Stimulation des CD95-Signalkomplexes auch über den mitochondrialen oder intrinsischen Weg verlaufen. Dabei führt die Aktivierung des DISC zu einer mitochondrialen Schädigung mit der Folge eines Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung proapoptotischer Mediatoren wie Cytochrom c aus den Mitochondrien. Bei manchen Zelllinien wird dabei durch Caspase 8 das Protein BID, ein pro-apoptotisches Mitglied der BCL-2-Familie, gespalten. Das proteolytisch aktivierte BID-Fragment wird N-myristyliert und transloziert daraufhin zu den Mitochondrien und induziert die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom ins Zytoplasma (51, 44, 104). Dies führt zur Aktivierung von Caspase 9 am Apoptosom, einem Komplex aus Cytochrom c, *apoptotic-protease-activating-factor-1* (APAF-1) und dATP, der wiederum die Effektorcaspasen aktiviert (45). Eine Amplifikation des Todessignals über den intrinsischen Weg ist auch bei Todesligand-induzierter Apoptose in aller Regel notwendig.

Gehemmt wird CD95-vermittelte Apoptose unter anderem durch das zelluläre *FLICE-inhibitory protein* (FLIP), das die Rekrutierung von Caspase 8 in den DISC und dessen Aktivierung verhindert (34). Daneben gibt es *inhibitor of apoptosis-proteins* (IAP), die die Aktivität von Caspasen hemmen. Vertreter dieser IAPs sind *cellular-IAP* (c-IAP), c-IAP2 und *x-linked IAP* (XIAP) (16). Eine hemmende Wirkung hat auch das virale Protein Crm-A. Es hemmt Proteasen, bevorzugt Caspase 8 (66). Auch antiapoptotische Proteine der BCL-2 Familie können die CD95-induzierte Apoptose zumindest verzögern (94).

Eine Amplifikation des Todessignals über den intrinsischen Weg ist auch bei Todesliganden-induzierter Apoptose in aller Regel notwendig.

Abbildung 1 stellt eine Übersicht der wichtigsten Elemente von Zelltodkaskaden dar.

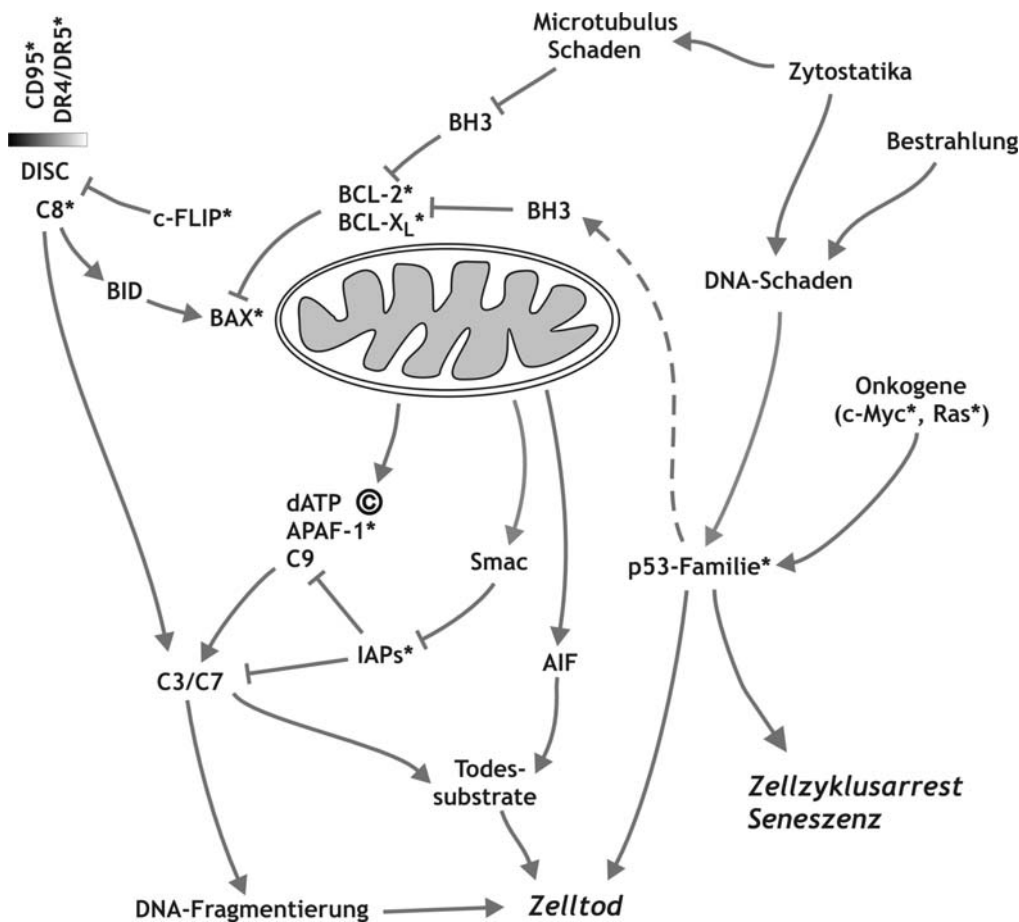


Abb. 1: Übersicht über Zelltodkaskaden bei malignen Gliomzellen. Todesliganden induzieren Zelltod über Todesrezeptoren und den Caspase 8-abhängigen extrinsischen Zelltodweg. Dabei wird der intrinsische (mitochondriale) Zelltodweg mit aktiviert. Zytostatika und Bestrahlung aktivieren in Gliomzellen primär den intrinsischen Zelltodweg und sind unabhängig von Todesliganden und -Rezeptoren; *, Apoptose-relevante Proteine mit häufigen Alterationen bei menschlichen Malignomen; C3/C7/C8/C9, Caspasen 3/7/8/9; ©, Cytochrom c.

2.3.4 Die Bedeutung der CD95-induzierten Apoptose

Das CD95-System spielt eine große Rolle in der negativen Kontrolle des Immunsystems bei der peripheren klonalen Deletion potentiell autoaggressiver reifer Lymphozyten und bei der Eliminierung aktivierter Lymphozyten nach erfolgter Immunantwort. Eine weitere Aufgabe spielt es bei bestimmten „immunprivilegierten“ Organen, z.B. Augen und Hoden. In ihnen finden nur schwache Immunreaktionen statt, vermutlich damit Organschäden durch starke Entzündungen verhindert werden können. Diese Organe exprimieren CD95L; dadurch werden Entzündungszellen eliminiert und damit die Immunantwort begrenzt (24). Da auch auf Tumorzellen eine CD95L-Expression gefunden werden kann, wird vermutet, dass Tumorzellen auf diese Weise die Immunabwehr unterdrücken (90, 93).

Auch Gliomzellen exprimieren CD95, und viele Gliomzelllinien können durch Aktivierung von CD95 getötet werden (92). In normalem Gehirnparenchym wird CD95 nicht exprimiert.

2.4 Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

2.4.1 Rezeptortyrosinkinasen

Viele Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren spielen eine große Rolle bei der Modulation der Zellteilung, der Proliferation, der Zelldifferenzierung und der Apoptosesensitivität.

Die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren EGF, IGF-I/II, FGF und PDGF, aber auch noch weiterer Wachstumsfaktoren sind transmembrane Glykoproteine. Ein typischer Vertreter der Tyrosinkinase-Rezeptoren ist der EGFR (auch erbB1, HER1). EGFR gehört zu der ErbB-Familie der Typ-I-Tyrosinkinase-Rezeptoren. Dazu gehören außerdem: Neu (erbB2/HER2), erbB3 (HER3) und erbB4 (HER4) (27). Der Aufbau soll am Beispiel des EGFR erklärt werden. Er besitzt eine cysteinreiche extrazelluläre Region, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Aktiviert wird der EGFR, wenn ein Ligand, wie EGF, TGF- α oder Amphiregulin, an die Extrazellulärdomäne bindet. Der EGFR dimerisiert entweder mit einem weiteren EGFR-Monomer

oder einem anderen Mitglied der erbB-Familie (71). Nach der Dimerisierung wird die intrinsische Tyrosinkinase aktiviert und die Autophosphorylierung folgt. Durch die Aktivierung der Rezeptoren werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst. Zu den wichtigsten gehören die *Ras-Raf-mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/ Proteinkinase P (PKB)/ Akt-Kaskaden (Abbildung 2).

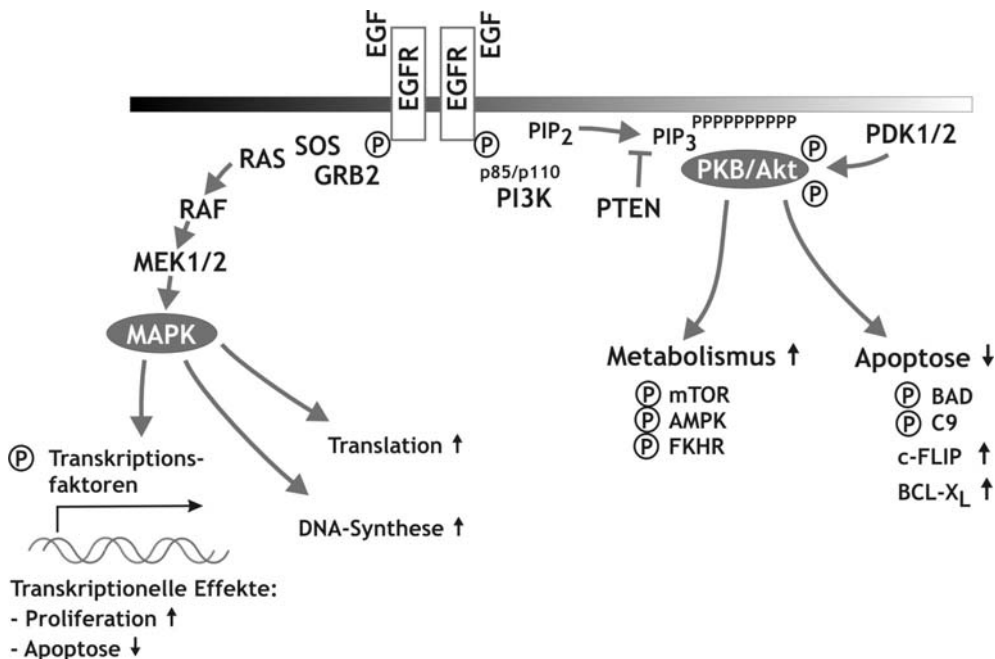


Abb. 2: Modell der EGFR-abhängigen Signaltransduktion. Liganden-induzierte Dimerisierung führt über Autophosphorylierung zur Aktivierung des EGFR (73). Über die Adaptorproteine GRB2 und SOS und das GTP-bindende Protein RAS wird die **MAPK-Kaskade** aktiviert. Über pleiotrope Effektoren induziert diese vor allem proliferative Effekte. Die **PI3K-PKB/Akt-Kaskade** stellt einen zweiten Hauptsignalweg dar. Durch Aktivierung der PI3K und Bildung von Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat (PIP₃) wird PKB/Akt an die Zellmembran rekrutiert und phosphoryliert. PKB/Akt moduliert dann die Aktivität einer Vielzahl von Proteinen. Dabei können antiapoptotische und metabolisch aktivierende Funktionsgruppen unterschieden werden. C9, Caspase 9; ppp, *pleckstrin-homology domain*.

2.4.2 MAPK-Signalweg

Der MAPK-Signalweg als einer der wichtigsten Signalwege, der von EGFR und PDGFR, aber auch von anderen Rezeptortyrosinkinasen, stimuliert wird, spielt eine große Rolle bei zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Entwicklung und Tumorgenese.

Nach der Aktivierung des Rezeptors bewirken Adapterproteine wie *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2), dass das Ras-aktivierende *son-of-sevenless guanine nucleotide exchange factor* (SOS) mit dem Rezeptor einen stabilen Komplex bildet, der für die Aktivierung des membrangebundenen RAS, einem kleinen G-Protein, notwendig ist. Die Aktivierung findet durch die Umwandlung von GDP in GTP statt. Durch EGF wird RAS über das Adapterprotein Shc aktiviert. Shc bindet an den aktivierten Rezeptor, wird phosphoryliert und bildet so eine Bindungsstelle für Grb2 (72). Außerdem erleichtert die Tyrosinphosphatase SHP-2, die an das Adaptorprotein Gad1 gebunden ist, die Relokalisation von SOS an GTP-gebundenes RAS (46, 103). In beinahe 50% aller metastasierenden Tumoren wurden RAS-Mutationen festgestellt (10). In Gliomen wurden keine Mutationen von RAS entdeckt, in Astrozytomen jedoch große Mengen an RAS-GTP (26, 28). Transformationen von RAS in NIH3T3-Zellen bewirken eine erhöhte Menge an Cyclin D1 und beschleunigte G1-Progression (48). Außerdem kann man bei einer Überexpression von RAS in Gliomzellen eine ansteigende Menge an dem G1-spezifischen Proteinkomplex *cyclin-dependent kinase-4/ cyclin D* beobachten, das die Zelle in die S-Phase und Mitose treibt.

Im nächsten Schritt aktiviert GTP-gebundenes RAS RAF1, eine weitere Proteinkinase. RAF1 wiederum phosphoryliert die *MAPK/ERK kinase* (MEK1), die wiederum *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2) und p40/42 MAPK phosphorylieren (32, 41). Die MAPKs phosphorylieren mittelbar und unmittelbar eine Reihe von Effektoren, insbesondere verschiedene Transkriptionsfaktoren, die Zellwachstum und Proliferation aktivieren. Weitere Substrate des RAS-Signalweges sind RAC/Rho (kleine GTP-bindende Proteine) und *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEKK). Der RAC/Rho-Signalweg spielt eine Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts. Der MAPK-

Signalweg wird durch Mitogene und Wachstumsfaktoren aktiviert, während die anderen Signalwege, die von RAS ausgehen, von inflammatorischen Zytokinen, Hormonen und verschiedenen Stressstimuli aktiviert werden. MEKK ist eine Serin-Threonin-Kinase, die ein weiteres Mitglied der MAPK-Familie, die *jun N-terminal kinase* (JNK) aktiviert. JNK wird über die *Stress-activated protein kinase* (SEK) aktiviert. Dieser Signalweg spielt eine Rolle sowohl für Apoptose als auch für Proliferation, außerdem spielt er eine Rolle in der Tumorgenese (5, 11).

2.4.3 Der PI3K/ PKB/ Akt-Signalweg

Die PI3K-Familie steht in Zusammenhang mit der malignen Transformation, zu der eine gesteigerte Proliferation, Wachstum, Invasivität, Metastasen, Angiogenese und Zellüberleben zählt. PI3K wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, kleine G-Proteine (z.B. RAS) und Rezeptortyrosinkinasen aktiviert. Der EGFR führt im Vergleich zu anderen Mitgliedern der HER-Familie zu einer schwächeren Aktivierung, da er keine intrazelluläre Bindungsstelle für PI3K besitzt. Die aktivierte PI3K phosphoryliert den Inositol-Ring der Membran-Phosphatidylinositole (PIP3 und PIP2). Dadurch werden Signalproteine wie PKB/Akt, *phosphatidylinositol-dependent-kinase 1/2* (PDK1/2), kleine Proteine der RAS-Familie und Phospholipase C- γ (PLC- γ) zur Zellmembran rekrutiert, damit diese Signalproteine näher in Kontakt mit ihren Substraten treten können (17, 67). Aktiviertes Akt phosphoryliert und inhibiert proapoptotische Proteine wie BAD, das dadurch das antiapoptotische Protein BCL-X_L nicht mehr binden kann, die Caspase 9, Forkhead-Transkriptionsfaktoren und die *glycogen synthase kinase* (GSK), um das Überleben der Zelle zu fördern (7, 8, 15).

Auch andere Signalwege interagieren mit dem PI3K-Signalweg auf der Ebene von Akt. RAS aktiviert den PI3K-Signalweg, während Akt auch die Aktivität von RAS/RAF/MAPK reguliert, indem es RAF phosphoryliert und inaktiviert (71). PI3K kann durch Proteinphosphatasen, wie das Produkt des Tumorsuppressorgens *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10* (PTEN) inhibiert werden. PTEN hemmt die Aktivität von Akt, indem es die Konversion von PIP3 in PIP2 hemmt (18, 22, 85). Bei U87MG-

Glioblastomzellen (PTEN-defizient) unterdrückt Transfer von PTEN das Zellwachstum, indem es die Zellzyklusprogression über G1 blockiert. Bei primären Glioblastomen wird PTEN-Inaktivierung häufiger beobachtet als bei sekundären Glioblastomen, die aus Astrozytomen des Grades II oder III entstehen. 80% aller humanen Glioblastome exprimieren aktiviertes Akt (29). Überexpression des konstitutiv aktivierten Akt führt in einem humanen Gliommodell zur Umwandlung eines anaplastischen Astrozytoms in ein Glioblastom (78).

Ein weiterer Bestandteil des PKB/Akt-Signalweges ist *mammalian target of rapamycin* (mTOR). MTOR, eine Serin/Threoninkinase ist ein Mitglied der PIKK-Familie (*phosphoinositide 3-kinase-related-kinase*). MTOR integriert Hungersignale, wie Glukose- und Aminosäuredepletion und von Wachstumsfaktoren gesteuerte Signale, und reguliert metabolische und proliferative Programme vor allem über translationelle Mechanismen (74). Außerdem wurde festgestellt, dass Tumorzellen ohne PTEN-Aktivität sensitiver auf mTOR-Inhibition reagieren (60).

MTOR vermittelt seine translationelle Kontrolle über zwei Effektoren. Die p70 S6-Kinase 1/2 (p70S6K) ist für die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 (RPS6) verantwortlich. Die Translation von einigen hundert mRNAs wird von p70S6K kontrolliert. Diese mRNAs kodieren für wichtige Funktionsproteine der Translation. Außerdem spielt p70S6K eine Rolle bei der Kontrolle der Zellgröße, des Zellwachstums und der Proliferation (75). Aktiviert wird p70S6K vermutlich über drei Signalwege: MAPK, PI3K und mTOR (20; 65). Der zweite Effektor von mTOR ist der eukariotische Initiationsfaktor 4E (eIF4E), der die Translation bestimmter mRNAs reguliert.

2.4.4 Wachstumsfaktorrezeptoren und Tumorgenese

Auch hier soll der EGFR wieder als Beispiel dienen, da sein Einfluss auf Tumorentwicklung und Therapieresistenz am besten untersucht ist. Signalwege, die durch EGFR aktiviert werden, spielen bei vielen Aspekten der Tumorbilogie eine Rolle. Sie sind beteiligt an Tumorwachstum und Tumorprogression, Proliferation, Angiogenese, Invasivität, Metastasierung und

Inhibition der Apoptose (30, 98). Die Expression von EGFR in manchen Tumortypen korreliert mit schlechter Überlebensprognose, schlechter Ansprechrate auf Therapien (6) und der Entwicklung von Resistenzen (54, 99). Eine hohe Expression des EGFR wurde in einer Vielzahl von Tumoren festgestellt. So wurde auch in über 50% der primären Glioblastome eine Überexpression oder Genamplifikation des EGFR beobachtet (97). Nach manchen Analysen ist eine hohe Expression des EGFR besonders bei jungen Patienten mit Glioblastom mit einer schlechten Prognose assoziiert (76, 77). Zu den Mechanismen der Überexpression des EGFR gehören neben der Amplifikation eine gesteigerte Transkription des EGFR-Gens und auf Proteinebene ein reduzierter Abbau. Die Aktivierung des Wildtyp-EGFR erfolgt über autokrine/parakrine Stimulation. Neben der Überexpression treten auch häufig Mutationen des EGFR auf. Die bei Glioblastomen am häufigsten vorkommende Mutation des EGFR ist EGFRvIII, ein Onkoprotein mit Deletionen der Extrazellulärdomäne, das eine konstitutive Kinaseaktivität besitzt und so ligandenunabhängig aktiv ist (33). Überexpression des mutierten EGFRvIII in Astrozyten oder ihren Vorläufern fördert in transgenen Mäusen die Entwicklung maligner Gliome (31). Transduktion von U87MG Zellen mit dem mutanten Rezeptor bewirkt eine gesteigerte Proliferation und eine reduzierte Apoptose der Tumorzellen im Nacktmausmodell (61, 3). Im Gegensatz dazu zeigt eine Überexpression des Wildtyps diese Effekte nicht (81).

Das IGF-System besteht aus IGF-I und IGF-II, den IGF-Rezeptoren Typ I und II (IGF-IR und IGF-IIR) und spezifischen IGF-bindenden Proteinen 1-6 (IGFBP 1-6). Diese Faktoren regulieren normales Hirnwachstum und die Tumorentwicklung. Wie auch beim EGFR sind die beiden wichtigsten IGF-abhängigen Signalwege die PI3K/PKB- und MAPK-Kaskaden. Auch Signalwege, die mit dem Integrin- und Cadherinsystem interagieren, scheinen eine Bedeutung zu haben (89, 52, 73). In einigen Versuchsmodellen spielt der IGF-R eine Rolle als Vermittler der Metastasierung, wahrscheinlich über gesteigerte Migration (19), verminderte Zell-Zelladhäsion (52) und Hochregulation des Plasminogenaktivator uPA und Matrix-Metalloproteinasen (105). Die Bedeutung des IGF-R zeigte sich zunächst durch die Beobachtung,

dass konstitutive Überexpression des IGFR und/oder Überaktivierung seiner Signalwege zu einem transformierten Phänotyp in kultivierten Zellen führt (36). Später wurde in IGFR-Knockout-Mäusen gezeigt, dass bei Abwesenheit von IGFR verschiedene tumorinduzierende Stimuli (viral, chemisch, genetisch) keine Transformation induzieren, jedoch bei Reexpression des IGFR wieder tumorinduzierend wirken (1, 2). *In vitro*-Experimente und epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass IGFR in verschiedenen Neoplasien, wie Karzinomen der Lunge, Brust, Pankreas, Leber und Kolon zur Tumorentwicklung beiträgt (40). In primärem Brustkrebszellen wird IGFR im Vergleich zu gesunden epithelialen Brustzellen überexprimiert und hyperphosphoryliert (83). Überaktivierung des IGFR entsteht durch autokrine und parakrine Stimulation, da viele Tumoren IGFR-Liganden produzieren. Gesteigerte Expression von IGF-I-Protein und IGF-I-mRNA wurde in Gliomen, Meningeomen und weiteren Tumoren festgestellt. Bekannt ist auch, dass hohe IGF-Plasmakonzentrationen mit einem erhöhten Tumorrisiko zusammenhängen. Abnormales Imprinting des IGF-II wurde in Gliomen, Medulloblastomen und Meningeomen beschrieben (106). Beide IGF-Rezeptortypen werden in Gliomen exprimiert, vor allem aber scheint der IGF-Rezeptor Typ I (IGF-IR) in Hirntumorgewebe hochreguliert zu sein.

Auch der PDGFR spielt bei der Entstehung von Gliomen eine wichtige Rolle, außerdem wirkt er bei der normalen Migration und Differenzierung neuronaler Stammzellen (49). PDGF scheint ein Regulator der Gliogenese und besonders der Entwicklung der Oligodendrozyten zu sein. Koexpression von PDGF und PDGFR wurde in niedrigmalignen Astrozytomen, anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen nachgewiesen. Überexprimiert wird PDGFR vor allem in niedrigmalignen Astrozytomen und sekundären Glioblastomen. Dies ist mit einem Verlust des Tumorsuppressorgens p53 assoziiert (88).

Die FGFs sind für eine Vielzahl von Funktionen verantwortlich: Wundheilung, Angiogenese und Tumorgenese (36). Ebenso wie die anderen vorgestellten Tyrosinkinase-Rezeptoren und ihre Liganden wird den FGFs und ihren Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Vielzahl von malignen Tumoren (auch maligner Gliome) zugeordnet. So berichten Morrison und

Mitarbeiter, dass das Zellwachstum von Gliomen durch antisense-Oligonukleotide gegen FGF-II inhibiert werden kann (55). Außerdem wurde beobachtet, dass die Malignität von Astrozytomen mit der Expression des FGFR korreliert (102).

2.4.5 Rezeptortyrosinkinasen und Tumorthherapie

Da die Rezeptortyrosinkinasen und ihre Liganden einen großen Einfluss auf die Tumorentwicklung und die Entstehung von Therapieresistenz haben, ist es naheliegend, die Aktivität der Rezeptortyrosinkinasen selbst oder der nachgeschalteten Signalkaskaden zu supprimieren, um Proliferation und Vitalität der Tumorzellen zu reduzieren.

Für die Inhibition des EGFR sind bereits einige Strategien entwickelt worden: Der monoklonale Antikörper C225/Cetuximab (EGFR) wird beim Kolonkarzinom eingesetzt. Die Anwendung von Antikörpern bei Tumoren des zentralen Nervensystems, also auch in Glioblastomen ist allerdings problematisch, da die großen monoklonalen Antikörper die Blut- Hirnschranke schlecht überwinden können. Außerdem exprimieren einige Glioblastome die mutierte Form des EGFR (EGFRvIII), die der Antikörper nicht bindet (33). Auch eine Reihe von Tyrosinkinaseinhibitoren wurden entwickelt, die die Autophosphorylierung des EGFR und die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege verhindern (43). Diese Substanzen sensibilisieren *in vitro* humane maligne Gliomzellen gegenüber der Induktion von Apoptose (79). Als weitere experimentelle Therapiestrategie wurden die Gentherapie mit dominant-negativen Konstrukte etabliert (62, 68). Die Ergebnisse der ersten klinischen Studien mit diesen Inhibitoren als Monotherapie bei Patienten mit Glioblastomen sind dagegen enttäuschend.

Verschiedene Ansätze wurden auch in der anti-IGFR-Therapie entwickelt: antisense mRNA für IGF-I und IGF-IR (86, 63), Expression von dominant-negativem IGF-IR (47) oder Verwendung neutralisierender Antikörper gegen IGF-IR (35). Durch diese Ansätze zeigte sich eine Inhibition des Wachstums der Tumorzellen und eine Verzögerung der Progression einiger Tumorarten im Tiermodell.

2.4.6 Zusammenspiel der Rezeptortyrosinkinasen EGFR und IGF-IR

Ein wichtiger Mechanismus, der dem Versagen der anti-EGFR-Therapie zugrunde liegen kann, ist die Kompensierung der anti-apoptotischen Eigenschaften des EGFR-Signalweges durch die Aktivierung anderer Rezeptortyrosinkinasen. In malignen Gliomen ist der IGF-IR ein Vertreter für einen solchen Kompensationsmechanismus. Er wird in Gliomzellen exprimiert und aktiviert viele der gleichen Signalwege wie der EGFR, vor allem den PI3K/PKB-Signalweg (42). Die Funktionen des IGF-IR und des EGFR sind miteinander verknüpft. So ist bekannt, dass der IGF-IR notwendig ist, um die Aktivierung des EGFR zu ermöglichen (12). Außerdem sind IGF-IR-defiziente Zellen resistent gegenüber Transformationen durch den EGFR (89). IGF-I kann Apoptose, die durch einen Antikörper gegen den EGFR induziert wird, in DiFi-Zellen verhindern (100).

Die Resistenz, die bei anti-EGFR-Therapie auftritt, steht nicht unbedingt mit der EGFR-Expression in Zusammenhang. Vielmehr kann durch die anti-EGFR-Behandlung eine kompensatorische Hochregulation und Aktivierung anderer proliferativer und anti-apoptotischer Signalwege stattfinden. Chakravarti und Mitarbeiter (9) zeigten 2002, dass auch bei Blockade des EGFR durch den Inhibitor AG1478 in primären Glioblastomzelllinien der IGF-IR die Funktion des EGFR kompensieren kann. Dabei resultierte die Inhibition des EGFR in einer gesteigerten Phosphorylierung des IGF-IR. Dies führte dazu, dass die spontane und strahleninduzierte Apoptose inhibiert wurde und die Zellen eine gesteigerte invasive Fähigkeit erlangten. Hier wurde also ein Mechanismus gezeigt, wie EGFR-exprimierende Gliome gegenüber der alleinigen anti-EGFR-Therapie resistent werden können. Die kombinierte Inhibition des EGFR und IGF-IR steigerte dagegen die spontane und strahleninduzierte Apoptose und bewirkte eine Reduktion des invasiven Potentials.

Lu et al. entwickelten 2003 (50) einen rekombinanten bispezifischen Antikörper, der gegen EGFR und IGF-IR gerichtet ist. Er verhindert, dass EGF und IGF an ihre Rezeptoren binden. So wird auch die Aktivierung der Signalwege PI3K/PKB/Akt und MAPK unterbunden und die Tumorzellproliferation inhibiert.

Auch so kann die wechselseitige Kompensation der Wachstumsfaktorenrezeptoren als Resistenzmechanismus unterdrückt werden. An diese Ergebnisse soll die vorliegende Arbeit anknüpfen und zeigen, dass durch Inhibition des IGF-IR die Möglichkeit besteht, die proapoptotischen Effekte der EGFR-Inhibition in malignen Gliomen zu verbessern.

2.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Übergeordneter Gesichtspunkt der Arbeit war die Entschlüsselung der Interaktion verschiedener Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden für Proliferation und Apoptoseresistenz maligner Gliomzellen. Dabei wurden folgende Teilaspekte untersucht :

- Wachstumsverhalten von zwölf humanen Gliomzelllinien bei Serumentzug
- Abhängigkeit humaner maligner Gliomzellen von Wachstumsfaktoren *in vitro* (EGF, IGF-I, FGF-I, PDGF)
- Abhängigkeit humaner maligner Gliomzellen von den Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR und/oder IGF-IR.

Dabei wurden zunächst Proliferation, spontaner und CD95L-induzierter Zelltod charakterisiert. Anschließend wurden Experimente mit temperatursensitiven p53-Mutanten durchgeführt, um die Bedeutung von p53 für die Synergie von EGFR- und IGF-IR-Blockade zu entschlüsseln.

Schließlich wurden die Veränderungen der nachgeschalteten Signalkaskaden untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Agarosegelkammer	Mupid-21, DNA Technologies, Inc.
Bakterieninkubator	Modell B12 (130I), Heraeus Certomat MDII, B. Braun Biotech International
Bakterienschüttler	Certomat HK, B. Braun Biotech International
Brutschrank	HeraCell 150, Heraeus
Casy Zellzähler	Schärfe Systems
Photometer	Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories
FACS	FACSalibur, Beckton und Dickinson
Feinwaage	Kern GI
Heiz-/Kühl-Schüttler	Eppendorf
Heizblock	Heraeus
Laborwaage	Kern 474
Magnet-Rührer	Heidolph MR3000
Mikroskope (Zellkultur)	Wilovert A, Hund Eclipse TS100, Nikon
Multipette	Eppendorf
Pipettierhilfe (Accu Jet)	Brand
Pipette	Finnpette
Spannungsquelle	Power Pac, Bio-Rad
Standzentrifuge	Megafuge 1R mit Kühlung, Heraeus
Sterilwerkbank	Technoflow, Integra Biosciences
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus
Vortexer	IKA Labortechnik MS2 Minishaker, Scientific Industries
Wasserbad	VWR

3.2 Materialien

24-Loch-Platte	Falcon, Becton Dickinson
96-Loch-Platte	Falcon, Becton Dickinson
Cellscraper	Beckton & Dickinson
ECL Plus Entwicklungsreagenz	Amersham-Buchler
Einmalpipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50 ml, steril)	Rolf Greiner BioChemica
Filterpapier für Immunoblots	Bio-Rad
Kryoröhrchen (18 ml, steril)	Nunc
Nitrozellulose Membran	Bio-Rad
Pipettenspitzen weiß, gelb, blau	Eppendorf
PVDF- Membran (Hybond TM -P; 0,45 µm)	Amersham
Reaktionsgefäß (1, 5 und 2 ml)	Eppendorf
Röntgenfilme	Hyperfilm, Amersham Biosciences
Stepperpipetten (2, 5 ml)	Eppendorf
SuperSignal ^R West Pico	Pierce
Chemiluminescent Substrat	
Zählkammer nach Neubauer	Marienfeld
Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²)	Falcon
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml, steril)	Falcon, Becton Dickinson
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche

3.3 Reagenzien und Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid, 29:1	Bio-Rad
AG 1478	Calbiochem
AG 1024	Calbiochem
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Serva
Aprotinin	Sigma
Bradford-Reagenz	Bio-Rad

Bromphenolblau	Serva
BSA (Fraction V standard grade lyophilized)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol	Fluka
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit Glutamin	Bio-Whitacker
Dulbecco's PBS	Gibco BRL
Epidermal Growth Factor (EGF)	Calbiochem
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fibroblast Growth Factor-I (FGF-I)	Calbiochem
G418	Gibco BRL
Glycin	Roth
Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)	Calbiochem
Leupeptin	Sigma
Magermilchpulver	Difco
Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Merck
Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE	Bio-Rad
N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka
Natriumazetat	Sigma
Natrium-Azid	Serva
Natriumchlorid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumvanadat/ NaVO ₅	Sigma
OPA-Puffer	Amersham
PD153035	Tocris
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	Calbiochem
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma Aldrich
Ponceau-Rot S	Merck
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma
Trypsin	Gibco BRL
Tween-20	Fluka
β -Mercaptoethanol	Fluka

3.4 Antikörper

Anti-Kanninchen IgG, HRP-konjugierter Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Biotin, HRP-konjugierter Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
Annexin V-FITC	RocheMolecular Biochemicals
Caspase 8	Prof. Dr. Krammer
FITC-markierter Maus-IgG- Antikörper (Isoantikörper)	Immunotech
FITC-markierter anti-CD95- Antikörper (UB2)	Immunotech
Path Scan Multiplex: Phospho-p90 ^{RSK} (Ser-380), Phospho-Akt (Ser-473), Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr-202/Tyr-204), Phospho-S6RP (Ser-235/236), eIF4E-Antikörper	Cell signaling Technology
PARP	BD Biosciences Pharmingen

3.5 Verzeichnis der Lieferanten

Amersham (Freiburg); Bachem (Heidelberg); B. Braun Biotech International (Melsungen); BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg); Becton-Dickinson (Heidelberg); Bio-Rad (München); Calbiochem (Bad Soden); Cell Signaling Technology (Beverly, CA); DNA Technologies, Inc (Gaithersburg, MD); Eppendorf (Hamburg); Falcon (Heidelberg); Fluka (Neu-Ulm); Gibco BRL (Eggenstein); Heraeus (Hanau); Immunotech (Hamburg); Marienfeld (Bad Mergentheim); Merck (Darmstadt); Nunc (Roskilde, Dänemark); Pierce Biotechnology Inc. (Bonn); Rolf Greiner BioChemica (Flacht); RocheMolecular Biochemicals (Mannheim); Roth (Karlsruhe); Santacruz (Santa Cruz, CA); Schärfe Systems (Reutlingen); Serva (Heidelberg); Sigma (Deisenhofen); Tocris (Bristol, UK); Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories (Meckenheim); VWR (Wien)

3.6 Puffer, Medien und Lösungen

Blockierungspuffer für Immunoblot	1xPBS 0,05% Tween-20 5% Magermilchpulver 1 mM Glutamin
Durchflusszytometriepuffer	1 g BSA und 10 g Natriumazid wurden in 100 ml PBS gelöst
FCS (fötale Kälberserum)	Fetales Kälberserum wurde durch 30- minütige Erwärmung auf 56°C inaktiviert und danach bei – 20°C gelagert
Formaldehydlösung 1%	5 g Formaldehyd wurden in 500 ml PBS gelöst
Kristallviolett-Färbelösung	0,5% Kristallviolett 20% Methanol H ₂ O

Laufpuffer für die SDS-PAGE (5x)	25 mM Tris 193 mM Glycin 0,5% SDS H ₂ O vor Gebrauch 1:5 mit H ₂ O verdünnen
Lyse-Medium für LDH-Freisetzungsmethode	DMEM 1% FCS 2% Triton X100
Lyse-Puffer P	50 mM Tris-HCl, pH=8,0 120 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% NP-40 H ₂ O bei 4°C aufbewahren Unmittelbar vor Gebrauch zu 1 ml Lyse-Puffer P folgende Inhibitoren zupipettieren: Arbeitskonzentration 2 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 1 mM PMSF
Natriumzitratlösung	0,1 M Natriumzitat 50% Ethanol H ₂ O
PBS (10x)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O KH ₂ PO ₄
SDS Ladepuffer nach Lämmli (2x)	100 mM Tris-HCl (pH=6,8) 4% SDS 0,2% Bromphenolblau

	20% Glycerol
	H ₂ O
Serumfreies Medium	DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin
TBS (10x)	NaCl
	Tris Base
	80 g
	24,2 g
	mit Aqua dest auf 1 l auffüllen, pH=7,6 mit HCl einstellen
Transferpuffer (10x)	25 mM Tris-HCl
	193 mM Glycin
	H ₂ O
Transferpuffer (1x)	100 ml 10x Transferpuffer
	200 ml Methanol
	700 ml H ₂ O
	vor Gebrauch auf 4°C kühlen, kann mehrmals verwendet werden
Verdünnungspuffer (TS-TMBSA) für primäre Antikörper für den Immunoblot	10 mM Tris-HCl
	150 mM NaCl
	0,1% Tween-20
	5% Magermilchpulver
	2% BSA
	0,01% NaN ₃
	H ₂ O
	pH= 7,4-7,6 einstellen, Lösung in 50 ml Aliquots bei -20°C aufbewahren.
Verdünnungspuffer zum Ansetzen der Antikörper	Für 20 ml wurden 2 ml 10X TBS mit 18 ml Wasser, 1 g BSA und 20 µl Tween-20 gemischt.
Vollmedium	DMEM mit 10% inaktiviertem FCS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung

Waschpuffer für Immunoblot-Membranen	1xPBS 0,05% Tween-20
--------------------------------------	-------------------------

3.7 Zellkultur

3.7.1 Zelllinien

Es wurden zwölf verschiedene, im Labor etablierte, von malignen Gliomen abgeleitete Zelllinien verwendet (95): A172, D247MG, LN-18, LN-308, LN-319, LN-428, LNT-229, T98G, U138MG, U251MG, U373MG, U87MG.

3.7.2 Kultivierung der Zellen

Zur Kultivierung der Zellen wurden Standardmethoden verwendet. Wie viel Vollmedium, PBS, und Trypsin in dem jeweiligen Kulturflaschentyp verwendet wurde, ist aus der Tabelle ersichtlich. Kultiviert wurden die Zellen in einem Heraeus -Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

	Vollmedium	PBS	Trypsin
75 cm ²	5 ml	5 ml	0,5 ml
175 cm ²	10 ml	10 ml	1 ml
375 cm ²	20 ml	20 ml	2 ml

Bei Konfluenz der adhärennten Zellen wurde das Medium abgesaugt. Da Trypsin durch FCS inaktiviert wird, wurde mit 10 ml PBS (mittlere Zellkulturflasche) gründlich gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde 1 ml Trypsin zugegeben und durch Schwenken so verteilt, dass alle Zellen bedeckt wurden. Danach wurden die Zellen für zwei Minuten in den Brutschrank gestellt. Unter Klopfen der Zellkulturflasche lösten sich die Zellen vom Boden ab und konnten in frischem Vollmedium aufgenommen werden.

3.8 Untersuchung von Zytotoxizität

3.8.1 Kristallviolettassays

Um das Überleben von Zellen zu quantifizieren, wurden Kristallviolettassays durchgeführt. Das zugrundeliegende Prinzip besteht darin, dass nur lebende Zellen auf der Platte adhären und damit von Kristallviolett angefärbt werden. Tote Zellen sind nicht adhären und werden am Ende des Versuches abgesaugt. Mittels eines Photometers kann dann die Extinktion bei 550 nm als Maß der Färbung gemessen werden. Dabei ist die Extinktion proportional zur Zellzahl.

Für die einzelnen Versuche wurden die Zellen abtrypsinisiert und mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro ml Medium bestimmt. Diese Zellsuspension wurde dann entsprechend verdünnt. Für die Experimente wurden auf 96-Well-Platten 500 oder 5000 Zellen pro Well in je 100 µl Vollmedium ausgesät. Nachdem die Zellen 24 h angewachsen waren, wurde das Medium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellen behandelt. Auf jeder Platte wurde jede Behandlung in mindestens drei Wells durchgeführt. Nach Ende des Versuches wurden die Platten erst mikroskopisch untersucht, dann wurde das Medium abgesaugt und je 50 µl Kristallviolettlösung pro Well pipettiert. Nach 15 min wurde die Lösung abgeschüttet, die Platten gründlich gewaschen und 24 h an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurden in jedes Well 50 µl Natriumzitat pipettiert, um die gefärbten Zellen zu lösen. Damit wurde gewährleistet, dass nicht falsche Werte gemessen wurden, für den Fall, dass die Zellen nicht gleichmäßig auf der Fläche des Wells verteilt waren und so die Lichtstrahlen des Photometers Stellen getroffen hätten, an denen sich zu viele oder zu wenige Zellen befanden. Ausgemessen wurden die Platten im Photometer bei 550 nm. Als Leerwert wurde die Extinktion von leeren Wells nach Färben mit Kristallviolett und Lösen mit Natriumzitat verwendet. Dieser wurde abgezogen. Anschließend wurden der Mittelwert und die Standardabweichung für Stichproben berechnet.

3.8.2 LDH-Assay

Die Zerstörung der Zytoplasmamembran der Zellen ist ein typisches morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose, tritt aber auch in späteren Stadien der Apoptose auf. Sie führt zu einer Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteilen, wie z.B. Enzymen in das Zellkulturmedium, von denen die meisten schnell abgebaut werden. Eine Ausnahme bildet die Lactatdehydrogenase (LDH), die auch außerhalb der Zelle sehr stabil ist. Im LDH-Assay wird die Aktivität des Enzyms durch die Umsetzung eines Formazansalzes nachgewiesen. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag des gelösten Salzes, der photometrisch quantifiziert werden kann.

3.9 Proteinbiochemische Methoden

3.9.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zellen, die über Nacht angewachsen waren, wurden in Vollmedium in Zellkulturflaschen ausgesät behandelt. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und dieses wieder abgesaugt. Anschließend wurde PBS mit 1% PMSF auf die Zellen gegeben; diese wurden mit dem Cellscrapper von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst, mit einer Pipette resuspendiert und in ein 15 ml-Röhrchen auf Eis überführt. Die Röhrchen wurden 10 min bei 1800 u/min und 4°C zentrifugiert. Falls abgelöste Zellen dem Lysat hinzugeführt werden sollten, wurde das Medium mit den Zellen abpipettiert, abzentrifugiert und mit den adhären Zellen gepoolt.

Zu 1 ml Lysepuffer P wurden jeweils 2 µl Aprotinin und Leupeptin, 7 µl PMSF, 50 µl Natriumfluorid und 10 µl Natriumvanadat der oben genannten Ausgangslösungen gegeben und mit einem Vortex-Gerät gemischt. Bei Lysaten für einen phosphospezifischen Western-Blot wurden außerdem Phosphatase-Inhibitoren dazu gegeben. In dem zentrifugierten Röhrchen wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet, je nach Größe, in 50-100 µl Lysepuffer P resuspendiert. Nach 15 min auf dem Eis wurde das Lysat in ein Eppendorf-Cup überführt und 15 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand

wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt, bei -20°C eingefroren und das Pellet, das Gerüst- und Membranproteine enthielt, wurde verworfen.

3.9.2 Messung der Proteinkonzentration

Das Prinzip besteht darin, dass das Biorad-Protein-Reagenz seine Farbe in Anwesenheit von Proteinen von braun auf blau verändert. Somit kann photometrisch die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Zuerst wurde ein Ansatz für eine Proteinstandardreihe durchgeführt. Die 1%ige BSA-Lösung wurde 1:10 mit PBS verdünnt, so dass eine Proteinkonzentration von $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ vorlag. Außerdem wurde das Biorad-Reagenz 1:4 mit H_2O verdünnt. In einer 96-Well-Platte wurden pro Well $50\ \mu\text{l}$ H_2O vorgelegt. Für die Standardwerte und Messwerte wurden jeweils Triplikate angelegt. Als Standardwerte wurden jetzt 1, 2, 4, 6, 8, 10 oder $12\ \mu\text{l}$ der BSA-Lösung dazupipettiert. Von den Proteinlysaten wurde jeweils $1\ \mu\text{l}$ pipettiert. Danach wurden $150\ \mu\text{l}$ der Biorad-Proteinreagenzlösung dazugegeben und nach 10-60 min die Extinktion am Photometer bei $550\ \text{nm}$ gemessen.

3.9.3 Westernblot

3.9.3.1 Probenvorbereitung

Pro Spur wurden $20\ \mu\text{g}$ Protein eingesetzt. Deshalb wurde jeweils ein Volumen entsprechend $20\ \mu\text{g}$ von den Proteinlysaten in ein neues Cup gegeben und dazu ein gleiches Volumen an Ladepuffer hinzugefügt. Diese Cups wurden dann kurz in einem Vortex-Gerät gemischt. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 95°C wurden die Proben denaturiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Cups bis zur Benutzung auf Eis gelagert.

3.9.3.2 Gießen des Gels und Elektrophorese

Das Prinzip besteht darin, dass die Probenproteine, die durch die Denaturierung ungefaltet und gleichmäßig elektrisch geladen vorliegen, je nach Molekulargewicht unterschiedlich schnell in einem elektrischen Feld durch ein Gel laufen. Dabei laufen große Proteine langsamer als kleine Proteine und befinden sich also auf dem Gel nach einer gewissen Zeit weiter oben als die kleinen Proteine. So findet eine Auftrennung nach Molekulargewicht statt. Je

nachdem, wie groß das zu untersuchende Protein ist, wird ein entsprechend dichtes Gel gewählt, denn je dichter das Gel, desto weniger weit wandern die Proteine. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wurde also der Größe des zu untersuchenden Proteins angepasst und betrug zwischen 8 und 15% (s. Tab. 1):

Acrylamidkonzentration (%)	8	10	12	15
Aqua dest. (ml)	2,3	2,0	1,7	1,2
30% Acrylamid/Bisacrylamid (ml)	1,3	1,7	2,0	2,5
1,5 M Tris-HCl pH=8,8 (ml)	1,3	1,3	1,3	1,3
10% SDS (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05
10% APS (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED (ml)	0,004	0,004	0,004	0,004

Tab. 1 : Zusammensetzung der Polyacrylamidtrenngele.

Damit in allen Spuren die Proteine den gleichen Startpunkt haben, wurde oberhalb des Trenngels ein niedrigprozentiges Sammelgel gegossen. Darin findet so gut wie keine Auftrennung nach Größe statt, vielmehr gewährleistet es, dass alle Proteine auf der gleichen Höhe sind, wenn sie das Trenngel erreichen.

Die Westernblotkammer wurde nach Vorschrift zusammengebaut und mit Wasser auf Dichtheit geprüft. Dann wurde das Trenngel gegossen. Dazu wurden zuerst Aqua dest., 30% Acrylamid-Mix, Tris pH 8,8 und 10% SDS-Lösung gemischt. Erst danach wurden APS und TEMED hinzugefügt, da diese beiden Substanzen die Polymerisierung starten. Das Gel muss dann zügig gemischt und in die Kammer gegossen werden. Danach wurde das Gel mit Wasser überschichtet, um Luftblasen zu verhindern und um die Polymerisierung zu ermöglichen. Nach 20-25 min war das Trenngel fest polymerisiert und das Wasser wurde abgenommen.

Dann wurde das Sammelgel gegossen. Zu 1,15 ml Aqua dest. wurden 0,33 ml 30% Acrylamid-Mix, 0,5 ml Tris pH 6,8 und 0,02 ml 10% SDS und am Schluss

0,02 ml APS und 0,002 ml TEMED gegeben. Daraufhin wurde das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und der Kamm der Apparatur in das Sammelgel gedrückt. Auch diese war nach 20-25 min polymerisiert.

Danach wurde der Kamm entfernt, die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und die Proben in die Taschen pipettiert. Die Apparatur wurde an eine Spannung von 200 V angeschlossen, die resultierende Stromstärke lag bei etwa 60 mA. Sobald die Laufmittelfront unten am Rand des Gels angelangt war, wurde die Elektrophorese beendet.

3.9.3.3 Transfer auf die Nitrozellulosemembran

Die aufgetrennten Proteine werden durch Anlegen einer Spannung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (= geblottet). Dazu wurden die Gelkammer auseinandergelöst und das Gel vorsichtig von den Glasscheiben gelöst. Die Blottingkammer wurde so zusammengesetzt, dass die Nitrozellulosemembran unmittelbar auf dem Gel lag. Nach Einbau der Blottingkammer in das Gerät, Einsetzen einer Eiskammer und Einfüllen des Transferpuffers wurde das Gerät auf einen Magnetrührer gestellt und eine Spannung von 100 V angelegt. Die Stromstärke betrug meist ca. 250 mA. Der Blotvorgang war nach einer Stunde beendet.

3.9.3.4 Visualisierung gelelektrophoretisch aufgetrennter Gele

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen mit Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und danach bei 4°C über Nacht mit dem ersten Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x15 min mit PBS-Tween gewaschen und danach für eine Stunde mit dem Zweitantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x15 min) wurde der Blot für 1 min mit 2 ml ECL-Luminolreagenz (je 1 ml Verstärker und Entwickler) überschichtet, danach mit einer transparenten Plastikfolie bedeckt und auf einen Röntgenfilm gelegt. Um das bestmögliche Verhältnis von Sensitivität und Auflösung/Hintergrund zu erreichen, wurden die Filme mit unterschiedlichen Zeiten belichtet. Diese wurden anschließend mit üblichen phototechnischen Methoden entwickelt.

Das Protokoll für den Multiplex Western Cocktail entspricht dem oben vorgestellten.

3.10 Durchflusszytometrie zum CD95-Nachweis

Das Prinzip besteht darin, dass zu den zu untersuchenden Zellen ein gegen CD95 gerichteter und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Antikörper dazugegeben wird. Mause IgG₁ wurde als Isotyp-Kontrolle verwendet.

Im Durchflusszytometriegerät wird die Zellsuspension mit einem Puffer verdünnt und durch eine Düse gepresst, so dass jedes Tröpfchen nur eine Zelle enthält. Diese Tröpfchen passieren nun einen Laserstrahl mit einer Anregungswellenlänge. Dadurch wird der durch den Antikörper an die Zelle gebundene Fluoreszenzfarbstoff zum Leuchten angeregt und die Energie in Form einer Lichtemission einer spezifischen längeren Wellenlänge wieder abgegeben. Diese Emission wird von einem Detektor gemessen, so dass für jede Zelle die Fluoreszenzintensität gemessen wird. Je mehr markierter Antikörper an die Zelle gebunden wird, desto stärker ist die Fluoreszenz.

Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurden 10⁶ Zellen wie angegeben behandelt, abtrypsiniert und in kaltem Medium resuspendiert. Danach wurde 10 min bei 1200 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und die Zellen wurden in 100 µl Durchflusszytometriepuffer, zu dem der spezifische CD95-Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/ml gegeben wurde, wieder aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei 4°C inkubiert, dann zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zweimal mit Durchflusszytometriepuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen durch Zugabe von 300 µl 1%iger Formaldehydlösung fixiert und bis zur Messung bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Messung erfolgte in einem FACSalibur-Gerät. Zur Analyse wurden jeweils 10000 Zellen ausgezählt. Quantitativ wurde die CD95-Expression durch Berechnung des spezifischen Fluoreszenzindex (SFI) verglichen: Der SFI ist der Quotient aus der mittleren Fluoreszenz der mit spezifischem Antikörper markierten Zellen und der Isotyp-Kontrolle. Je höher der SFI-Wert ist, desto

stärker ist die spezifische Anfärbung und desto höher ist die CD95-Expression der Zellen.

3.11 Annexin V-Assay

In vitalen Zellen findet sich unter physiologischen Bedingungen eine asymmetrische Verteilung verschiedener Phospholipide zwischen intra- und extrazellulär. Es zeigen sich Phosphatidylcholin und Sphingomyelin hauptsächlich extrazellulär, wohingegen Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin nach intrazellulär gerichtet sind. Die Zellen können das Phosphatidylserin auf bestimmte Stimuli nach extrazellulär translozieren. Diese veränderte Phospholipidanordnung scheint bei der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die Externalisierung von Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen wurde durch Färbung mit Annexin-V-FITC nach dem Protokoll des Herstellers visualisiert und anschließend im Durchflusszytometer unter Verwendung eines FSC/FL1-Profiles analysiert. Die Unterscheidung zur Nekrose erfolgt über Gegenfärbung mit Propidiumjodid. Danach Messung im Durchflusszytometer unter Verwendung eines FSC/FL1-Profiles. Propidiumjodid ist ein Stoff, der in DNA-Stränge interkaliert. Eine fehlende Färbung zeigt somit eine intakte Membranintegrität und schließt die Nekrose aus. Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden mit einem FACScalibur unter Verwendung der CellQuest-Analyse-Software durchgeführt.

Bei dieser Nachweismethode können vier verschiedene Färbekombinationen erwartet werden, die folgende Interpretationen zulassen:

Ist die Färbung Annexin- und Propidiumjodid-negativ, so handelt es sich um eine vitale Zelle, bei Annexin-negativer Färbung und Propidiumjodid-positiver Färbung ist die Zelle nekrotisch. Eine Annexin-positive Färbung und Propidiumjodid-negative Färbung zeigt eine apoptotische Zelle im Frühstadium und eine Annexin- und Propidiumjodid-positive Färbung zeigt eine apoptotische Zelle im späten Stadium oder eine nekrotische Zelle.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstum und Überleben von Gliomzellen in Vollmedium und unter Serumentzug

4.1.1 Wachstumskurven mit Vollmedium und unter Serumentzug

In den ersten Experimenten wurden die zwölf Gliomzelllinien hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens in Vollmedium und serumfreiem Medium mittels Kristallviolettassays charakterisiert. Hierfür wurden für jede Zelllinie je 500 und 5000 Zellen pro Well ausgesät. Die Behandlung mit serumfreiem Medium und Vollmedium wurde je nach Wachstum zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt (5000 Zellen jeden Tag und 500 Zellen jeden 2.-3. Tag). In allen Zelllinien zeigte sich bei Aussaat von 500 Zellen pro Well eine deutliche (LN-18, A172, U373MG, U251MG) bis vollständige Wachstumshemmung (LN-319, LN-428, U138MG, LNT-229, LN-308, T98G, D247, U87MG) durch Serumentzug. Bei Aussaat von 5000 Zellen pro Well zeigte sich im Vergleich Vollmedium zu Serumentzug bei LN-18 kein Effekt, bei LNT-229 eine geringe Wachstumshemmung und bei den meisten restlichen Zelllinien eine deutliche (LN-428, A172, LN-308, U373MG, U251MG, D247 und U87MG) und bei LN-319, T98G und U138MG eine fast vollständige Wachstumshemmung (Abb. 3,4; Tab. 2). Das Zellwachstum wurde also bei der höheren Dichte von 5000 Zellen pro Well durch Serumentzug weniger beeinträchtigt. Im Weiteren sollte die Hypothese geprüft werden, dass dies vor allem durch eine gesteigerte Konzentration von autokrin/ parakrin gebildeten Wachstumsfaktoren bedingt ist. Auch Zell-Zellkontakte können möglicherweise zu der gesteigerten Proliferation bei der höheren Zelldichte beitragen.

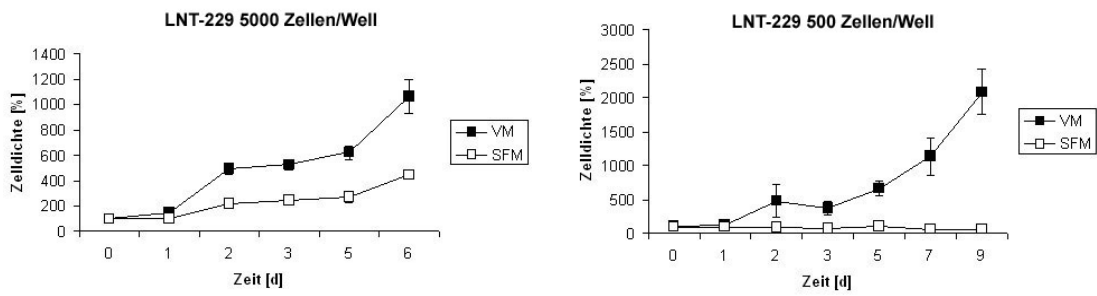


Abb. 3: Wachstum der Zelllinie LNT-229 in serumfreiem Medium (SFM) und Vollmedium (VM) bei Aussaat von 500 und 5000 Zellen pro Well für 1-9 Tage. Auswertung mit Kristallviolettassay (n= 3, SD).

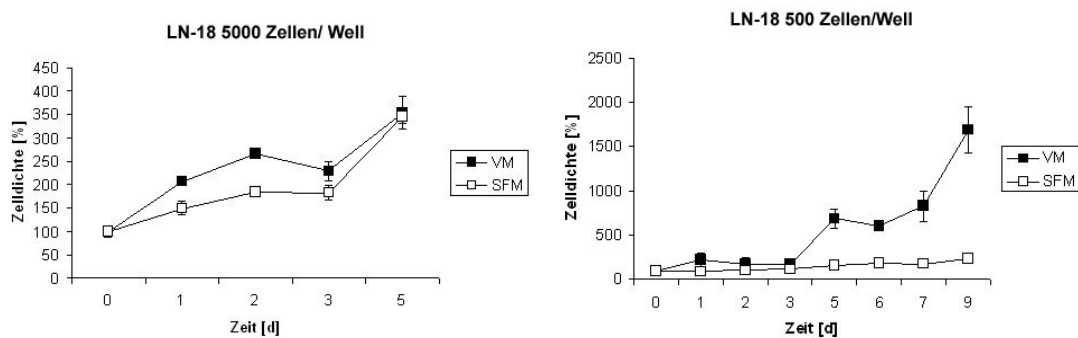


Abb. 4: Wachstum der Zelllinie LN-18 in serumfreiem Medium (SFM) und Vollmedium (VM) bei Aussaat von 500 und 5000 Zellen pro Well. Behandlung der Zellen mit Vollmedium und serumfreiem Medium für 1-9 Tage. Auswertung mit Kristallviolettassay. (n= 3, SD)

	500 Zellen		5000 Zellen	
	SFM	VM	SFM	VM
LN-319	0	+++	(+)	+++
LN-428	0	+++	++	+++
U138	0	+++	(+)	+++
LN-18	++	+++	+++	+++
A172	+	+++	+	+++
LN-229	0	+++	+	+++
LN-308	0	+++	+	+++
U373	+	+++	+	+++
U251	+	+++	+	+++
T98G	0	+++	(+)	+++
D247	0	+++	+	+++
U87	0	+++	(+)	+++

Tab. 2: Übersicht über das Wachstum der 12 Zelllinien bei Serumentzug. O, kein Wachstum; (+), Wachstum < 25%; +, Wachstum > 25% und < 50%; ++, Wachstum > 50% und < 75%; +++, Wachstum > 75% (jeweils auf Vollmedium bezogen).

4.1.2 Überleben von Gliomzellen in Vollmedium und unter Serumentzug

Schon nach lichtmikroskopischen Kriterien konnte man erkennen, dass bei den Zelllinien U87MG, LN-18, T98G und D247 Zellen durch Serumentzug sterben. Deshalb wurde mit allen zwölf Zelllinien ein LDH-Assay durchgeführt. Es wurden 5000 Zellen ausgesät und mit Vollmedium oder serumfreiem Medium behandelt. Nach 24 und 72 Stunden wurde die LDH-Freisetzung gemessen. Nach 24 Stunden zeigten die mit serumfreiem Medium behandelten Zellen noch keine gesteigerte LDH-Freisetzung im Vergleich mit Vollmedium. Nach 72 Stunden jedoch konnte man bei den Zelllinien T98G, U87, LN-18, D247 und U138 eine deutlich erhöhte LDH-Freisetzung messen. Serumentzug bewirkt also bei diesen Zelllinien nicht nur eine Hemmung des Wachstums, sondern auch ein Absterben der Zellen (Abb. 5). Bei den anderen Zellen kam es nicht zu LDH-Freisetzung durch Serumentzug.

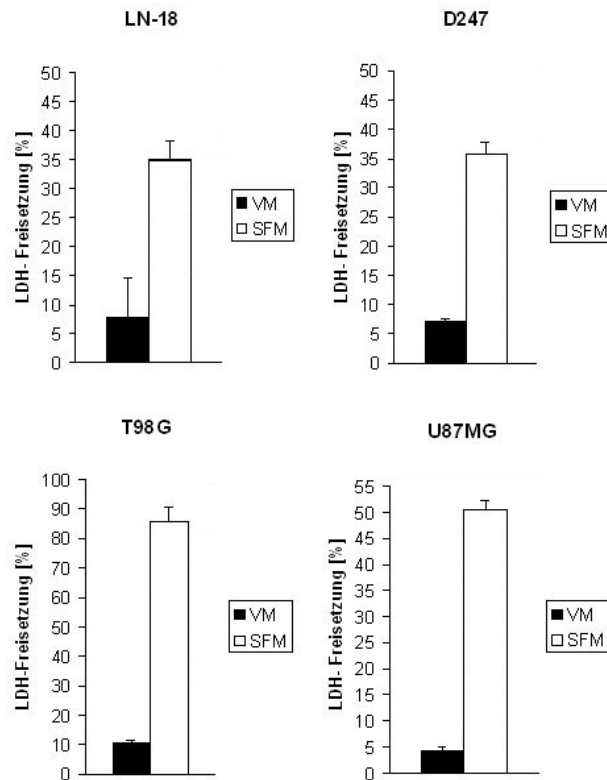


Abb. 5: Behandlung der Zelllinien LN-18, D247, T98G und U87MG mit Vollmedium (VM) und serumfreiem Medium (SFM). Auswertung der LDH-Freisetzung nach 72 Stunden (n= 3, SD).

4.2 Stimulation mit Wachstumsfaktoren

Um die Hypothese zu testen, dass Mangel an Wachstumsfaktoren für den wachstumshemmenden Effekt des Serumentzugs verantwortlich ist, wurde durch Stimulation mit den Wachstumsfaktoren EGF, IGF-I, FGF-I und PDGF versucht, den Effekt des Serumentzugs aufzuheben. Dazu wurden die Wachstumsfaktoren einzeln oder kombiniert zum serumfreien Medium dazugegeben.

4.2.1 Behandlung mit einzelnen Wachstumsfaktoren

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten zu je 500 (LNT-229, A172 und LN-18) und 5000 (LNT-229, A172, LN-18 und U87MG) Zellen pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie mit den Wachstumsfaktoren EGF, IGF-I, FGF-I oder

PDGF in serumfreiem Medium stimuliert. Eine zeitliche Kinetik des Zellwachstums wurde mittels Kristallviolettassays erstellt. Die Wachstumsfaktoren wurden in aufsteigenden Konzentrationen eingesetzt: (EGF: 0,8, 4, 20, 100 μ M; IGF-I, FGF-I und PDGF: 0,4, 2, 10, 50 μ M). Wurden 5000 Zellen pro Well ausgesät, konnte man eine deutliche Wirkung hinsichtlich des Wachstums für die Zelllinie LNT-229 bei den Wachstumsfaktoren FGF-I, PDGF und besonders IGF-I feststellen. Für die Zelllinie LN-18 beobachtete man ein stärkeres Wachstum durch Stimulation mit EGF, FGF-I und PDGF, für U87MG bei Stimulation mit EGF. Bei der Zelllinie U87MG fiel auf, dass bei Stimulation mit FGF-I die Zelldichte im Vergleich mit den unbehandelten Zellen abnahm (Abb. 7). Bei der Zelllinie A172 wurde durch FGF-I ein vermehrtes Wachstum erzielt; die anderen Wachstumsfaktoren zeigten keinen Effekt im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Ergebnisse bei Aussaat von 500 Zellen pro Well entsprachen denen bei Aussaat von 5000 Zellen (Tab. 3,4; Abb.6)

	EGF	IGF-I	FGF-I	PDGF
LNT-229	0	++	+	+
LN-18	+	-	++	+
U87MG	+	0	--	0
A172	0	0	+	0

Tab. 3: Effekt der Wachstumsfaktoren bei Aussaat von 5000 Zellen pro Well

	EGF	IGF-I	FGF-I	PDGF
LNT-229	0	++	0	+
LN-18	+	0	+	+
A172	0	0	+	+

Tab. 4: Effekt der Wachstumsfaktoren bei Aussaat von 500 Zellen pro Well

0, Wachstum wie bei Serumentzug; +, Wachstum höher als bei Serumentzug, aber geringer als bei Vollmedium; ++, Wachstum wie bei Vollmedium; -, Wachstum geringer als bei Serumentzug, aber Zunahme der Zelldichte; --, Abnahme der Zelldichte

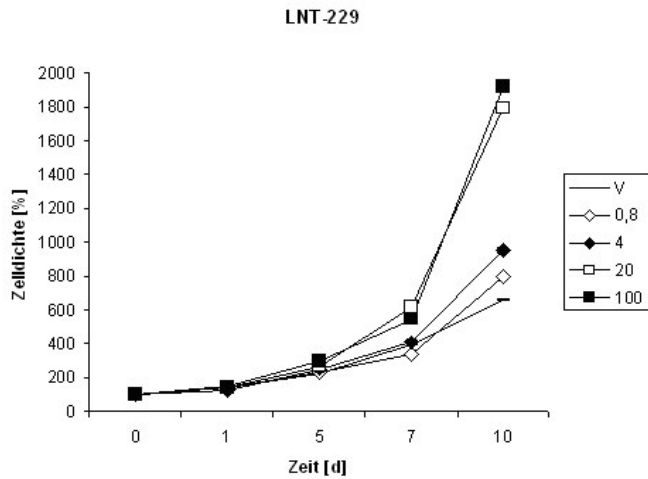


Abb. 6: Stimulation der Zelllinie LNT-229 mit IGF-I in aufsteigender Konzentration (0,8, 4, 20, 100 μM) bei Aussaat von 500 Zellen pro Well in serumfreiem Medium. Auswertung durch Kristallviolettassay ($n=3$, die Fehlerbalken sind wegen der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt).

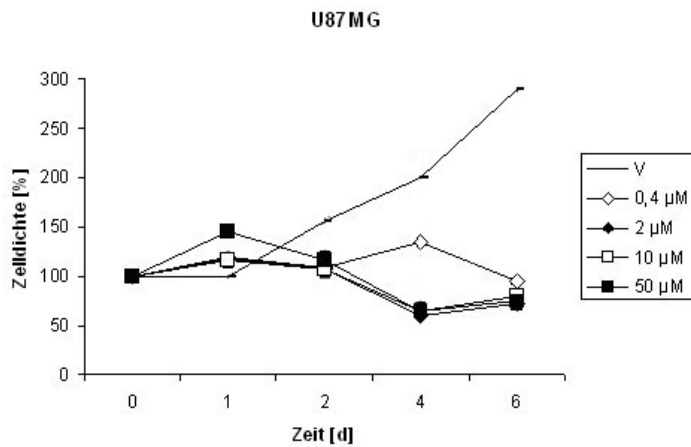


Abb. 7: Behandlung der Zelllinie U87MG mit FGF-I in aufsteigender Konzentration (0,4, 2, 10, 50 μM) bei Aussaat von 5000 Zellen pro Well in serumfreiem Medium. Auswertung durch Kristallviolettassay ($n=3$, die Fehlerbalken sind wegen der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt).

3.2.2 Stimulation durch kombinierte Behandlung mit Wachstumsfaktoren

Ausgesät wurden wieder je 500 und 5000 Zellen der Zelllinien LNT-229, U87MG, A172 und LN-18 in 96-Well-Platten. Stimuliert wurde mit EGF (100 μM), IGF-I (50 μM), FGF-I (50 μM), PDGF (50 μM), EGF+IGF-I, EGF+FGF-I, EGF+PDGF und einer Kombination aller Wachstumsfaktoren. Für LNT-229, A172 und LN-18 wurden Kristallviolettassays durchgeführt und für U87MG Kristallviolettassays und LDH-Assays. Bei der Zelllinie LNT-229 zeigte sich für die Behandlung mit IGF-I, EGF/IGF-I und mit der Kombination aller Wachstumsfaktoren ein stärkeres Wachstum als für die unbehandelten Zellen. Die weiteren Wachstumsfaktoren und Bedingungen zeigten keinen Effekt im Vergleich mit den unbehandelten Zellen. Die Zelllinie LNT-229 spricht also im wesentlichen auf IGF-I an, synergistische Effekte zeigten sich nicht (Abb. 8A). Synergistisches Wachstum konnte man bei den Zelllinien LN-18 und A172 mit der Kombination EGF+FGF-I erkennen. Bei der Zelllinie U87MG waren keine synergistischen Effekte erkennbar (Abb. 8B). Auffallend war auch bei diesem Experiment, dass bei allen Bedingungen, die FGF-I enthielten (FGF-I, EGF+FGF-I und Kombination aller Wachstumsfaktoren), die Zelldichte abnahm. Nach lichtmikroskopischen Kriterien konnte man erkennen, dass die mit FGF-I behandelten Zellen starben. Für die Zelllinie U87MG wurde deshalb noch ein LDH-Assay durchgeführt. Dabei wurde ein vermehrter Zelltod bei allen Bedingungen, die FGF-I enthielten, bestätigt (Abb. 9).

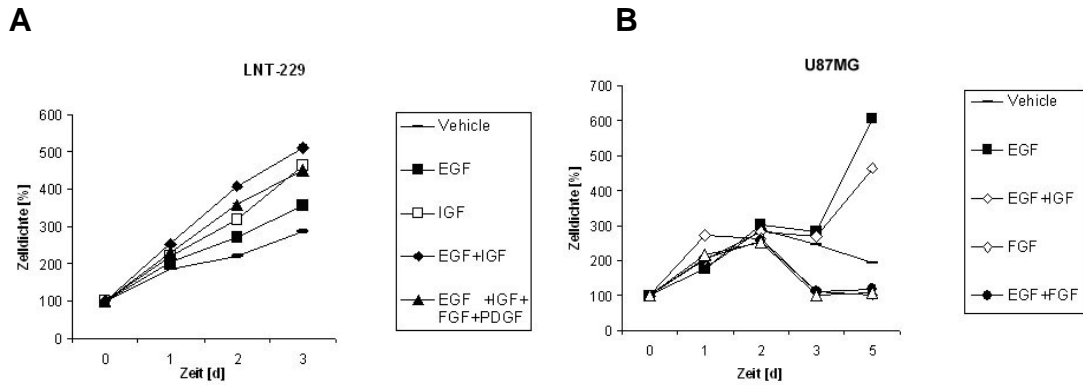


Abb.8: **A** Behandlung der Zelllinie LNT-229 mit EGF (100 μ M), IGF (50 μ M), FGF-I (50 μ M) und PDGF (50 μ M) alleine und in Kombination bei Aussaat von 5000 Zellen pro Well. Auswertung nach 1- 3 Tagen durch Kristallviolettassay. **B** Behandlung der Zelllinie U87MG mit EGF (100 μ M), IGF-I (50 μ M), FGF-I (50 μ M) und PDGF (50 μ M) alleine und in Kombination bei Aussaat von 5000 Zellen pro Well. Auswertung nach 1- 3 Tagen durch Kristallviolettassay (n= 3, die Fehlerbalken sind wegen der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt).

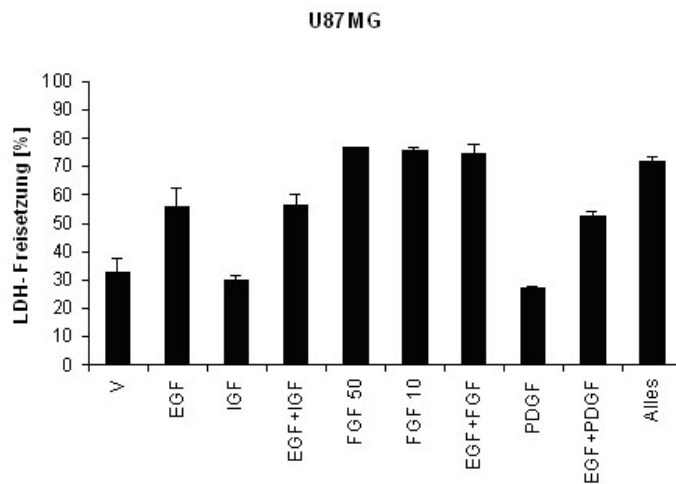


Abb. 9: Behandlung der Zelllinie U87MG mit EGF (100 μ M), IGF-I (50 μ M), FGF-I (50 μ M) und PDGF (50 μ M) alleine und in Kombination bei Aussaat von 5000 Zellen pro Well. Auswertung nach 96 Stunden durch LDH-Freisetzung (n=3, SD).

4.3 Effekt der Inhibition des EGFR auf das Zellwachstum in serumfreiem Medium und Vollmedium

In weiteren Experimenten wurde der Effekt von AG1478 und PD153035, die spezifischen Inhibitoren des EGFR, hinsichtlich des Wachstums in serumfreiem Medium und Vollmedium untersucht. Für die Untersuchung von AG1478 wurden von allen zwölf Zelllinien und für PD153035 von 5 Zelllinien (LNT-229, LN-18, A172, T98G und U87) je 500 und 5000 Zellen pro Well ausgesät. Durch AG1478 wurde ein Großteil des Wachstums der Zelllinien bei Aussaat von 500 Zellen pro Well unter Vollmedium vollständig gehemmt. Bei U373 und U247 fand eine teilweise Hemmung statt, A172 wuchs ungehemmt. Unter serumfreien Bedingungen mit 500 Zellen pro Well konnte man das Wachstumsverhalten der meisten Zelllinien unter Inhibition durch AG 1478 nicht beurteilen, da das Wachstum der mit serumfreiem Medium behandelten Zellen schon vollständig gehemmt war. Wurden 5000 Zellen pro Well ausgesät, konnte man in Vollmedium keinen Effekt von AG1478 bei den Zelllinien LN-319, U138MG, LN-18 und U251MG erkennen. Das Wachstum wurde teilweise gehemmt bei LN-428, A172, LNT-229, LN-308, U373MG, T98G, D247 und U87MG. Folgende Effekte konnte man unter serumfreien Bedingungen beobachten: keinen Effekt bei LN-428 und U138MG, teilweise Wachstumshemmung bei LN-319, LN-18, A172, LN-308, U373MG, U251MG, T98G, D247 und U87MG. Eine sehr gute Wachstumshemmung konnte man bei der Zelllinie LNT-229 beobachten. Die Ergebnisse durch PD153035 stimmten weitgehend mit den Ergebnissen mit AG1478 überein (Abb. 10, Tab. 5,6).

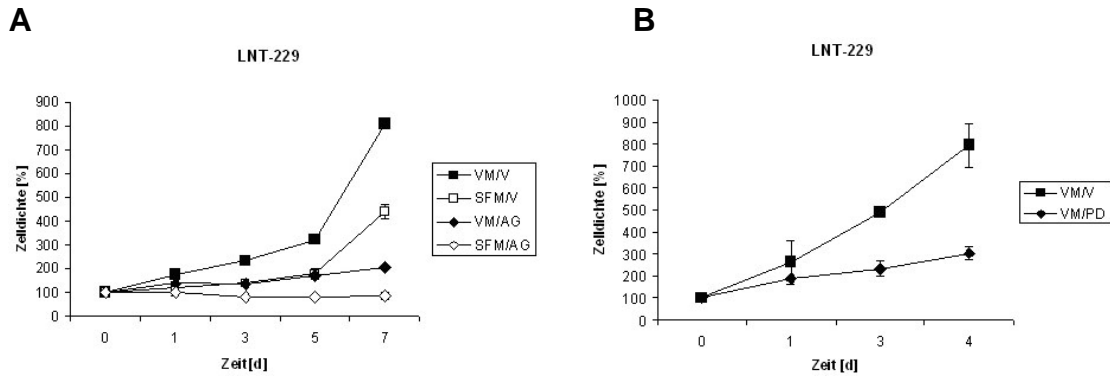


Abb. 10: **A** Effekt von AG1478 in Vollmedium (VM) und serumfreiem Medium (SFM) für die Zelllinie LNT-229 bei Aussaat von 5000 Zellen pro Well. **B** Effekt von PD153035 in Vollmedium für die Zelllinie LNT-229 bei Aussaat von 5000 Zellen pro Well. Auswertung mit Kristallviolettassay (n= 3, SD).

	500 Zellen		5000 Zellen	
	VM		VM	SFM
LN-319	0		+++	++
LN-428	0		+	+++
U138	0		+++	+++
LN-18	0		+++	+
A172	+++		+++	++
LNT-229	0		+	+
LN-308	0		++	++
U373	+		+	++
U251	+		+++	+
T98G	0		+	+
D247	0		+	+
U87MG	0		++	+

Tab. 5: Effekt von AG1478 auf das Wachstum in serumfreiem Medium (SFM) und Vollmedium (VM). Das Wachstum in Anwesenheit von AG 1478 ist dargestellt. O, kein Wachstum; +, Wachstum > 25% und < 50%; ++, Wachstum > 50% und < 75%; +++, Wachstum > 75% (jeweils auf Vollmedium bezogen).

	500 Zellen		5000 Zellen	
	VM		VM	SFM
LN-18	+		+	+
A172	+++		+++	+
LNT-229	0		+	+
T98G	+		+	+
U87MG	0		+	0

Tab. 6: Effekt von PD153035 auf das Wachstum in SFM und VM. Das Wachstum in Anwesenheit von AG1478 ist dargestellt. 0, kein Wachstum; +, Wachstum > 25% und < 50%; ++, Wachstum > 50% und < 75%; +++, Wachstum > 75% (jeweils auf Vollmedium bezogen).

4.4 Effekte der Inhibition des IGF-IR auf das Zellwachstum in serumfreiem Medium und Vollmedium

Der Effekt des spezifischen IGF-IR-Inhibitors AG1024 wurde bei 5 Zelllinien (LN-18, A172, LNT-229, T98G und U87MG) mit je 500 und 5000 Zellen pro Well in serumfreiem Medium und Vollmedium untersucht. Die Zelllinien LN-18, A172, T98G und U87MG zeigten bei Vollmedium und bei Aussaat von 500 und 5000 Zellen einen deutlichen Effekt hinsichtlich der Wachstumshemmung durch IGF-IR-Inhibition und einen noch deutlicheren Effekt bei Behandlung in serumfreiem Medium (Tab. 7). Keinen Effekt in Vollmedium bei 500 und 5000 Zellen pro Well zeigte die Zelllinie LNT-229, in serumfreiem Medium wurde das Wachstum allerdings gehemmt (Abb. 11A,B). Den Effekt von AG1024 auf die Zelllinien LN-18, T98G und U87MG konnte man bei Aussaat von 500 Zellen pro Well in serumfreiem Medium nicht sicher beurteilen, da auch die unbehandelten Zellen kaum gewachsen waren.

	500 Zellen		5000 Zellen	
	VM		VM	SFM
LN-18	+		+	0
A172	++		+	(+)
LNT-229	+++		+++	+
T98G	+		+	+
U87MG	+		+	+

Tab. 7: Effekt von AG1024 auf das Wachstum in SFM und VM. Das Wachstum in Anwesenheit von AG1024 ist dargestellt. O, kein Wachstum; (+), Wachstum < 25%; +, Wachstum > 25% und < 50%; ++, Wachstum > 50% und < 75%; +++, Wachstum > 75% (jeweils auf Vollmedium bezogen).

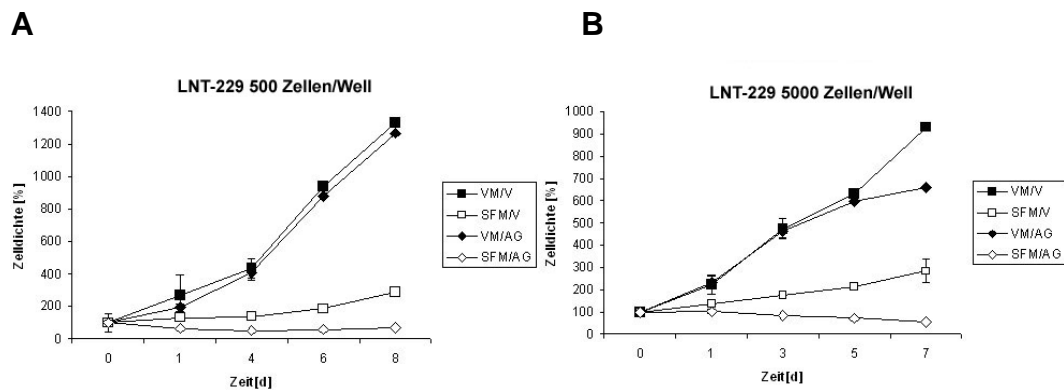


Abb. 11: Effekt von AG1024 für 500 (A) und 5000 (B) Zellen pro Well in serumfreiem Medium und Vollmedium. Behandlung der Zelllinie LNT-229 bei Aussaat von 500 (A) und 5000 (B) Zellen pro Well mit AG1024 (20µM) in serumfreiem Medium (SFM) und Vollmedium (VM) für 1, 3, 5 und 7 Tage. Auswertung des Wachstums mit Kristallviolettassay (n= 3, SD).

4.5 Effekte einer kombinierte Blockade von EGFR und IGF-IR

Ziel der kombinierten Blockade von EGFR und IGF-IR durch AG1478 oder PD153053 und AG1024 war, die Wachstumshemmung der Einzelsubstanzen zu verstärken und Zelltod zu induzieren. Zunächst wurden hierfür Wachstumskurven mittels Kristallviolettassay erstellt, danach wurde mit dem LDH-Assay Zelltod quantitativ untersucht.

4.5.1 Wachstumshemmung durch kombinierte Blockade von EGFR und IGF-IR

Für die Zelllinien LNT-229, T89G, U87MG, A172, D247 und U251MG wurden Wachstumskurven mit Kristallviolettassays erstellt. Für AG1478 wurde eine Konzentration von 10 μM und für AG1024 eine Konzentration von 20 μM eingesetzt. Bei den Zelllinien T98G, U87MG und A172 konnte eine synergistische Wachstumshemmung festgestellt werden (Abb. 12). Bei den Zelllinien LNT-229, D247 und U251MG konnte man keinen Effekt der Kombination erkennen, weil bereits einer der Inhibitoren alleine eine vollständige Wachstumshemmung induzierte.

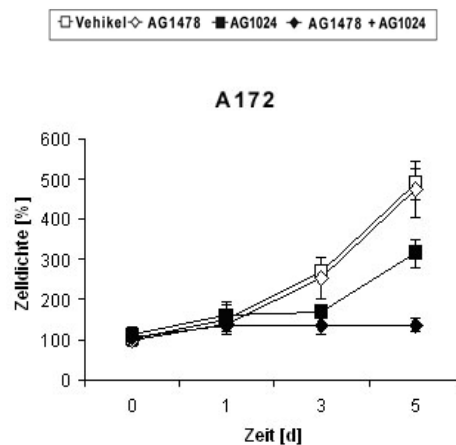


Abb. 12: Behandlung der Zelllinie A172 in Vollmedium mit Vehikel, AG1478 (20 μM) und AG1024 (10 μM) alleine und in Kombination für 1, 3 und 5 Tage. Auswertung mit Kristallviolettassay (n= 3, SD).

4.5.2 Induktion von Zelltod durch kombinierte Blockade des EGFR und IGF-IR
 Für den LDH-Assay wurden 5000 Zellen pro Well ausgesät und nach 24 Stunden mit Vehikel, AG1478, AG1024 sowie AG1478+AG1024 in serumfreiem Medium inkubiert. Abgestoppt und gemessen wurde der LDH-Assay nach 24 Stunden. Im LDH-Assay konnte man bei vier Zelllinien (LN-18, D247, T98G und LNT-229) eine erhöhte LDH-Freisetzung bei der Kombination von AG1478 und AG1024 beobachten. Bei den Zelllinien A172 und U87MG führte die Kombination beider Inhibitoren nicht zu einer vermehrten LDH-Freisetzung (Abb. 13).

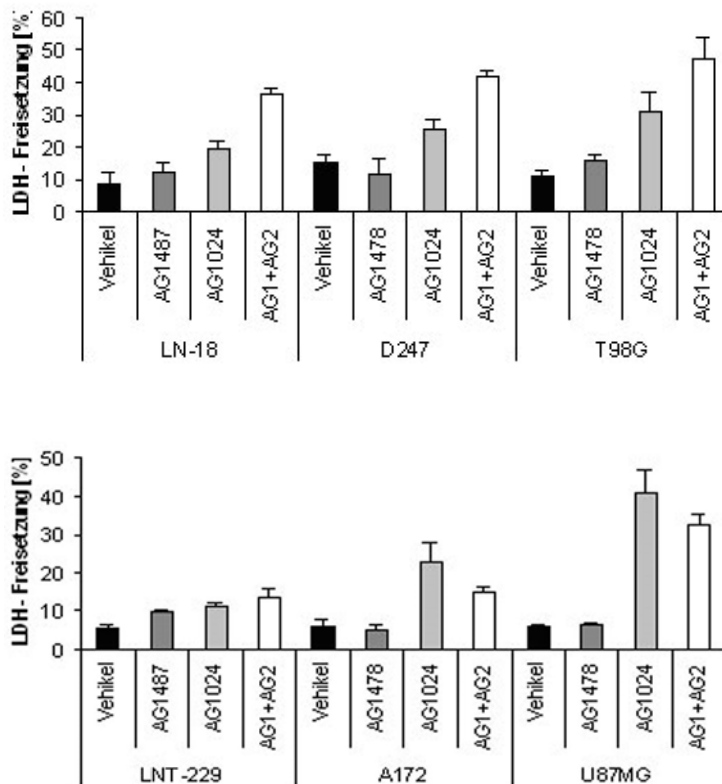


Abb. 13: Behandlung der Zelllinien LN-18, D247, T98G, LNT-229, A172 und U87MG mit Vehikel, AG1478 (20 μ M) und AG1024 (10 μ M) oder der Kombination aus AG1478 und AG1024 (AG 1+ AG 2) für 24 Stunden. Auswertung durch LDH-Assay (n=3, SD).

4.6 Synergistische Sensitivierung gegenüber CD95L-induzierter Apoptose durch Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR

Mit diesen Experimenten wurde untersucht, ob sich durch Zugabe des IGF-IR-Inhibitors der sensitivierende Effekt der EGFR-Inhibition hinsichtlich der CD95L-induzierten Apoptose steigern lässt.

Die Zelllinien LNT-229, U87MG, T98G, LN-18 und A172 wurden mit aufsteigenden Konzentrationen CD95L (0, 0,8 4, 20, 100 U/ml), 10 μ M PD153035 und Vehikel oder 10 μ M, 3,3 μ M, 1 μ M und 0,3 μ M (nur LNT-229) AG1024 behandelt. Es wurden jeweils 15000 Zellen pro Well ausgesät und am nächsten Tag mit CD95L und den Inhibitoren in serumfreiem Medium für 24 h stimuliert. Nach 24 Stunden wurde die Zelldichte mittels Kristallviolettassay gemessen. AG1024 alleine sensitivierte alle Zelllinien außer LN-18 gegenüber CD95L. Eine synergistische Sensitivierung der Kombination aus AG1024 und PD153035 gegenüber CD95L wurde bei LNT-229 und U87MG-Zellen beobachtet (Abb. 14 B), nicht jedoch bei T98G, LN-18 und A172-Zellen (Abb. 15). Hervorzuheben ist, dass bei LNT-229-Zellen bei einer Konzentration von 1 μ M, welche alleine keinen Effekt auf die CD95L-induzierte Apoptose hat, AG1024 die PD153035-induzierte Sensitivierung gegenüber CD95L noch deutlich verstärkt (Abb. 14A).

Auf der Grundlage dieser Untersuchungen kann man schließen, dass die Zelllinie LNT-229 den IGF-IR Signalweg verwendet, um die Inhibition des EGFR-Signalweges zu kompensieren und dass bei einer Blockade dieses alternativen Pfadweges die proapoptotischen Effekte des EGFR-Antagonismus gesteigert werden können.

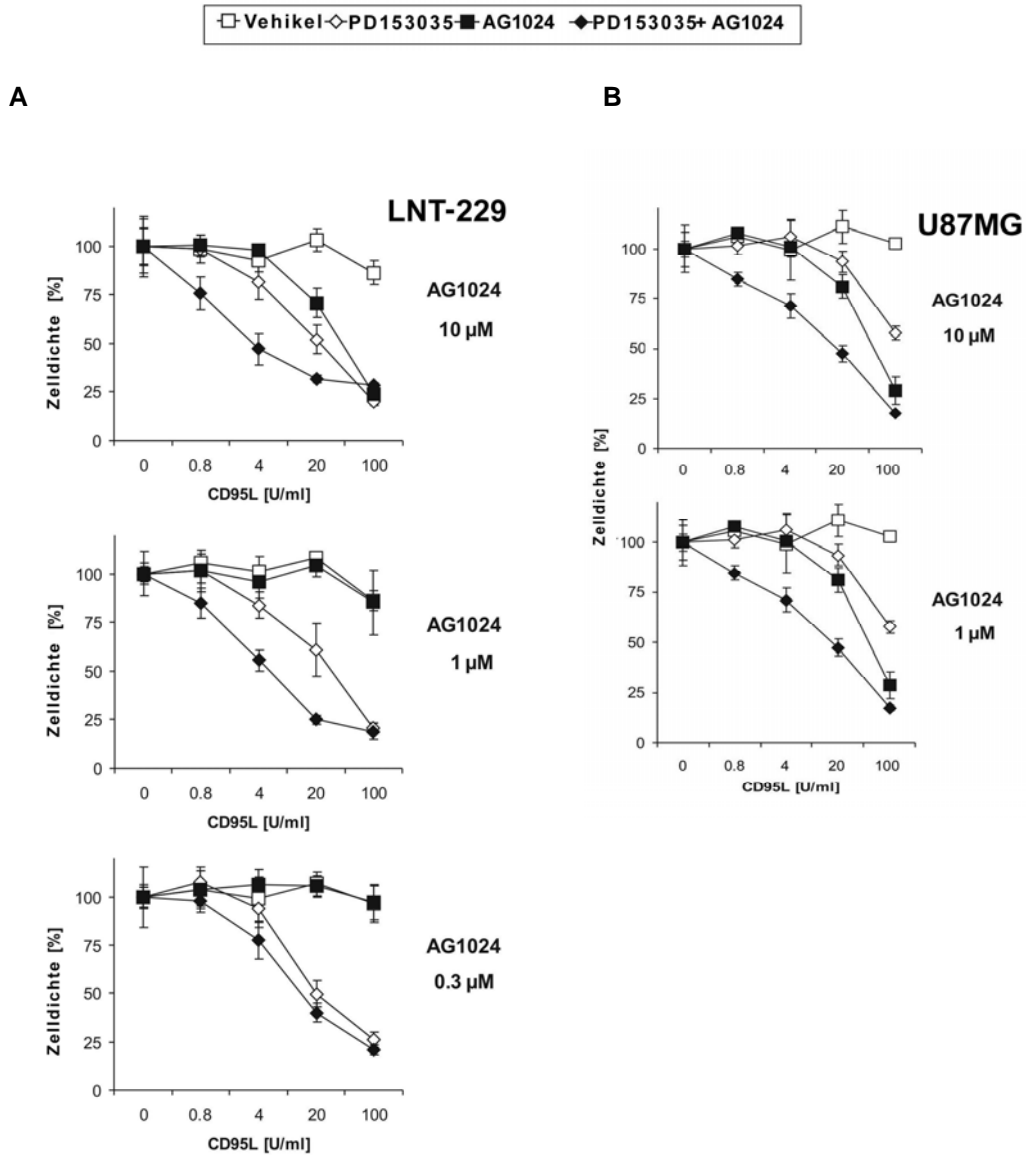


Abb. 14: Inhibition des IGF-IR steigert die proapoptotischen Effekte der EGFR- Inhibition. **A** LNT-229-Zellen wurden mit Vehikel, PD153035 (10 µM), AG1024 (10 µM, 1 µM und 0,3 µM) oder PD153035 und AG1024 inkubiert und für 24 Stunden mit CD95L behandelt. **B** U87MG-Zellen wurden mit Vehikel, PD153035 (10 µM), AG1024 (10 µM und 1 µM) oder PD153035 und AG1024 inkubiert und für 24 Stunden mit CD95L behandelt. Überleben der Zellen wurde mittels Kristallviolettassay ausgewertet (n=3, SD).

□ Vehikel ◇ PD153035 ■ AG1024 ◆ PD153035+ AG1024

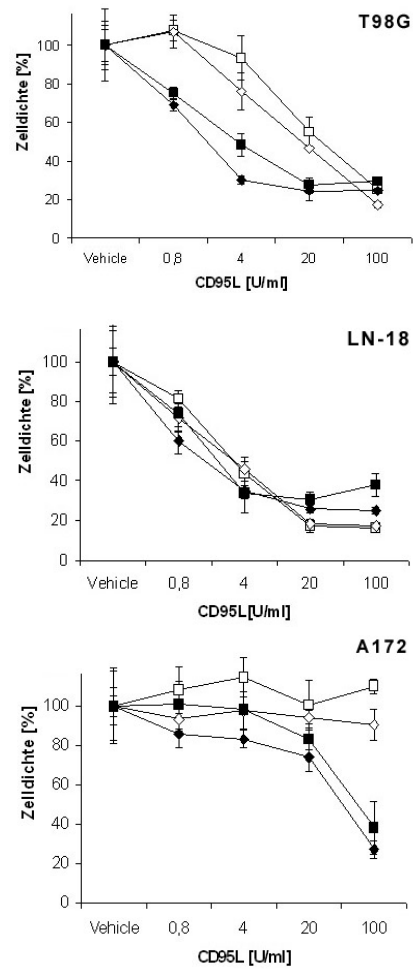


Abb. 15: Effekte der Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR auf die CD95L-induzierte Apoptose bei den Zelllinien T98G, LN-18, und A172. Die Zellen wurden mit Vehikel, PD153035 (10 μ M), AG1024 (10 μ M) oder PD153035 und AG1024 inkubiert und für 24 Stunden mit CD95L behandelt. Auswertung mit Kristallviolettassay (n=3, SD).

4.7 Effekte der Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR auf die Zelltodprogramme

In weiteren Untersuchungen wurde der Zelltod bei EGFR- bzw. IGF-IR-Inhibition und CD95L-Behandlung näher charakterisiert. Dafür wurden die Zellen zunächst mittels Annexin V-Assay auf apoptotischen Zelltod untersucht, anschließend wurde überprüft, ob die Effekte der kombinierten Behandlung mit EGFR- und IGF-IR-Inhibitoren auf CD95L-induzierten Zelltod Caspasen- oder p53-abhängig sind.

4.7.1 Untersuchung auf apoptotischen Zelltod

Mittels Annexin V-FACS wurde untersucht, ob LNT-229-Zellen bei Behandlung mit den Inhibitoren und CD95L apoptotisch sterben. Durchgeführt wurde die Messung nach 24 Stunden Stimulation. Annexin V-positive und Propidiumjodid-negative Zellen wurden als spezifisch apoptotisch angesehen. Co-Inhibition mit AG1478 und AG1024 führte zu einer synergistischen Zunahme der CD95L-induzierten Apoptose (26%) gegenüber den Einzelsubstanzen (8% für AG1478, 10% für AG1024) (Abb. 16).

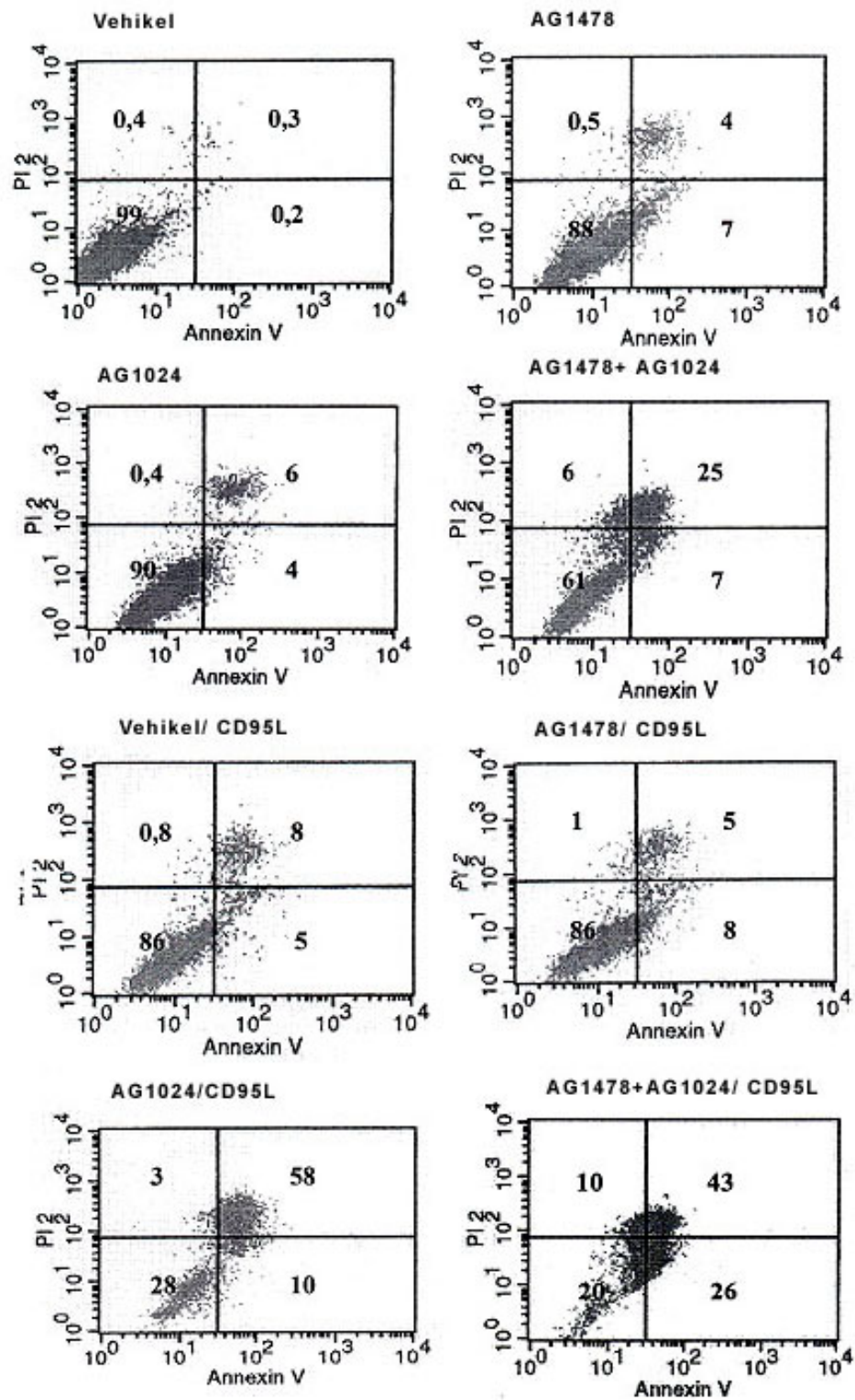


Abb. 16: Annexin V-FACS mit der Zelllinie LNT-229. Die Zellen wurden mit Vehikel, AG1478 (10 µM) und/oder AG1024 (10 µM) inkubiert und 24 Stunden mit CD95L (100 U/ml) oder Vehikel behandelt.

4.7.2 Untersuchung auf Abhängigkeit von Caspasen

Um die Effekte der IGF-IR- und EGFR-Inhibition auf die Todeskaskade zu analysieren, wurden LNT-229-Zellen mit den Inhibitoren alleine oder in Kombination und mit CD95L behandelt. Die Spaltung von Caspase 8 und des Caspase-Zielproteins *poly (ADP ribose) polymerase* (PARP) wurde durch die Co-Inhibition deutlich gesteigert (Abb. 17). Ebenso gesteigert wurde die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 (Daten nicht gezeigt). Transfektion von LNT-229-Zellen mit dem viralen Caspase 8-Inhibitor crm-A verhinderte die durch CD95L- induzierte Apoptose auch in Anwesenheit von AG1024 und PD153035 (Abb. 18). Dies zeigt, dass diese Substanzen den Zelltod nicht über einen zweiten, Caspase 8-unabhängigen Signalweg steigern.

Weiter wurde gezeigt, dass durch AG1024 alleine oder in Kombination die Zelloberflächenexpression von CD95 nicht verändert wird (Abb. 19). Diese Daten zeigen, dass die Co-Inhibition mit AG1024 und PD153035 das Zelltodprogramm von CD95 Caspase-abhängig auf dem Niveau der Caspase 8 aktivieren.

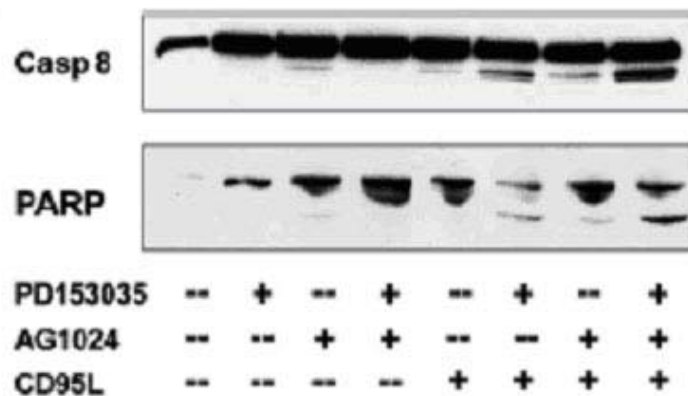


Abb. 17: Effekt der Co-Inhibition mit AG1024 und PD153035 auf die Aktivierung von Caspase 8 und die Prozessierung PARP. LNT-229-Zellen wurden mit Vehikel, PD153035 (10 μ M), AG1024 (1 μ M) einzeln und in Kombination inkubiert und für 6 Stunden mit CD95L (100 U/ml) oder Vehikel behandelt. Die Spaltung von Caspase 8 und PARP wurde im Immunoblot detektiert.

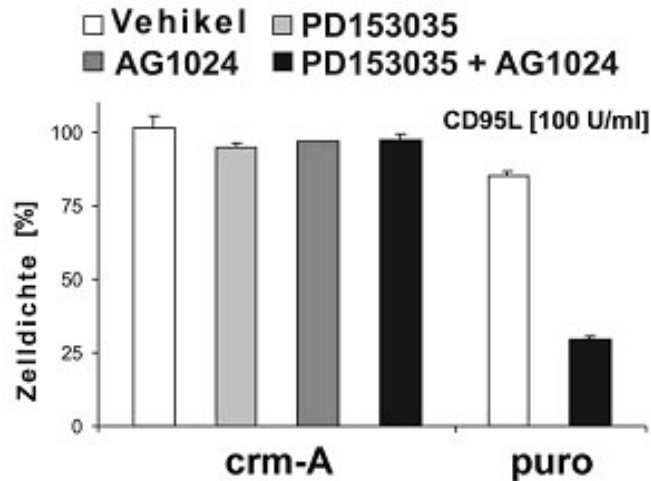


Abb. 18: Abhängigkeit des Effekts der Co-Inhibition mit AG1024 und PD153035 von Caspase 8. LNT-229-crm-A oder puro-Transfektanten wurden mit Vehikel, PD153035 (10 μ M), AG1024 (1 μ M) einzeln und in Kombination inkubiert und mit CD95L (100 U/ml) oder Vehikel für 24 Stunden behandelt. Auswertung mit Kristallviolettassay (n = 3; SD).

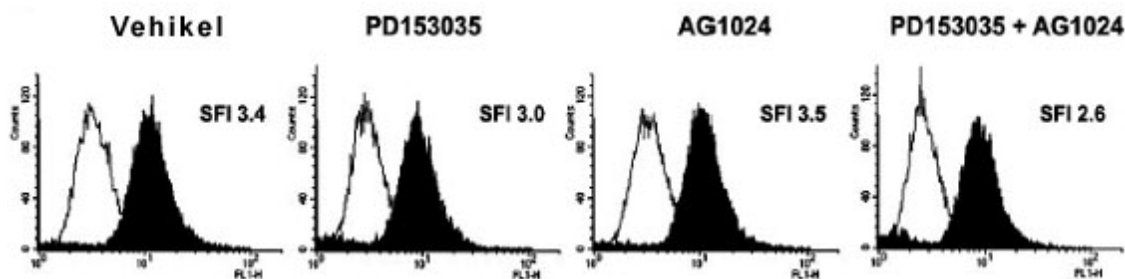


Abb. 19: Einfluss von PD153035 und AG1024 auf die CD95-Expression. LNT-229-Zellen wurden mit Vehikel, PD153035 (10 μ M), AG1024 (1 μ M) und mit beiden Inhibitoren in Kombination für 24 h behandelt, geerntet und mit FITC-gekoppeltem CD95-Antikörper oder einer Isotyp-Kontrolle gefärbt. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. SFI, spezifischer Fluoreszenz-Index.

4.7.3 Die Rolle von p53 für die synergistische Sensitivierung gegenüber CD95L durch Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR

Synergistische Sensitivierung gegenüber CD95L-induzierten Zelltod wurde bei U87MG- und LNT-229-Zellen (p53-Wildtyp), aber nicht bei T98G und LN-18-Zellen (p53-mutant) festgestellt. Es schien also möglich, dass die Sensitivierung durch die Kombinationsbehandlung von dem p53-Status der Zellen abhängt. Eine Besonderheit der Gliombiologie ist auch, dass Tumoren mit EGFR-Amplifikation meist p53-Wildtyp-Status behalten und umgekehrt Tumoren mit mutantem p53 keine EGFR-Amplifikation erwerben. Um die Rolle von p53 für den Effekt der Co-Inhibition zu untersuchen, wurden LNT-229-Zellen mit einem p53^{V135A}-Plasmid (p53t) transfiziert, das für ein temperatursensitives p53-Protein kodiert. Bei einer Temperatur von 32,5 °C besitzen die Transfektanten p53-Wildtyp Eigenschaften, bei einer Temperatur von 38,5 °C dominant-negative Eigenschaften. Verglichen wurden die Ergebnisse mit LNT-229-Zellen, die mit einem leeren Hygro-Kontrollvektor transfiziert wurden. Die Zellen wurden nun bei 38,5 °C oder 32,5 °C mit den Inhibitoren und CD95L behandelt. Bei 32,5 °C war die Sensitivität von LNT-229-Zellen gegenüber CD95L unter allen Bedingungen verringert. Bei den Untersuchungen unter 38,5 °C zeigten die LNT-229 p53^{V135A}-Zellen keinen Unterschied hinsichtlich der Sensitivität gegenüber CD95L bei Ab- oder Anwesenheit von PD153035 und/ oder AG1024 im Vergleich zu den Hygro-Kontrollzellen (Abb. 20).

Also scheint die Steigerung des CD95L-induzierten Zelltodes durch Inhibition des EGFR und/ oder IGF-IR von p53 unabhängig zu sein.

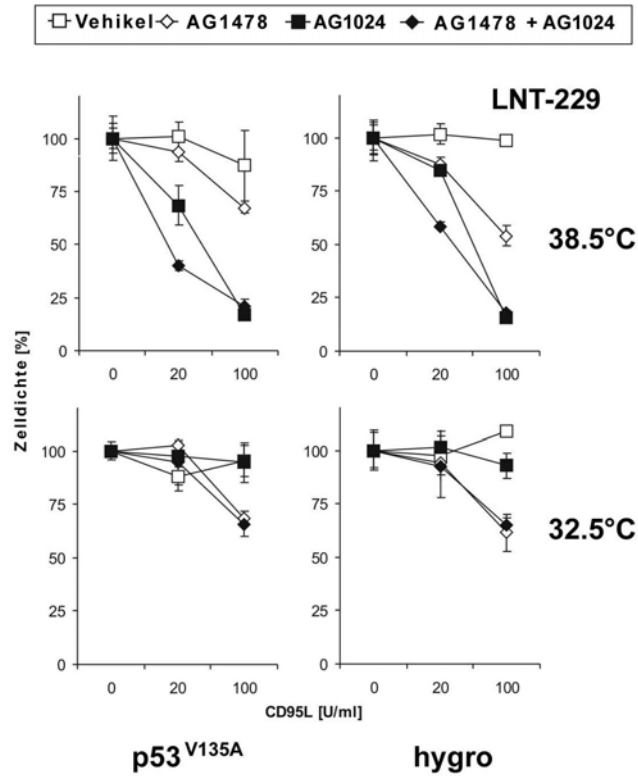


Abb. 20: Die Steigerung des CD95L-induzierten Zelltodes durch Inhibition des EGFR und/oder IGF-IR ist p53-unabhängig. LNT-229-Zellen wurden mit der temperatursensitiven dominant-negativen Mutante p53^{V135A} oder mit dem hygro-Kontrollvektor transfiziert, bei 38,5 C° (restriktive Temperatur) oder bei 32,5 C° (permissive Temperatur) inkubiert und mit Vehikel, PD153035 (10 µM) und AG1024 (1 µM) einzeln oder in Kombination inkubiert und 24 Stunden mit CD95L behandelt. Auswertung mit Kristallviolettassay (n =3, SD).

4.8 Effekte der IGF-IR- und EGFR-Inhibition auf nachgeschaltete Signalkaskaden

Um herauszufinden, welche Signalwege für die proapoptotischen Eigenschaften verantwortlich sind, wurde die Aktivität nachgeschalteter Kaskaden der Signaltransduktion (p42/44 MAPK, p90^{RSK}, PKB/AKT und RPS6) durch phosphospezifische Westernblots charakterisiert.

Bei Stimulation mit IGF-I oder EGF erkannte man eine gesteigerte Phosphorylierung von PKB/Akt. Bei Kombination der Wachstumsfaktoren zeigte sich jedoch keine weitere Erhöhung der Phosphorylierung.

PD153035 hob die Phosphorylierung von P90^{RSK} und PKB/Akt auf und hemmte die p42/44 MAPK-Phosphorylierung inkomplett. Im Gegensatz dazu wurde die RPS6-Phosphorylierung nur um etwa die Hälfte reduziert. AG1024 hemmte die PKB/Akt- und p90^{RSK}-Phosphorylierung weitgehend, hatte aber nur einen geringen Effekt auf RPS6 und p40/42 MAPK. Die Kombination von PD153035 (10 µM) und AG1024 (1 µM) führte zu einer synergistischen Suppression der RPS6-Phosphorylierung (Abb. 21). Die Wirksamkeit der kombinierten Behandlung korreliert also mit einer Suppression des mTOR-Signalwegs; weitere Studien müssen die funktionelle Bedeutung dieser Korrelation untersuchen.

Unveränderte Ergebnisse wurden erreicht, wenn die Zellen in Anwesenheit von CD95L mit den oben genannten Substanzen behandelt wurden (Daten nicht gezeigt), CD95 führt also selbst nicht zu einer Modulation der Phosphorylierung der untersuchten Kinasen.

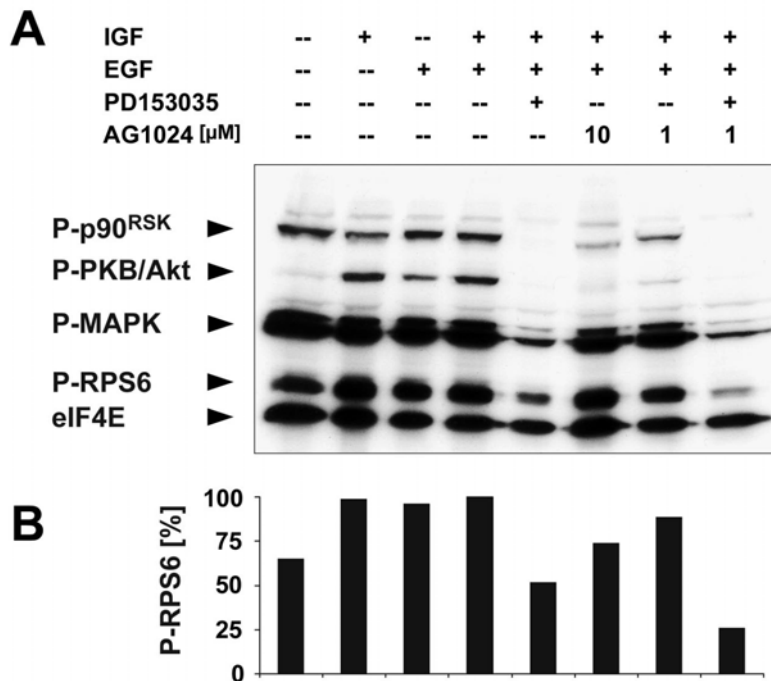


Abb. 21: Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR reduziert synergistisch die Phosphorylierung des mTOR-Zielproteins RPS6. LNT-229-Zellen wurden mit EGF (100 ng/ml) und IGF-I (50 ng/ml) stimuliert und mit Vehikel, PD153035 (10 μ M) und AG1024 (1 μ M) einzeln oder in Kombination für 20 Minuten inkubiert. **A** Zelllysate wurden im Immunoblot mit den Antikörpern phospho-p90^{RSK}, phospho-PKB/AKT, phospho-p42/44 MAPK, phospho-RPS6 und eIF4E (nicht phosphospezifisch) analysiert. **B** Die Phosphorylierung von RPS6 wurde durch Densitometrie bestimmt. EIF4E diente als Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Serumentzug

Serumentzug führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer deutlichen Wachstumshemmung. Bei einigen Zelllinien führte Serumentzug nach lichtmikroskopischen Kriterien und im LDH-Assay auch zu Zelltod. Der wachstumsinhibitorische Effekt des Serumentzugs war dabei von der Zelldichte abhängig.

Zwei Mechanismen sind als wesentlich anzunehmen: Zell-Zellkontakte und autokrine/parakrine Produktion von z.B. Wachstumsfaktoren. Bei der Ausbildung von Zell-Zellkontakten kommt es zu interzellulären Verbindungen, die die Gewebearchitektur stabilisieren. Es gibt eine Reihe von unterschiedlichen Mechanismen der Zell-Zell-Adhäsion. Diese Zell-Zell-Verknüpfungen spielen in epithelialen Geweben eine besondere Rolle. So folgerten Betson et al. dass die Cadherin-abhängige Adhäsion Rac über den EGFR-Signalweg aktivieren kann und somit über die Überlebensmechanismen des EGFR-Signalweges zu einem besseren Wachstum der Zellen bei Ausbildung von Zell-Zellkontakten führt (4). Die gesteigerte Proliferation bei Zell-Zellkontakten ist auch auf einen PI3K-abhängigen Signalweg zurückzuführen (59). Außerdem wurde beobachtet, dass der EGFR sogar unter serumfreien Bedingungen aktiviert war, wenn Zell-Zellkontakte bestanden (100). Ein weiterer Punkt könnte die autokrine/parakrine Produktion von Wachstumsfaktoren sein. Bei einer höheren Zellzahl in gleichem Volumen ist die Konzentration an sezernierten Wachstumsfaktoren höher, also kann das Fehlen der Wachstumsfaktoren in serumfreiem Medium besser ausgeglichen werden.

5.2 Stimulation mit Wachstumsfaktoren

Da die Wachstumsfaktoren zu den Bestandteilen im Serum gehören, die für das Wachstum und die Proliferation der Zellen verantwortlich sind, lag die Vermutung nahe, dass man die Effekte des Serumentzugs durch Gabe von Wachstumsfaktoren wieder aufheben kann. Die Versuche wurden mit EGF, IGF-I, FGF-I und PDGF, die zunächst einzeln und später kombiniert zum Medium dazugegeben wurden, durchgeführt. Die unterschiedlichen Muster der proliferativen Effekte der einzelnen Wachstumsfaktoren bei den verschiedenen Zelllinien können dabei als eine Art „molekulare Signatur“ betrachtet werden, die Hinweise auf die Bedeutung der zugehörigen Rezeptortyrosinkinasen geben können.

Auffallend war, dass bei der Zelllinie U87MG die Stimulation mit FGF-I Zelltod induzierte. In keiner anderen der mit FGF behandelten Zelllinien zeigte sich ein solcher Effekt. Ähnliche Effekte sind in der Literatur mehrfach beschrieben. So bewirkt FGF-II im Neuroblastom biologische Effekte wie Wachstum und Differenzierung, während es in peripheren primitiven neuroektodermalen Tumoren/Ewing Sarkomen Apoptose induziert (38). FGF-II kann darüberhinaus NIH 3T3-Zellen (Mäuse-Fibroblasten) (14), MCF7-Zellen (Brustkrebs-Zellen) (21) und A2780-Zellen (Ovarialkrebs-Zellen) gegenüber Cisplatin sensitivieren. Dazu werde FGF-Konzentrationen benötigt (5-10 ng/ml), die höher sind als die für mitogene Effekte erforderliche Konzentrationen. Außerdem ist die Sensitivierung p53-unabhängig (13). Möglicherweise spielt eine Herabregulation von BCL-2 eine Rolle bei diesem Phänomen (91).

Auffallend war auch, dass die Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren keine wesentlich bessere Wirkung zeigte als die Stimulation mit einzelnen Faktoren. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

- Die nachgeschalteten Signalwege sind konvergent, d.h. die Stimulation mit mehr als einem Faktor ist redundant.
- Autokrine bzw. parakrine Effekte können die Stimulation beeinflussen.
- Weitere Serumkomponenten (z.B. Aminosäuren) können unabhängig von den Wachstumsfaktoren die Proliferation fördern.

5.3 Effekte einer kombinierten Blockade von EGFR und IGF-IR

Die Eigeneffekte der Inhibitoren von EGFR und IGF-IR waren bei den einzelnen Zelllinien unterschiedlich; nur bei einem Teil der Zelllinien wurden synergistische Effekte auf Wachstumsinhibition und Zelltodinduktion erzielt. Auch waren die Effekte der Inhibitoren nicht gänzlich mit den Effekten der Wachstumsfaktoren kongruent. So führte die Inhibition des EGFR bei der Zelllinie LNT-229 zu einer praktisch vollständigen Wachstumsinhibition, obwohl die Stimulation mit EGF den Serumentzug-induzierten Wachstumsarrest nicht aufzuheben vermochte. Auch hierfür sind wahrscheinlich autokrine/parakrine Effekte und möglicherweise auch Liganden-unabhängige Aktivierungen von Rezeptortyrosinkinasen wesentlich.

5.4 Synergistische Sensitivierung gegenüber CD95L-induzierter Apoptose durch Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR

Es ist bekannt, dass CD95L-induzierter Zelltod durch Inhibition des EGFR mit AG1478 in sieben von zwölf humanen Glioblastomzelllinien gesteigert werden kann (79). Chakravarti et al. zeigten 2002, dass zwei verschiedene primäre Glioblastomzelllinien, die eine gleiche EGFR-Expression aufweisen, auf die Behandlung mit AG1478 unterschiedlich reagieren (9). Bei der einen Zelllinie führt die Behandlung mit AG1478 zur gesteigerten Strahlen-induzierten Apoptose und reduziertem invasiven Potential, bei der anderen Zelllinie zeigt sich eine Resistenz gegen AG1478 durch Hochregulation des IGF-IR. Vor diesem Hintergrund lag es nahe, dass auch die CD95L-induzierte Apoptose durch kombinierte Inhibition von EGFR und IGF-IR noch effektiver werden könnte; die Charakterisierung der Effekte der Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR stellte der Schwerpunkt dieser Dissertation dar.

Zunächst ist bemerkenswert, dass die Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR bei LNT-229 Zellen zu einer synergistischen Sensibilisierung gegenüber CD95L führt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition des IGF-IR eine gute Möglichkeit ist, um Resistenzen, wie sie bei EGFR-Inhibition entstehen, zu

verhindern. Besonders hervorzuheben ist, dass dies selbst bei einer Konzentration des IGF-IR-Inhibitors AG1024 von 1 μ M, die alleine weder einen toxischen Effekt noch einen Einfluss auf die CD95L-induzierte Apoptose hatte, beobachtet wurde. Damit wird die Ausgangshypothese gestützt, dass die Blockade einer Rezeptortyrosinkinase durch Aktivierung einer verwandten Rezeptortyrosinkinase kompensiert werden kann, und die Beobachtung kann als *proof-of-principle* für die Wirksamkeit der Co-Inhibition für die Überwindung solcher Kompensationsmechanismen dienen.

5.5 Effekte der Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR auf die Zelltodprogramme

Die Annexin V-Versuche belegen, dass der durch die kombinierte Inhibition von EGFR und IGF-IR fazilitierte CD95L-induzierte Zelltod apoptotisch ist (Abb. 16). Um herauszufinden, wie die EGFR- und IGF-IR-Inhibition den CD95L-vermittelten Zelltod steigern kann, wurde zunächst die Wirkung auf Caspasen untersucht. Die Co-Inhibition führte sowohl zu einer crmA-sensitiven Steigerung der Caspase 8-Spaltung (Abb. 18) als auch zu einer vermehrten Spaltung des Caspasesubstrates PARP und zu gesteigerter Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7.

Diese Effekte können nicht auf Rezeptorebene erklärt werden, da das Niveau der Oberflächenexpression von CD95 unverändert blieb (Abb. 19). Damit zeigen diese Untersuchungen, dass PD153035 und AG1024 den durch CD95L-induzierten Zelltod auf dem Niveau der Caspase 8 verstärken.

5.6 Die Rolle von p53

Schließlich wurde untersucht, ob der Effekt der Co-Inhibition auf die CD95L-induzierte Apoptose p53-abhängig ist. Es ist bekannt, dass eine p53-vermittelte Induktion des *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGF-BP3), das die Signalübertragung des IGF-Rezeptors hemmt, an der Hemmung der Proliferation durch p53 beteiligt ist.

Um die Rolle von p53 zu erklären, wurden die Effekte der EGFR und IGF-IR-Inhibition in der Zelllinie LNT-229, die p53 Wildtyp-Status hat (99) und in drei weiteren Zelllinien untersucht: U87MG (p53 Wildtyp), T98G (p53-Mutante) und LN-18 (p53-Mutante). Eine synergistische Sensitivierung gegenüber CD95L-induziertem Zelltod wurden neben LNT-229 Zellen auch bei U87MG, aber nicht bei T98G oder LN-18 Zellen, festgestellt. Es schien daher möglich, dass die Sensitivität der Kombinationsbehandlung vom p53-Status abhängt.

Um die Rolle von p53 funktionell zu untersuchen, wurden LNT-229 Zellen mit der temperatursensitiven p53^{V135A}-Mutante transfiziert. Da die bei 38,5°C stimulierten p53^{V135A}-Zellen im Vergleich zu den Hygro-Kontrollzellen kein anderes Wachstums- beziehungsweise Sterbeverhalten zeigten, kann geschlossen werden, dass die Fazilitierung des CD95L-induzierten Zelltodes durch Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR p53-unabhängig ist. Andere Faktoren müssen für das unterschiedliche Ansprechen auf die Co-Inhibition von EGFR/IGF-IR in den Zelllinien LNT-229, U87MG, LN-18 und T98G verantwortlich sein. Dieses Ergebnis passt dazu, dass die Sensitivierung durch EGFR-Inhibition bezüglich CD95L-induzierter Apoptose bei den 12 Gliomzelllinien nicht mit deren p53-Status korreliert (79).

5.7 Effekte der IGF-IR- und EGFR-Inhibition auf nachgeschaltete Signalkaskaden

Der wesentliche Befund der Analysen der den EGFR- und IGF-IR nachgeschalteten Signalwege ist eine synergistische Suppression der Phosphorylierung des RPS6 bei Co-Inhibition. RPS6 ist ein Effektor der Kinase mTOR, seine Dephosphorylierung führt zu einer Reduktion der Translation von vielen Proteinen. Da auch unspezifische Inhibitoren der Proteinsynthese wie Cycloheximid sensibilisierend gegenüber CD95L wirken, erscheint es möglich, dass die veränderte Phosphorylierung des RPS6 für die Wirkung der Co-Inhibition wesentlich ist. Es ist anzunehmen, dass der Effekt über eine reduzierte Expression von noch zu identifizierenden Proteinen mit antiapoptotischen Eigenschaften vermittelt wird.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Effekt der Wachstumsfaktoren EGF, IGF-I, FGF-I und PDGF auf Wachstum und Überleben von zwölf humanen malignen Gliomzelllinien bei Serumentzug untersucht. Dabei wurden bei den einzelnen Zelllinien unterschiedliche Abhängigkeiten von individuellen Wachstumsfaktoren beobachtet, die als eine „molekulare Signatur“ Hinweise auf die Relevanz der zugehörigen Rezeptortyrosinkinase gelten können.

Die Charakterisierung der Effekte einer Co-Inhibition von EGFR und IGF-IR auf den CD95L-induzierte Zelltod war der zentrale Bestandteil dieser Arbeit.

Dabei wurde zunächst eine synergistische Sensitivierung gegenüber CD95L durch die Co-Inhibition bei den p53-Wildtyp-Zelllinien LNT-229 und U87MG nachgewiesen, nicht jedoch bei den p53-mutanten Zelllinien LN-18 und T98G. Experimente mit dem temperatursensitiven p53^{V135A} zeigten jedoch, dass der sensitivierende Effekt der Co-Inhibition nicht p53-abhängig ist.

Der Typ des durch die Co-Inhibition faziilitierten Zelltods war apoptotisch und begleitet von einer crmA-sensitiven Aktivierung von Caspase 8, den Effektorcaspasen 3 und 7 und der Prozessierung des Caspasesubstrats PARP. Da ein Effekt der Co-Inhibition auf das Expressionsniveau von CD95 ausgeschlossen wurde, kann der proapoptotische Effekt der Co-Inhibition auf dem Niveau der Caspase 8 lokalisiert werden.

Eine synergistische Suppression des mTOR-Zielproteins RPS6 stellt den wesentlichen Befund der Analyse der EGFR und IGF-IR nachgeschalteten Signalwege dar. Die Ergebnisse dieser Dissertation können als Argumente für den Einsatz einer Co-Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen bei malignen Gliomen dienen.

7 Literatur

1. Baserga, R. (1994) Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 79: 927-930.
2. Baserga, R. (1995) The insulin-like growth factor I receptor: A key to tumor growth? *Cancer Res.* 55: 249-252.
3. Batra, S. K.; Castelino-Prabhu, S.; Wikstrand, C. J.; Zhu, X.; Humphrey, P. A.; Friedman, H. S.; Bigner, D. D. (1995) Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ.* 6: 1251-1259.
4. Betson, M.; Lozano, E.; Zhang, J.; Braga, V. M. (2002) Rac activation upon cell-cell contact formation is dependent on signaling from the epidermal growth factor receptor. *Biol. Chem.* 277:36962-36969.
5. Behrens, A.; Jochum, W.; Sibilina, M.; Wagner, E. F. (2000) Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene* 19: 657-663.
6. Brabender, J.; Danenberg, K. D.; Metzger, R.; Schneider, P. M.; Park, J.; Salonga, D.; Holscher, A. H.; Danenberg, P. V. (2001) Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin. Cancer Res.* 7: 1850-1855.
7. Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M. J.; Lin, M. Z.; Juo, P.; Hu, L. S.; Anderson, M. J.; Arden, K. C.; Blenis, J.; Greenberg, M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868.
8. Cardone, M. H.; Roy, N.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S.; Franke, T. F.; Stanbridge, E.; Frisch, S.; Reed, J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321.
9. Chakravarti, A.; Loeffler, J. S.; Dyson, N. J. (2002) Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer Res.* 62: 200-207.
10. Chambers, A. F.; Tuck, A. B. (1993) Ras-responsive genes and tumor metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* 4: 95-114.
11. Chen, N.; Nomura, M.; She, Q. B.; Ma, W. Y.; Bode, A. M.; Wang, L.; Flavell, R. A.; Dong, Z. (2001) Suppression of skin tumorigenesis in c-Jun NH(2)-terminal kinase-2-deficient mice. *Cancer Res.* 61:3908-3912.
12. Coppola, D.; Ferber, A.; Miura, M.; Sell, C.; D'Ambrosio, C.; Rubin, R.; Baserga, R. (1994) A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4588-4595.
13. Coleman, A. B.; Metz, M. Z.; Donohue, C. A.; Schwarz, R. E.; Kane, S. E. (2002) Chemosensitization by fibroblast growth factor-2 is not dependent upon proliferation, S-phase accumulation, or p53 status. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1111-1123.
14. Coleman, A. B.; Momand, J.; Kane, S. E. (2000) Basic fibroblast growth factor sensitizes NIH 3T3 Cells to apoptosis induced by cisplatin. *Mol. Pharmacol.* 57: 324-333.

15. Cross, D. A.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B. A. (1995) Inhibition of Glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789.
16. Cryns, V.; Yuan, J. (1998) Proteases to die for. *Genes Dev.* 12: 1551-1570.
17. Czech, M. P. (2000) Lipid rafts and insulin action. *Nature* 407: 147-148.
18. Davies, M. A.; Lu, Y.; Sano, T.; Fang, X.; Tang, P.; La Pushin, R.; Koul, D.; Bookstein, R.; Stokoe, D.; Yung, W. K.; Mills, G. B.; Steck, P. A. (1998) Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res.* 58: 5285-5290.
19. Doerr, M. E.; Jones, J. I. (1996) The roles of integrins and extracellular matrix proteins in the insulin-like growth factor I-stimulated chemotaxis of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 271: 2443-2447.
20. Dufner, A.; Thomas, G. (1999) Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp. Cell. Res.* 253: 100-109.
21. Fenig, E.; Livnat, T.; Sharkon-Polak, S.; Wasserman, L.; Beery, E.; Lilling, G.; Yahalom, J.; Wieder, R.; Nordenberg, J. (1999) Basic fibroblast growth factor potentiates cisplatin-induced cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 125: 556-562.
22. Furnari, F. B.; Lin, H.; Huang, H. S.; Cavenee, W. K. (1997) Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 12479-12484
23. Gospodarowicz, D. (1976) Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing, and neoplastic growth. *Prog. Clin. Biol. Res.* 9: 1-19
24. Griffith, T. S.; Ferguson, T. A. (1997) The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol. Today* 18: 240-244.
25. Griffith, T. S.; Brunner, T.; Fletcher, S. M.; Green, D. R.; Gerguson, T. A. (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270: 1189-1192.
26. Guha, A.; Feldkamp, M. M.; Lau, N.; Boss, G.; Pawson, A. (1997) Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene* 15: 2755-2765.
27. Gullick, W. J. (1998) Type I growth factor receptors: current status and future work. *Biochem. Soc. Symp.* 63: 193-198.
28. Gutmann, D. H.; Giordano, M. J.; Mahadeo, D. K.; Lau, N.; Silbergeld, D.; Guha, A. (1996) Increased neurofibromatosis 1 gene expression in astrocytic tumors: positive regulation by p21-ras. *Oncogene* 12: 2121-2127.
29. Haas-Kogan, D.; Shalev, N.; Wong, M.; Mills, G.; Yount, G.; Stokoe, D. (1998) Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr. Biol.* 8: 1195-1198.
30. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
31. Holland, E. C.; Hively, W. P.; De Pinho, R. A.; Varmus, H. E. (1998) A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev.* 12: 3675-3685.

32. Howe, L. R.; Leever, S. J.; Gomez, N.; Nakielny, S.; Cohen, P.; Marshall, C. J. (1992) Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71: 335-342.
33. Huang, H. S.; Nagane, M.; Klingbeil, C. K.; Lin, H.; Nishikawa, R.; Ji, X. D.; Huang, C. M.; Gill, G. N.; Wiley, H. S.; Cavenee, W. K. (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.* 272: 2927-2935.
34. Irmeler, M.; Thome, M.; Hahne, M.; Schneider, P.; Hofmann, K.; Steiner, V.; Bodmer, J. L.; Schroter, M.; Burns, K.; Mattmann, C.; Rimoldi, D.; French, L. E.; Tschopp, J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195.
35. Kalebic, T.; Tsokos, M.; Helman, L. J. (1994) In vivo treatment with antibody against IGF-I receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34cdc2. *Cancer Res.* 54: 5531-5534.
36. Kaleko, M.; Rutter, W. J.; Miller, A. D. (1990) Overexpression of the human insulin-like growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol. Cell. Biol.* 10: 464-473.
37. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
38. Kim, M. S.; Kim, C. J.; Jung, H. S.; Seo, M. R.; Juhn, Y. S.; Shin, H. Y.; Ahn, H. S.; Thiele, C. J.; Chi, J. G. (2004) Fibroblast growth factor 2 induces differentiation and apoptosis of Askin tumour cells. *J. Pathol.* 202: 103-112.
39. Kleihues, P.; Sobin LH (2000) World Health Organisation classification of tumors. *Cancer* 88: 2887.
40. Korc, M. (1998) Role of growth factors in pancreatic cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 7: 25-41.
41. Kyriakis, J. M.; Force, T. L.; Rapp, U. R.; Bonventre, J. V.; Avruch, J. (1993) Mitogen regulation of c-Raf-1 protein kinase activity toward mitogen-activated protein kinase-kinase. *J. Biol. Chem.* 268: 16009-16019.
42. LeRoith, D.; Helman, L. (2004) The new kid on the block(ade) of the IGF-I receptor. *Cancer Cell* 5: 201-202.
43. Levitzki, A. (1999) Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* 82: 231-239.
44. Li, H.; Zhu, H.; Xu, C.; Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94: 491-501.
45. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S.; Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
46. Li, W.; Nishimura, R.; Kashishian, A.; Batzer, A. G.; Kim, W. J.; Cooper, J. A.; Schlessinger, J. (1994) A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14: 509-517.
47. Li, S.; Ferber, A.; Miura, M.; Baserga, R. (1994) Mitogenicity and transforming activity of the insulin-like growth factor-I receptor with mutations in the tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem.* 269: 32558-32564.

48. Liu, J. J.; Chao, J. R.; Jiang, M. C.; Ng, S. Y.; Yen, J. J.; Yang-Yen, H. F. (1995) Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3654-3663.
49. Louis, D. N. (1994) The p53 gene and protein in human brain tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53: 11-21.
50. Lu, D.; Zhang, H.; Ludwig, D.; Persaud, A.; Jimenez, X.; Burtrum, D.; Balderes, P.; Liu, M.; Bohlen, P.; Witte, L.; Zhu, Z. (2004) Simultaneous blockade of both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor signaling pathways in cancer cells with a fully human recombinant bispecific antibody. *J. Biol. Chem.* 279: 2856-2865.
51. Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X. (1998) Bid, a Bcl-2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell* 94: 481-490.
52. Mauro, L.; Salerno, M.; Morelli, C.; Boterberg, T.; Bracke, M. E.; Surmacz, E. (2003) Role of the IGF-I receptor in the regulation of cell-cell adhesion: implications in cancer development and progression. *J. Cell. Physiol.* 194: 108-116.
53. Mauro, L.; Sisci, D.; Bartucci, M.; Salerno, M.; Kim, J.; Tam, T.; Guvakova, M. A.; Ando, S.; Surmacz, E. (1999) SHC-alpha5beta1 integrin interactions regulate breast cancer cell adhesion and motility. *Exp. Cell. Res.* 252: 439-448.
54. Meyers, M. B.; Shen, W. P.; Spengler, B. A.; Ciccarone, V.; O'Brien, J. P.; Donner, D. B.; Furth, M. E.; Biedler, J. L. (1988) Increased epidermal growth factor receptor in multidrug-resistant human neuroblastoma cells. *J. Cell. Biochem.* 38: 87-97.
55. Morrison, R. S. (1991) Suppression of basic fibroblast growth factor expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits the growth of transformed human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 266: 728-734.
56. Müller, M.; Strand, S.; Hug, H.; Heinemann, E. M.; Walczak, H.; Hofmann, W. J.; Stremmel, W.; Krammer, P. H.; Galle, P. R. (1997) Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.* 99: 403.
57. Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365.
58. Nagata, S.; Golstein, P. (1995) The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456.
59. Nelson, C. M.; Chen, C. S. Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Lett.* 514: 238-242.
60. Neshat, M. S.; Mellingerhoff, I. K.; Tran, C.; Stiles, B.; Thomas, G.; Petersen, R.; Frost, P.; Gibbons, J. J.; Wu, H.; Sawyers, C. L. (2001) Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98: 10314-10319.
61. Nishikawa, R.; Ji, X. D.; Harmon, R. C.; Lazar, C. S.; Gill, G. N.; Cavenee, W. K.; Huang H. J. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91: 7727-7731.
62. O'Rourke, D. M.; Qian, X.; Zhang, H. T.; Davis, J. G.; Nute, E.; Meinkoth, J.; Greene, M. I. (1997) Trans receptor inhibition of human glioblastoma cells by erbB family ectodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 3250-3255.

63. Pass, H. I.; Mew, D. J.; Carbone, M.; Matthews, W. A.; Donington, J. S.; Baserga, R.; Walker, C. L.; Resnicoff, M.; Steinberg, S. M. (1996) Inhibition of hamster mesothelioma tumorigenesis by an antisense expression plasmid to the insulin-like growth factor-I receptor. *Cancer Res.* 56: 4044-4048.
64. Pohl, U.; Wagenknecht, B.; Naumann, U.; Weller, M. (1999) p53 enhances BAK and CD95 expression in human malignant glioma cells but does not enhance CD95L-induced apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 9:29-33.
65. Pullen, N.; Dennis, P. B.; Andjelkovic, M.; Dufner, A.; Kozma, S. C.; Hemmings, B. A.; Thomas, G. (1998) Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* 279: 707-710.
66. Rameh, L. E.; Cantley, L. C. (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274: 8347-8350.
67. Ray, C. A.; Black, R. A.; Kronheim, S. R.; Greenstreet, T. A.; Sleath, P. R.; Salvesen, G. S.; Pickup, D. J. (1992) Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69: 597-604.
68. Redemann, N.; Holzmann, B.; von Ruden, T.; Wagner, E. F.; Schlessinger, J.; Ullrich, A. (1992) Anti-oncogenic activity of signalling-defective epidermal growth factor receptor mutants. *Mol. Cell. Biol.* 12: 491-498.
69. Rommel, C.; Clarke, B. A.; Zimmermann, S.; Nunez, L.; Rossman, R.; Reid, K.; Moelling, K.; Yancopoulos, G. D.; Glass, D. J. (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286: 738-1741.
70. Sakahira, H.; Enari, M.; Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99.
71. Sako, Y.; Minoghchi, S.; Yanagida, T. (2000) Single-molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nat. Cell. Biol.* 2: 168-72.
72. Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-225.
73. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002;110:669-672.
74. Schmelzle, T.; Hall, M. T. (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103: 253-262.
75. Shima, H.; Pende, M.; Chen, Y.; Fumagalli, S.; Thomas, G.; Kozma, S. C. (1998) Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 17: 6649-6659.
76. Shinjima, N.; Tada, K.; Shiraishi, S.; Kamiryo T.; Kochi, M.; Nakamura, H.; Makino, K.; Saya, H.; Hirano, H.; Kuratsu, J.; Oka, K.; Ishimaru Y.; Ushio Y. (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 63: 6962-6970.
77. Simmons, M. L.; Lamborn, K. R.; Takahashi, M.; Chen, P.; Israel, M. A.; Berger, M. S.; Godfrey, T.; Nigro, J.; Prados, M.; Chang, S.; Barker F. G.; Aldape, K. (2001) Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 61: 1122-1128.
78. Sonoda, Y.; Ozawa, T.; Aldape, K. D.; Deen, D. F.; Berger, M. S.; Pieper, R. O. (2001) Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res.* 61: 6674-6678.

79. Steinbach, J. P.; Supra, P.; Huang, H. J.; Cavenee, W. K.; Weller, M. (2002) CD95-mediated apoptosis of human glioma cells: modulation by epidermal growth factor receptor activity. *Brain Pathol.* 12: 12-20.
80. Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Eisenhauer, E.; Mirimanoff, R. O. (2005) Radiotherapie plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352: 987-996.
81. Suda, T.; Takahashi, T.; Golstein, P.; Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178.
82. Sugihara, A.; Saiki, S.; Tsuji, M.; Tsujimura, T.; Nakata, Y.; Kubota, A.; Kotake, T.; Terada, N. (1997) Expression of Fas and Fas ligand in the testes and testicular germ cell tumors: an immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 17: 3861-3865.
83. Surmacz, E. (2000) Function of the IGF-I receptor in breast cancer. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 5: 95-105.
84. Tamura, T.; Aoyama, N.; Saya, H.; Haga, H.; Futami, S.; Miyamoto, M.; Koh, T.; Ariyasu, T.; Tachi, M.; Kasuga, M.; Takahashi, R. (1995) Induction of Fas-mediated apoptosis in p53-transfected human colon carcinoma cells. *Oncogene* 11: 1939.
85. Tian, X. X.; Pang, J. C.; To, S. S.; Ng, H. K. (1999) Restoration of wild-type PTEN expression leads to apoptosis, induces differentiation, and reduces telomerase activity in human glioma cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58: 472-479.
86. Trojan, J.; Johnson, T. R.; Rudin, S. D.; Ilan, J.; Tykocinski, M. L.; Ilan, J. (1993) Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. *Science* 259: 94-97. 87
87. Valentini, B.; Morrione, A.; Taylor, S. J.; Baserga, R. (1997) Insulin-like growth factor I receptor signaling in transformation by src oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 17: 3744-3754.
88. Von Deimling, A.; Eibl, R. H.; Ohgaki, H.; Louis, D. N.; von Ammon, K.; Petersen, I.; Kleihues, P.; Chung, R. Y.; Wiestler, O. D.; Seizinger, B. R. (1992) p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res.* 52: 2987-2990.
89. Vuori, K.; Ruoslahti, E. (1994) Association of insulin receptor substrate-1 with integrins. *Science* 266: 1576-1578.
90. Walker, P. R.; Saas, P.; Dietrich, P. Y. (1997) Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J. Immunol.* 158: 4521-4524.
91. Wang, Q.; Maloof, P.; Wang, H.; Fenig, E.; Stein, D.; Nichols, G.; Denny, T. N.; Yahalom, J.; Wieder, R. (1998) Basic fibroblast growth factor downregulates Bcl-2 and promotes apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp. Cell. Res.* 238: 177-187.
92. Weller, M.; Frei, K.; Groscurth, P.; Krammer, P. H.; Yonekawa, Y.; Fontana, A. (1994) Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines. *J. Clin. Invest.* 94: 954-964.
93. Weller, M.; Kleihues, P.; Dichgans, J.; Ohgaki, H. (1998) CD95 ligand: lethal weapon against malignant glioma? *Brain Pathol.* 8: 285-293.

94. Weller, M.; Malipiero, U.; Aguzzi, A.; Reed, J. C.; Fontana, A. (1995) Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. *J. Clin. Invest.* 95: 2633-2643.
95. Wischhusen, J.; Naumann, U.; Ohgaki, H.; Rastinejad, F.; Weller, M. (2003) CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. *Oncogene* 22: 8233–8245.
96. Wong, A. J.; Bigner, S. H.; Bigner, D. D.; Kinzler, K. W.; Hamilton, S. R.; Vogelstein, B. (1987) Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84: 6899-6903.
97. Woodburn, J. R. (1999) The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 82: 241-250.
98. Wosikowski, K.; Schuurhuis, D.; Kops, G. J.; Saceda, M.; Bates, S. E. (1997) Altered gene expression in drug-resistant human breast cancer cells. *Clin. Cancer. Res.* 3: 2405-2414.
99. Wu, X.; Fan, Z.; Masui, H.; Rosen, N.; Mendelsohn, J. (1995) Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J. Clin. Invest.* 95: 1897-1905.
100. X.; Miyamoto, S.; Mekada, E. (2000) Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *J. Cell. Sci.* 113: 2139-2147.
101. Yamada, S. M.; Yamada, S.; Hayashi, Y.; Takahashi, H.; Teramoto, A.; Matsumoto, K. (2002) Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 4 correlated with the malignancy of human astrocytomas. *Neurol. Res.* 24: 244-248.
102. Yart, A.; Laffargue, M.; Mayeux, P.; Chretien, S.; Peres, C.; Tonks, N.; Roche, S.; Payrastra, B.; Chap, H.; Raynal, P. (2001) A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 276: 8856-8864.
103. Zha, J.; Weiler, S.; Oh, K. J.; Wie, M. C.; Korsmeyer, S. J. (2000) Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290: 1761-1765.
104. Zhang, D.; Brodt, P. (2003) Type I insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. *Oncogene* 22: 974-982.
105. Zumkeller, W.; Westphal, M. (2001) The IGF/IGFBP system in CNS malignancy. *Mol. Pathol.* 54: 227-229.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

An erster Stelle sei Herrn Professor Dr. Michael Weller herzlichst gedankt für die Bereitstellung der Fragestellung und die Unterstützung meiner Arbeit in theoretischen und praktischen Fragen.

Ein außerordentlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Joachim Steinbach für die intensive und hervorragende Betreuung.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Neuro-Onkologie für die gute Atmosphäre, gute und unkomplizierte Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, die ich durch meine Kollegen erfahren habe. Ein besonderer Dank gilt dabei Andrea Klumpp und Simone Weit.

Caroline Happold danke ich für die freundschaftliche Verbundenheit, die über die Zeit der Arbeit meiner Dissertation und des Studiums hinaus geht.

Ulrich Grau danke ich für die Kraft und seine liebevolle Unterstützung, die er mir zuteil werden lässt.

Meinen Eltern und meiner Schwester Eva-Maria bin ich dankbar für die Unterstützung und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christine Eisenmann
Geboren am: 29.08.1978
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985- 1989: Grund- und Hauptschule Oberwolfach
1989- 1998: Robert- Gerwig- Gymnasium Hausach
Abschluß: Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr:

1998- 1999: Hôpital de Sablé sur Sarthe, Frankreich

Hochschulausbildung:

1999-2001: Vorklinisches Studium an der Eberhart- Karls- Universität Tübingen

2001-2004: Klinisches Studium an der Eberhart- Karls- Universität Tübingen

2004-2005: Praktisches Jahr

- 1. Tertial: Innere Medizin, Hôpital Civil Université Louis Pasteur, Strasbourg, Frankreich
- 2. Tertial: Neurologie (Schwerpunktstation Neuroonkologie), Universitätsklinik Tübingen
- 3. Tertial: Chirurgie, Kantonspital, Liestal, Schweiz

17.11.2005: 3. Staatsexamen

Berufsausübung:

Seit Januar 2006: Assistenzärztin am Klinikum Ludwigsburg, Neurologische Klinik

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christine Eisenmann

Geboren am: 29.08.1978

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1985- 1989: Grund- und Hauptschule Oberwolfach

1989- 1998: Robert- Gerwig- Gymnasium Hausach

Abschluß: Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr:

1998- 1999: Hôpital de Sablé sur Sarthe, Frankreich

Hochschulausbildung:

1999-2001: Vorklinisches Studium an der Eberhart- Karls- Universität Tübingen

2001-2004: Klinisches Studium an der Eberhart- Karls- Universität Tübingen

2004-2005: Praktisches Jahr

- 1. Tertial: Innere Medizin, Hôpital Civil Université Louis Pasteur, Strasbourg, Frankreich
- 2. Tertial: Neurologie (Schwerpunktstation Neuroonkologie), Universitätsklinik Tübingen
- 3. Tertial: Chirurgie, Kantonspital, Liestal, Schweiz

17.11.2005: 3. Staatsexamen.

Berufsausübung:

Seit Januar 2006: Assistenzärztin am Klinikum Ludwigsburg, Neurologische Klinik