

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Professur für Neuropathologie

Einfluss des Lipidperoxidationsproduktes 4-Hydroxynonenal auf die EGFR-
vermittelte Migration glialer Tumorzellen

Michał Mariusz Szyper

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Schlegel
2. Priv.-Doz. Dr. Jens Gempt

Die Dissertation wurde am 05.07.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.03.2019 angenommen.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
A. Einleitung.....	4
1. Problemstellung.....	4
2. Klassifikation glialer Tumoren.....	5
3. Pathologische Aspekte des Glioblastoms	5
4. Rezeptortyrosinkinasen.....	6
4.1 Der PI3K/Akt-Signalweg.....	7
4.2 Der MAPK-Signalweg.....	8
5. Tumorstammzellen	9
5.1 Tumorstammzell-Hypothese.....	9
5.2 Stammzellmarker hirneigener Tumore	10
6. Zellmigration	11
7. 4-Hydroxynonenal	12
7.1 Chemische Eigenschaften und Synthese.....	12
7.2 Biologische Wirkungen	13
8. Zielsetzung.....	15
B. Material und Methoden.....	17
1. Material.....	17
1.1 Laborausstattung	17
1.2 Verbrauchsmaterial	17
1.3 Chemikalien, Reagenzien	18
1.4 Lösungen und Puffer.....	18
1.5 Zellkultur-Reagenzien und Medien	19
1.6 Kommerzielle Kits	19
1.6 Antikörper	20
2. Zellkultur.....	21
2.1 Kultivierung von Glioblastom-Zelllinien	21
2.2 Gewinnung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen.....	21
3. Proteinanalyse	22
3.1 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	22
3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
3.3 Western Blot Analyse	24
4. Zellbiologische Assays	25
4.1 Zellvitalitätsbestimmung mittels MTT-Assay	25
4.2 Evaluation der Migration mittels Wound-healing Assay.....	25
5. Statistische Analyse.....	26
C. Ergebnisse.....	27
1. Einfluss von HNE auf die Zellproliferation.....	27
2. Einfluss von 4-Hydroxynonenal auf die Rezeptortyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors.....	31

3. Wechselwirkungen von 4-HNE und der ALDH1-Expression auf das EGFR-Signaling	33
4. Einfluss von 4-Hydroxynonenal auf die Zellmigration	39
4.1 4-HNE-vermittelte Migration im LN229 Wildtyp.....	39
4.2 Die Bedeutung der ALDH1 Expression für das Migrationsverhalten unter 4-Hydroxynonenal.....	41
D. Diskussion	48
1. Die Rolle des EGF-Rezeptors bei der Wachstumsinhibition durch 4-Hydroxynonenal.....	49
2. Die Aktivierung der EGFR-Signalkaskade durch 4-Hydroxynonenal.....	50
3. ALDH1 moduliert die 4-Hydroxynonenal - induzierte Phosphorylierung von Tyrosinresten der EGFR-Signalkaskade.....	50
4. 4-Hydroxynonenal induziert die Migration glialer Tumorzellen über den EGF-Rezeptor	51
5. Aldehyd-dehydrogenase 1 determiniert die EGFR-vermittelte Zellmigration in LN18-Klonen.....	51
6. 4-HNE als Mediator von oxidativem Stress in Glioblastomen	52
E. Zusammenfassung.....	54
F. Bibliografie.....	55
Danksagung	62
Lebenslauf.....	63

Abkürzungsverzeichnis

A431	Humane Zelllinie eines Plattenepithelkarzinoms
ADH	Alkoholdehydrogenase
AG1478	Tyrphostin AG 1478
AKT	Proteinkinase B
ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B16-F10	Humane Melanomzelllinie
bzw.	Beziehungsweise
CD133	Cluster of differentiation 133
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERBB1	Rezeptor-tyrosine protein kinase erbB1; Synonym für HER1 / EGFR/ human epidermal growth factor receptor 1
ERBB2	Rezeptor-tyrosine protein kinase erbB2; Synonym für HER2 / human epidermal growth factor receptor 2
ERBB3	Rezeptor-tyrosine protein kinase erbB3; Synonym für HER3 / human epidermal growth factor receptor 3
ERK1/2	Extracellular signal-related kinases 1/2
EtOH	Ethanol
ECL	Enhanced chemiluminescence
GrB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCL	Chlorwasserstoff
HRP	Horseradish peroxidase
JNK	C-Jun-N-terminal kinase
KCL	Kaliumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
LDL	Low density lipoproteine
oxLDL	Oxidiertes low density lipoproteine
LN18	Humane Glioblastom Tumorzelllinie
LN229	Humane Glioblastom Tumorzelllinie
LNZ308	Humane Glioblastom Tumorzelllinie
G129	Humane Glioblastom Tumorzelllinie
4-HNE	4-Hydroxynonenal
4-HNE-GSH	Mit Glutathion konjugiertes 4-Hydroxynonenal
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEK	Protein der MAPK Signalkaskade
MOCK1	Zelltransfektion ohne DNA zur Kontrolle des Transfektionsvorganges
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
MTT-Assay	Auf dem Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) basierender Ansatz zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline
pERK1/2	Phosphorylierte ERK1/2
pEGFR	Phosphorylierter EGF-Rezeptor
pEGFR pY1086	Phosphorylierter EGF-Rezeptor am Tyrosinrest Y1086
PH	Pleckstrin homology Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	Phosphotyrosine binding domain
PTEN	Phosphatase and tenosin homolog, ein Tumorsuppressor-Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAF	RAF-Protein (rat fibrosarcoma)
RAS	G-Protein Ras (rat sarcoma)

Abkürzungsverzeichnis

RTK	Receptor tyrosin kinase
SAPK	Stress-activated phospho-kinases
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	Src-homologe 2
shRNA	Small hairpin RNA
SOS	Son of sevenless; Reihe von Genen, welche den GTP-Austauschfaktor kodieren
s.o.	Siehe oben
STAT3/5	Signal transducer and activator of transcription 3/5
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-alpha	Transforming growth factor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Mischung aus tris buffered saline und tween 20
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

A. Einleitung

1. Problemstellung

Das Glioblastoma Multiforme ist der häufigste maligne Tumor des hirneigenen Gewebes im Erwachsenen. Gleichzeitig ist die Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von 14 Monaten verheerend (Stupp et al. 2005).

Mit dem bisherigen Therapiestandard, der neurochirurgischen Resektion kombiniert mit Radio- und Chemotherapie, steht bislang kein kurativer Ansatz zur Verfügung, da Glioblastome frühzeitig in gesundes Hirngewebe infiltrieren und eine vergleichsweise geringe Strahlen- und Chemosensibilität aufweisen (DeAngelis et al. 1998).

Die relativ hohe Rate an EGFR (epidermal growth factor receptor) überexprimierenden Glioblastomen (Schlegel et al. 1994) lässt einen Einfluss dieser Signalkaskade auf die Tumorbiologie vermuten und eröffnete die Möglichkeit, gezielt das EGFR-vermittelte Wachstum und Invasion (Rappl et al. 2008) in benachbartes Hirngewebe durch geeignete Inhibitoren zu unterbinden.

Der bisher mäßige Erfolg der zielgerichteten anti-EGFR Therapien (Brown et al. 2008) zeigt die bisher nicht hinreichende Klärung des Stellenwertes von EGF-Rezeptoren in der Zellbiologie glialer Tumoren.

Neben dem regulären Liganden EGF gibt es noch eine atypische, also EGF-unabhängige Aktivierung der EGFR-Signalkaskade über Produkte der Lipidperoxidation. Diese entstehen bevorzugt unter oxidativem Stress, welcher das Milieu der hypoxischen Areale von Glioblastomen determiniert (Minyailenko et al. 1990).

Ein für das EGFR-Signaling bedeutsames Produkt der Lipidperoxidation ist das Molekül 4-HNE (4-Hydroxynonenal), welches direkt an den Rezeptor binden und damit Einfluss auf die Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität ausüben kann (Liu et al. 1999).

Eine Charakterisierung der 4-Hydroxynonenal-vermittelten Prozesse in Glioblastomen wäre besonders bedeutsam hinsichtlich der bislang nicht untersuchten 4-HNE-vermittelten Migration, unter anderem in Abhängigkeit von dem 4-HNE abbauendem Enzym Aldehyd-dehydrogenase 1, welches zugleich einen Stammzellmarker von Glioblastomen darstellt:

Die Migrationsfähigkeit glialer Tumorzellen ist nicht zuletzt für die Rezidive nach neurochirurgischer Resektion und damit auch partiell für die infauste Prognose des Glioblastoms verantwortlich.

2. Klassifikation glialer Tumoren

Entsprechend der World Health Organisation (WHO) werden gliale Tumoren in vier Klassen, abhängig des Malignitätsgrades, unterteilt:

Der WHO Grad I gehören z.B. pilozytische Astrozytome und subependymale Riesenzell-Astrozytome an. Diese Tumoren sind benigne und können in aller Regel durch chirurgische Resektion geheilt werden.

WHO Grad II Tumoren gelten als niedrig-maligne, verhalten sich jedoch biologisch aggressiver als z.B. pilozytische Astrozytome und neigen zu Rezidiven.

Häufigster Vertreter der WHO Grad III Tumoren ist das anaplastische Astrozytom, welches als maligner Tumor nicht zuletzt wegen seiner Tendenz, zum Glioblastom zu Transformieren, eine schlechte Prognose hat.

Die mit Abstand schlechteste Prognose haben WHO Grad IV Tumoren. Diese hochmalignen Gliome können zum einen de novo als primäre Glioblastome entstehen oder durch Entdifferenzierung von WHO Grad II und III Tumoren zu sekundären Glioblastomen fortschreiten.

3. Pathologische Aspekte des Glioblastoms

Glioblastome sind die häufigsten hirneigenen Tumoren. Bedeutend öfter begegnet man der supratentoriellen Manifestation, Fernmetastasen werden nur in seltenen Fällen nach Kraniotomie beschrieben.

Der Makroskopisch abgrenzbare Tumor breitet sich bevorzugt entlang von Markfaserbahnen aus (Salsbury 1975) und ist aufgrund seines mikroskopisch disseminierten Wachstums daher kaum vollständig resektabel.

Histologische Merkmale sind ausgeprägte Tumornekrosen, welche oft zur Abgrenzung von Grad III Astrozytomen dienen und gleichzeitig prognostische Relevanz haben (Barker et al. 1996) und meist als „pseudo-Palisaden“ imponieren. Desweiteren ist eine erhöhte Mitoseaktivität, Kernpolymorphie sowie pathologische

Angiogenese mit „glomeruloiden“ endothelialen Proliferaten oder abnormer Kaliberstärke der Gefäße typisch.

Die Histomorphologie erlaubt keinen Rückschluss auf die Genese eines Glioblastoms: Sowohl primäre als auch sekundäre, aus WHO II oder III Gliomen entstandene Glioblastome weisen ähnliche histomorphologische Charakteristika auf. Dennoch geht man davon aus, dass primäre Glioblastome einen Anteil von ca. 80% einnehmen (Dropcho et al. 1996).

4. Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen bilden eine Gruppe von Transmembranrezeptoren, welche alle einen ähnlichen Aufbau besitzen: Eine extrazelluläre Bindungsstelle für Liganden, eine Transmembran-Region und eine intrazelluläre Tyrosinkinase-aktive Domäne (Ullrich et al. 1990).

Typischerweise werden über Rezeptortyrosinkinasen verschiedene Wachstumssignale, wie z.B. Proliferation, anti-Apoptose oder Migration vermittelt.

Nach Ligandenbindung auf der extrazellulären Domäne erfolgt eine Dimerisierung mit anschließender, gegenseitiger Phosphorylierung beider Untereinheiten.

Der EGFR ist hierbei in der Lage mit allen ErbB-Rezeptoren Oligomere zu bilden, wobei ErbB2 den bevorzugten Bindungspartner darstellt. Bereits als Monomer weist der EGFR katalytische Aktivität auf, die vollständige Aktivierung wird jedoch erst nach Ligandenbindung und Dimerisierung erreicht. Als Folge der Phosphorylierung wird die intrinsische Kinaseaktivität der zytosolischen Rezeptordomänen angehoben.

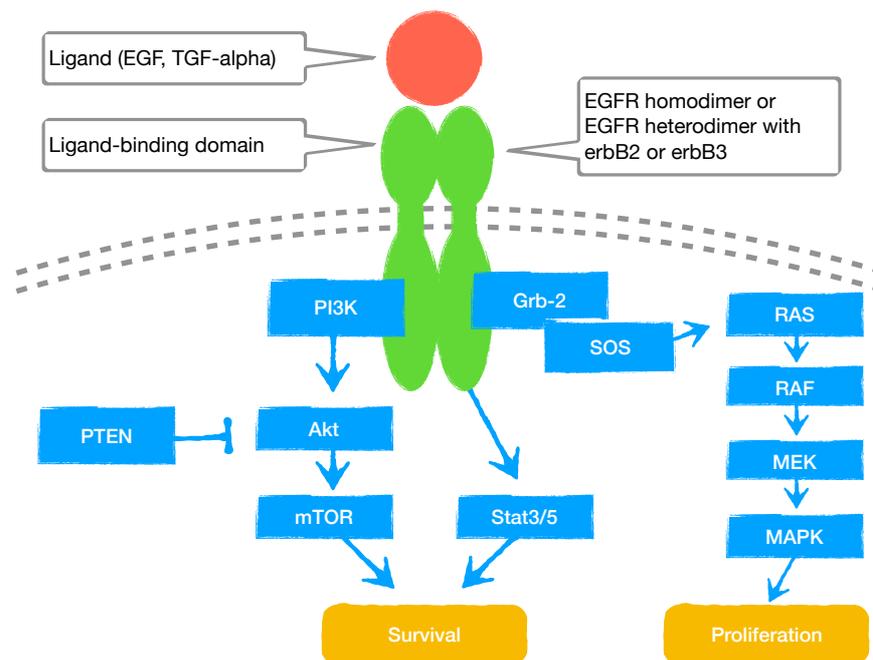


Abbildung 1: Schematische Darstellung der EGFR-Signaltransduktion (Iadanyi, 2008)

Dadurch können weitere Tyrosinreste des Rezeptordimers phosphoryliert werden und bilden dadurch sog. „Docking-sites“ für Signaltransduktionsproteine mit Src-homologen 2 (SH2) oder Phosphotyrosin Bindedomänen (PTB).

Über weitere, SH2 oder PTB-Domänen enthaltene Proteine, wird eine Plattform von Signalmolekülen rekrutiert, welche ihrerseits über Effektorproteine Signalkaskaden aktivieren kann. Bedeutende Signalwege sind hierbei der Phosphoinositol 3-Kinase/Akt (PI3K/Akt) und die mitogen-activated protein kinase (MAPK).

4.1 Der PI3K/Akt-Signalweg

Der Akt-Signalweg spielt bei der Zellzyklusregulation und Apoptose eine wichtige Rolle. Mittels direkter Regulation des Zellzyklus und der Transkriptionsmodulation fördert er Zellzyklusprogression und wirkt anti-apoptotisch.

Zentraler Bestandteil des PI3K/Akt Signalweges sind Phosphoinositol-3-Lipidkinasen (PI3K), die in drei Klassen unterteilt werden.

Bei der Klasse I ist eine Rezeptor-Tyrosinkinasen gekoppelte Aktivierung ebenso wie durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben. Die Signalübermittlung erfolgt

anschließend mittels Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), welches durch Phosphorylierung des 3-Hydroxyl-Restes von Inositol-Phospholipiden der Zellmembran entsteht (Katso et al. 2001). PI3K verfügen über eine regulatorische p85-Untereinheit und eine katalytische p110-Untereinheit (Ward et al. 2003).

Bei dem Rezeptortyrosinkinase (RTK) vermittelten Signalweg erfolgt nach Dimerisation und Phosphorylierung der intrazellulären Domäne eine Interaktion des p85-p110-Komplexes der PI3K mit der SH2-Domäne der RTK. Hierbei ist die p85 Einheit für die Interaktion verantwortlich und führt zu einer Rekrutierung der PI3K an den Rezeptor mit nachfolgender Aktivierung (Cantley 2002). Daraus resultiert eine p110-vermittelte PIP₃-Synthese mittels Phosphorylierung des membranständigen PIP₂.

An dieser Stelle setzt der negative Regulierungsmechanismus des Tumorsuppressors PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) an. Diese Lipidphosphatase ist in der Lage, PIP₃ zu PIP₂ zu dephosphorylieren, oder bereits die Bildung von PIP₃ zu unterbinden und damit die Aktivierung von Akt zu unterbinden. Die konstitutive Aktivierung von PI3K/Akt ist in zahlreichen Malignomen, darunter auch das Glioblastom, durch Funktionsverlust von PTEN vermittelt (Schlegel et al. 2000).

Proteine mit einer „pleckstrin homology“ (PH)-Domäne, wie die Serin/Threoninkinase Akt, werden mittels PIP₃ an die Zellmembran rekrutiert (Engelman et al. 2006). Eine Phosphorylierung am Serin 473 und Threonin 308 bewirkt die vollständige Aktivierung von Akt (Alessi et al. 1997). Nach dieser Aktivierung kann Akt durch weitere Downstream-Proteine Proliferation, Zellwachstum sowie anti-Apoptose regulieren (Vivanco et al. 2002).

4.2 Der MAPK-Signalweg

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind eine Gruppe von Serin-/Threoninkinasen, welche wichtig für die Steuerung von Embryogenese, Migration, Zelldifferenzierung, Proliferation und Zelltod und daher ebenfalls für die biologische onkologischer Entitäten bedeutsam sind.

Grundsätzlich werden 3 Subtypen von MAP-Kinasen unterschieden: ERK1/2 (extracellular signal-related kinases), p38 MAPK und SAPK/JNK (stress-activated /c-jun n-terminal proteinkinasen).

Wie bei der PI3K/Akt kann auch die MAPK über den EGFR aktiviert werden. Das Protein „growth factor receptor-bound protein 2“ (GRB2) verfügt über eine SH2 Domäne und zwei SH3-Domänen (Pawson et al. 1993), an die Phosphotyrosinreste des aktivierten EGF-Rezeptors binden können. Das Grb2-Protein kann vor allem durch die SH2-Domäne mit dem Phosphotyrosin-Rest 1068 des EGFR interagieren, die SH3-Domäne stellt die Verbindung zum „Son of Sevenless“-Protein (SOS) her (Chardin et al. 1995).

Das SOS-Protein ist in der Lage, einen GDP/GTP-Austausch im Ras-Protein zu katalysieren. Dieser Austausch am Ras-Protein führt es in den aktiven Zustand über (Rozakis-Adcock et al. 1993).

Das Ras kann wiederum die Serin/Threonin-Kinase Raf-1 in den aktiven Zustand überführen, welche weitere Serin/Threonin-Kinasen in Gang setzen kann. Über weitere Kinasen erfolgt zuletzt die Tyrosin- und Threoninphosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (Cobb et al. 1994). Diese sind in der Lage, in den Zellkern zu diffundieren (Adachi et al. 1999) und dort die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren zu katalysieren (Jorissen et al. 2003).

5. Tumorstammzellen

5.1 Tumorstammzell-Hypothese

Der Tumorstammzellhypothese zufolge (Park et al. 1971) sind nicht alle Tumorzellen im Stande, zu Proliferieren und Fernmetastasen zu bilden. Entsprechend der Hypothese sind dazu nur Tumorstammzellen in der Lage (Singh et al. 2004). Nach der Zellteilung können so entweder neue Tumorstammzellen entstehen, oder „reife“ Tumorzellen, welche keine Tendenz zur Selbsterneuerung zeigen und den Großteil der Tumormasse ausmachen. In hämatologischen Tumorzellen konnte dieses Konzept bereits gut nachvollzogen werden (Reya et al. 2001).

Entsprechend dieser Hypothese ist davon auszugehen, dass Rezidive bzw. disseminiertes Wachstum von Glioblastomen auf Tumorstammzellen zurückzuführen sind.

5.2 Stammzellmarker hirneigener Tumore

Aus diesem Grund ist bei der Betrachtung von Migrationskapazitäten in glialen Tumoren ein Fokus auf die Expression von Stammzellmarkern der behandelten Zellen durchaus zweckmäßig.

Bislang galt das Transmembran-Glykoprotein CD133 als zuverlässiger Stammzellmarker in Glioblastomen, zumal sich aus CD133-positiven glialen Tumorzellen neue, phänotypisch identische Tumormassen nachbilden ließen (Singh et al. 2004).

Das Glykoprotein CD133 scheint jedoch in der Aussagekraft als alleiniger Stammzellmarker eingeschränkt zu sein, da vermutlich nur bis zu 10 % aller Tumorstammzellen CD133 exprimieren (Ligon et al. 2007).

Des Weiteren wurden bereits CD133-negative Tumorzellen glialen Ursprungs beschrieben, welche trotz geringerem Proliferationsindex ebenfalls Stammzeleigenschaften besitzen (Beier et al. 2007).

Ein neuer Stammzellmarker für Glioblastome ist das Enzym Aldehyd-dehydrogenase 1 (ALDH1). Ursprünglich wurde das Stammzellpotential von ALDH1-positiven Zellen, assoziiert mit schlechter klinischer Prognose, bei Mammakarzinomen entdeckt (Ginestier et al. 2007).

Die Stammzellkapazität ALDH1-positiver Zellen konnte an Glioblastomen nachvollzogen werden (Rasper et al. 2010). Im Gegensatz zu CD133 ist ALDH1 ein Enzym des oxidativen Stoffwechsels. Daraus könnten sich weitere Unterschiede, verglichen mit Tumorzellen ohne Stammzeleigenschaften, in der milieuhängigen Tumorbiologie ergeben:

Lipidperoxidationsprodukte, wie unter anderem 4-HNE, sind Substrate der Aldehyd-dehydrogenase 1 (Zhang et al. 2010). Durch den 4-HNE Abbau in ALDH1-positiven Zellen glialer Tumore, wäre eine abweichende Substanzwirkung bis hin zur Resistenz denkbar.

In dieser Arbeit soll unter anderem untersucht werden, ob ALDH1 bei einer möglichen 4-HNE-induzierten Migration Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit hat.

6. Zellmigration

Zellmigration nimmt in vielen physiologischen als auch pathologischen Prozessen der Zellbiologie von Eukaryonten eine zentrale Stellung ein. Beispielsweise ist die Ontogenese des menschlichen Organismus ohne Migration undenkbar: Die Entwicklung der Keimblätter, des Nervensystems und der Keimbahnen werden erst durch selbige ermöglicht.

Ebenfalls ist Migration grundlegend für die Physiologie der Wundheilung (Krawczyk 1971) und gerichtete zelluläre Abwehr durch Chemotaxis von Bedeutung (Hurley 1963), (Gamow et al. 1971).

Die Invasion von Malignomen in gesundes Gewebe stellt auch einen Migrationsvorgang dar. Die Therapie von bösartigen Erkrankungen wird durch das invasive Wachstum der entarteten Zellen aus verschiedenen Gründen deutlich erschwert. Die Verbreitung von einzelnen Zellen abseits des ursprünglichen Zellverbandes erschwert die vollständige Resektion von Tumoren bzw. macht sie in Glioblastomen nahezu unmöglich (Brandes et al. 2008). Des Weiteren ist Migration ein wichtiger Schritt bei der Metastasierung, da die Lösung von Zellen aus dem Zellverband für eine Ausbreitung über Lymph- und Blutgefäße zwingend notwendig ist.

Als Ursache für die Migration sind unter anderem bisher die Lösung von Zelladhäsionsmolekülen wie Cadherin und Integrin charakterisiert.

Cadherine sind Transmembranproteine, die intrazellulär über Catenine mit Mikrofilamenten verbunden sind. Die extrazellulären Domänen der Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige Glykoproteine, können sich mit gegenüberliegenden Zellen verbinden und stellen so eine Zellverbindung her. In Glioblastomen ist der Subtyp N-Cadherin in Zusammenhang mit Zellmigration beschrieben (Kohutek et al. 2009), wobei der EGFR-Signalweg Einfluss auf die N-Cadherin-Dichte der Zellmembran zu haben scheint (Rappl, Piontek et al. 2008). Die Migrationsinduktion über den EGFR-Signalweg wurde bereits mehrfach beschrieben (Holsken et al. 2011). Diese kann auch durch eine Überexpression des EGF-Rezeptors positiv beeinflusst werden (Verbeek et al. 1998).

7. 4-Hydroxynonenal

7.1 Chemische Eigenschaften und Synthese

4-Hydroxynonenal (4-HNE) ist ein α,β -ungesättigter Aldehyd. Es wurde erstmals von H. Esterbauer beschrieben (Esterbauer et al. 1991).

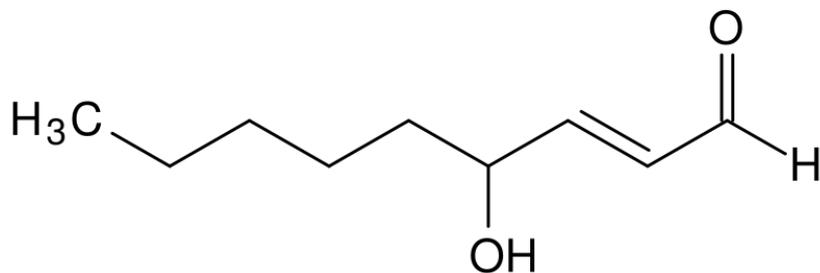


Abbildung 2: Molekularstruktur des 4-Hydroxynonenals nach Esterbauer (Esterbauer, Schaur et al. 1991)

4-HNE ist ein Produkt der Lipidperoxidation von omega-6 mehrfach ungesättigter Fettsäuren (omega-6-Polyenfettsäuren) (Esterbauer et al. 1982). Der Erstbeschreiber spricht sich über die Entstehung von 4-HNE an mikrosomalen Membranen wie folgt aus: 4-Hydroxynonenal entsteht im Zuge einer Lipidperoxidation aus Arachidonsäuren in Zell- und Mikrosomenmembranen, welche Bestandteil polarer Phospholipide sind (Esterbauer et al. 1986). Eine weitere Quelle für 4-Hydroxynonenal sind ebenfalls die im Blutserum befindlichen „low density lipoproteins“ (LDL) bzw. in bereits oxidierte Form oxLDL (Esterbauer et al. 1987). Pryor et al. verfolgen ebenfalls die Theorie, dass 4-HNE ausschließlich aus omega-6-Polyenfettsäuren entstehen kann. Dabei erwähnen sie zum einen die Synthesemöglichkeit aus 11-Hydroperoxyarachidonsäure oder 9-Hydroperoxylinolsäure, andere Substrate wären die jeweiligen Isomere 15-Hydroperoxyarachidonsäure bzw. 13-hydroperoxylinolsäure (Pryor et al. 1990). Der Mechanismus der Entstehung ist dabei eine Kettenreaktion, welche durch freie Radikale initiiert werden kann. Polyenfettsäuren sind durch ihre Fähigkeit zur Mesomerie, also der Bildung von delokalisierten Elektronenaufenthaltsbereichen, bevorzugte Stoffe für die Radikal-getriggerte Abspaltung von Wasserstoffatomen.

Durch weitere Oxidation entstehen aus den Polyenfettsäuren Hydroperoxide, welche wiederum anderen Polyenfettsäuren mit ihrer freien Radikalgruppe Wasserstoffatome entreißen können. Auf diese Weise wird die Kettenreaktion in Gang gehalten.

4-Hydroxynonenal kann daher überall im Körper, wo das Milieu die Bildung von freien Radikalen ermöglicht oder gar begünstigt, entstehen.

Es sind verschiedene Möglichkeiten der Detoxifikation von 4-Hydroxynonenal beschrieben. Zum einen ist es die Metabolisierung über Aldehyddehydrogenasen (ALDH) und Alkoholdehydrogenasen (ADH) zu den reduzierten bzw. oxidierten Metaboliten 4-Hydroxy-2-nonenolsäure und 1,4-dihydroxy-2-nonen.

Eine weitere Möglichkeit der Elimination besteht in der Glutathion-S-Transferase vermittelten Konjugation zu 4-HNE-GSH. Daneben sind weitere, bisher nicht bekannte Eliminationswege denkbar (Hartley et al. 1995).

Je nach Zelltyp und Gewebe kommt den einzelnen Mechanismen unterschiedliche Bedeutung zu, wobei in der Leber die GSH-Konjugation dominiert.

7.2 Biologische Wirkungen

4-Hydroxynonenal kann auf vielfältige Weise in den Zellmetabolismus eingreifen. Dabei werden sowohl physiologisch-regulative Funktionen in Konzentrationen bis 0,1 μM , als auch die Mediation von oxidativem Stress bei Konzentrationen von 1 μM bis 20 μM beschrieben (Esterbauer et al. 1991).

Unter physiologischen Bedingungen sind bisher die Induktion von Chemotaxis in neutrophilen Granulozyten (Curzio et al. 1986), Aktivierung der Adenylatcyclase, Phospholipase C und Guanylatcyclase (Esterbauer et al. 1991) (Rossi et al. 1990) bekannt.

Desweiteren wurde auch über die proliferative Wirkung des 4-HNE bei physiologischen Konzentrationen bis 10 μM berichtet (Zarkovic et al. 1993; Ramana et al. 2006).

Allerdings kann 4-HNE auch in physiologischen Konzentrationen Stammzellendifferenzierung und Wachstumshemmung vermitteln (Barrera et al. 1991), wobei mit ansteigender Dosis zunehmend mit wachstumsinhibierender und apoptotischer Wirkung zu rechnen ist (Liu et al. 1999; Cheng et al. 2001). Biochemisch scheint das 4-HNE über eine Vielzahl von Signalwegen als „second toxic messenger“ (Esterbauer et al. 1991) in den Zellstoffwechsel einzugreifen.

Im Folgenden soll die für diese Arbeit relevante Modulation des EGFR-Signalings weiter beschrieben werden.

Erstmals wurde das Modell einer alternativen Aktivierung des EGF-Rezeptors durch Metaboliten der Lipidperoxidation 1998 beschrieben. Dabei konnte man eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors mittels oxLDL und 4-HNE zeigen. Dabei bindet 4-HNE an freie Amino-Gruppen der extrazellulären Domäne des EGFR und bewirkt dadurch eine Derivatisierung, welche eine Erhöhung der intrinsischen Kinaseaktivität mit nachfolgender Aktivierung zufolge hat (Suc et al. 1998). Eine suffiziente Rezeptoraktivierung wurde bis dahin lediglich mit SH2-Phosphotyrosin-Konjugaten nachgewiesen.

Eine Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase EGFR konnten Liu et al. 1999 durch Nachweis von 4-HNE-EGFR Addukten und einer Phosphorylierung des EGF-Rezeptors nach 4-HNE Inkubation in der A431 Zelllinie bestätigen. Erstmals konnte auch eine 4-HNE induzierte Kinaseaktivität im Downstream durch phosphorylierte ERK1/ERK2 und phospho-JNK/SAPK nachgewiesen werden.

Sämtliche 4-HNE vermittelten Effekte ließen sich hierbei durch den direkten EGFR-Inhibitor AG1478 suffizient aufheben (Liu et al. 1999). Im Rahmen der Untersuchung von EGFR-vermittelten proliferativen Effekten des 4-HNE zeigte sich eine Wachstumsinhibierende Wirkung bei HNE Konzentrationen von 20µM. Bei ebenfalls erfolgreicher Aufhebung der 4-HNE-vermittelten Wachstumsinhibition durch eine EGFR-Blockade wurde schlussfolgernd die EGFR-vermittelte Wachstumsinhibition durch 4-HNE postuliert (Liu et al. 1999). Hierzu sollte jedoch bemerkt werden, dass der üblicherweise mittels PI3K/Akt und MAPK proliferativ und anti-apoptotisch wirkende epidermale Wachstumsfaktor in A431-Zellen einen paradoxen Effekt haben kann: In mehreren Arbeiten konnte eine EGF-getriggerte Wachstumsinhibition in A431 Zellen erzielt werden (Gill and Lazar 1981), (Bravo, Burckhardt et al. 1985).

Zusammenfassend kann also von einer Downstream-wirksamen EGFR-Aktivierung mittels 4-HNE ausgegangen werden, die 4-HNE-getriggerte Wachstumsinhibition könnte jedoch abseits der A431 Zelllinie über andere Signalwege vermittelt werden.

Die EGFR-Aktivierung von 4-HNE konnte bisher mehrfach gezeigt werden, die charakterisierten übergeordneten zellulären Reaktionen beschränken sich bislang auf die Wachstumsinhibition (Liu, Akhand et al. 1999) sowie die Chemotaxis in

Granulozyten (Moldovan et al. 1994) und Polymorphonukleozyten der Ratte (Curzio et al. 1982).

8. Zielsetzung

Die EGFR-Amplifikation in über 40% der primären Glioblastome (Schlegel et al. 1994) mit nicht zufrieden stellenden Ergebnissen der therapeutischen, singulären Antagonisierung (Brown et al. 2008) gibt Anlass zur Evaluation der direkten EGFR-vermittelten Effekte. In Zusammenhang mit dem bevorzugten Partner der Heterodimerisierung ErbB2 konnte eine Induktion der Migration glialer Zellen gezeigt werden (Rappl et al. 2008).

Im Zuge der Entwicklung neuer Therapiekonzepte und Prognosefaktoren gerät der Metabolismus glialer Tumore zunehmend in den Mittelpunkt. In Glioblastomen wird ein vielfach erhöhter Glucosemetabolismus beschrieben (Oudard et al. 1996; Gorin et al. 2004). Darüber hinaus spielt in Glioblastomen – ebenso wie in zahlreichen anderen malignen Entitäten – die Hypoxie und der damit einhergehende oxidative Stress eine große Rolle.

Oxidativer Stress ist verantwortlich für die Entstehung einer Vielzahl von Metaboliten wie oxLDL und 4-HNE (Esterbauer et al. 1986), welche ihrerseits über bedeutende Signalwege wie z.B. den EGFR zelluläre Reaktionen bewirken können.

Der Nachweis EGFR-vermittelter Migration durch 4-HNE könnte diesen Signalweg als Reaktionsmöglichkeit auf verschiedene Stoffwechselsituationen in Glioblastomen identifizieren und zur Charakterisierung des milieuhängigen Verhaltens von glialen Tumorzellen beitragen.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte von 4-HNE auf die Rezeptortyrosinkinase-Aktivität des EGFR in Gliomen nachvollzogen werden.

Des Weiteren sollte die Fähigkeit einer Migrationsinduktion durch 4-HNE-Stimulation des EGF-Rezeptors untersucht und spezifiziert werden.

4-Hydroxynonenal wird mitunter durch den Tumor-Stammzellmarker ALDH1 metabolisiert. Falls ein Zusammenhang zwischen den Effekten von 4-Hydroxynonenal und ALDH1 besteht, ließe sich daraus ein Modell der alterierten Reaktion und Resistenz von Stammzellen auf oxidativen Stress ableiten.

Daher sollte in dieser Arbeit ebenfalls ein modulierender Einfluss des metabolisch aktiven ALDH1 auf eine mögliche, 4-HNE-initiierte EGFR-Phosphorylierung und Zellmigration geprüft werden.

B. Material und Methoden

1. Material

1.1 Laborausstattung

Brutschrank	Memmert, Schwabach
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, München
Gelkammern	Biorad, München
Genetic Analyzer 3130	Applied Biosystems, Weiterstadt
Magnetrührer/Heizplatte	IKA-Labortechnik, Staufen
Minishaker MS1	IKA-Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge 5471R	Eppendorf, Hamburg
Orbital Shaker IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik Staufen
Röntgenfilm-Entwicklungsgerät	Konica Minolta, Unterföhring
Semidry Blotapparatur	Biorad, München
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus, München
Thermocycler AB 2720	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
UV/Vis Spektrophotometer DU®530	Beckmann, München
Waagen	Sartorius, Göttingen
Zeiss Axiovert 135 Konfokales Mikroskop	Carl Zeiss, Jena

1.2 Verbrauchsmaterial

Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen
Deckgläser	Schubert und Weiss, München
Hyperfilm™ ECL™	GE Healthcare, München
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten 96-Well	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
PVDF Membran 0,45µm	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Pipetten und Pipetten (10µl-1000µl)	Sarsted, Nümbrecht
Western Blot Papier	Sartorius, Göttingen
Zellkulturplatten, 6-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

1.3 Chemikalien, Reagenzien

4-Hydroxynonenal	Merck Biosciences, Darmstadt
Bis-/Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Biorad Protein Assay	Biorad, München
BSA Proteinstandard	Biorad, München
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Isopropanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck Biosciences, Darmstadt
Methanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure 2M	Roth, Karlsruhe
SDS 20%	Roth, Karlsruhe
TBE Puffer 10fach	Biorad, München
TEMED	Biorad, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe

1.4 Lösungen und Puffer

Blockierungspuffer	5% Magermilchpulver, TBST
--------------------	---------------------------

5x SDS Protein-Puffer	312,5 mM Tris-Cl pH 6,8; 10% SDS; 50% Glycerol; 250 mM DTT; 0,05% Bromphenol-Blau; ad 10 ml H ₂ O
10x SDS Proteingel-Puffer	250 mM Tris; 1% SDS; 1,92 M Glycin; ad 1000 ml H ₂ O
10x TBS Puffer	24,2 g Tris, 80 g NaCl, pH 7,6 mit Essigsäure einstellen; ad 1000 ml H ₂ O
TE-Puffer	1 ml Tris HCl (pH 8,0); 200 µl 0,5 M EDTA; ad 1000 ml H ₂ O
TBST Waschpuffer	1x TBS Puffer; 0,1% Tween 20
Transferpuffer (Anode I)	300 mM Tris, 20% Methanol, ad 500 ml H ₂ O
Transferpuffer (Anode II)	25 mM Tris, 20% Methanol, ad 500 ml H ₂ O
Transferpuffer (Kathode)	25 mM Tris, 20% Methanol, 40 mM amino-n-caprioic acid; ad 400 ml H ₂ O
Tris-Puffer pH 7,6	60,5 g Tris-Base, 90 NaCl, pH 7,6 mit HCl einstellen ad 1000 ml H ₂ O

1.5 Zellkultur-Reagenzien und Medien

Accutase	PAA Pasching / Österreich
EGF (human, rekombinant)	Millipore, Schwalbach
Dulbecco's MEM mit Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's PBS	PAA Pasching / Österreich
FCS	Biochrom, Berlin
Glioblastom-Zelllinien	Dr. E. Van Meir, Lausanne / Schweiz
Mitomycin C	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Tyrphostin AG 1478	Sigma, Deisenhofen
Zell-Lysepuffer	New England Biolabs, Frankfurt

1.6 Kommerzielle Kits

REAL Detection System Peroxidase	Dako, Hamburg
----------------------------------	---------------

ECL Western Blot Reagenzien	Millipore, Schwalbach
Molekulargewichtsmarker Page Ruler™	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

1.6 Antikörper

Antikörper	Spezies	Katalognummer	Firma
Akt	Kaninchen	#9272	NEB, Frankfurt
pAkt	Kaninchen	#9271	NEB, Frankfurt
EGFR	Kaninchen	Sc-03	Santa Cruz, USA
pEGFR	Kaninchen	#36-9700	Invitrogen, Karlsruhe
erbB2	Kaninchen	#A 0485	Dako, Hamburg
perbB2	Kaninchen	#2244	NEB, Frankfurt
Alpha-Tubulin	Maus	T 9026	Sigma, Deisenhofen
Maus IgG, HRP-gekoppelt	Ziege	#7076	NEB, Frankfurt
Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Ziege	#7074	NEB, Frankfurt
p44/42 MAPK	Kaninchen	#9102	NEB, Frankfurt
Phospho-MAPK (p44/42)		#9101S	NEB, Frankfurt
Phospho-SAPK/JNK	Kaninchen	#4668S	NEB, Frankfurt
SAPK/JNK	Kaninchen	#9252	NEB, Frankfurt

2. Zellkultur

2.1 Kultivierung von Glioblastom-Zelllinien

Es wurden die etablierten Glioblastom-Zelllinien LN18, LN229, LN2308, und G139 kultiviert. Des Weiteren wurde eine durch shRNA transfizierte LN18 Zelllinie als ALDH1-Knockdown-Variante verwendet. Die Transfektion der Zelllinien war nicht Gegenstand dieser Arbeit, die transfizierten Zellen wurden durch die Arbeitsgruppe Prof. Schlegel zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden bei 95% relativer Luftfeuchte, 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert.

Als Medium wurde Dulbecco's DMEM Vollmedium (DMEM, 1% Vol. Penicillin/Streptomycin, 1% Vol. L-Glutamin, 10% Vol. fetales Kälberserum) in Kulturschalen von 10 cm Durchmesser verwendet. Alle 3 Tage erfolgte die Passage, wobei das Medium unter sterilen Bedingungen abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS (Temperatur 37°C; Phosphatgepufferte Salzlösung, 137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Gesamtphosphat) gewaschen und mit 1ml AccutaseTM (37°) nach 5 Minuten Inkubation abgelöst wurde. Ein Teil der abgelösten Zellen wurde in neue Zellkulturschalen überführt und mit neuem DMEM-Vollmedium bis zur folgenden Passage inkubiert.

Zur Stabilisation der shRNA-Transfektion in den ALDH1-Knockdown LN18 Zelllinien wurde Puromycin (5µg/ml Medium) beigesetzt. Über die Transfektion erworbene Puromycin-Resistenz der ALDH1-Knockdowns konnte so eine Selektion erfolgen.

2.2 Gewinnung von Proteinlysaten aus kultivierten Zellen

Abhängig von der Fragestellung wurden die Zellen in Vollmedium bzw. serumfreiem Medium vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit verschiedenen Wirkstoffen (siehe Tabelle 2).

Nach erfolgreicher Vorbehandlung der Zellen wurden diese mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Unmittelbar darauf wurde 200µl Zell-Lysepuffer (kommerziell erwerbbar, mit 1mM PMSF als Proteaseinhibitor sowie PhosstopTM als Phosphataseinhibitor) beigesetzt. Nach Abschaben der Zellen mittels eines Plastikschabers wurden die Proteinlysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 15 min. auf Eis inkubiert. Nach

anschließender Zentrifugation bei 10 000 U/min für 15 min. wurde die Proteinfraktion im Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt, die nicht lösliche Fraktion im Sediment verworfen.

Substanz	Konzentration	Zielmolekül
EGF	100 ng/ml	EGFR
AG1478	10 μ M	EGFR
4-Hydroxynonenal	1-500 μ M	
EtOH	0,1-0,8 % Vol.	

Tabelle 1: Substanzen, welche in der Zellkultur für experimentelle Zwecke verwendet wurden

3. Proteinanalyse

3.1 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgt über eine Anfärbung mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G250 (CBBG), welcher in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Nach Proteinkomplexierung hat der Farbstoff ein Absorptionsmaximum von 595 nm, welches photometrisch erfasst werden kann.

Die Proteinlysate werden mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt und anschließend mit 0,01 % Triton X-100 und Bradford-Reagenz (Fa. Biorad, 1:4 mit PBS verdünnt) in einer Küvette vermischt und für 5 min. inkubiert. Die anschließende Messung mittels Spektralphotometer erfolgt bei 595 nm. Anschließend kann die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Kalibrationskurve, die parallel mit BSA-Proteinstandards angefertigt wurde, ermittelt werden.

Substanz	Volumen pro Küvette
Proteinlysat 1:10	20 μ l
PBS	180 μ l
Triton X-100, 0,01 %	200 μ l
Bradford-Reagenz 1:4	600 μ l

Tabelle 2: Zusammensetzung des Bradford-Ansatzes

3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen. Bei der SDS-PAGE wird als Trennmedium ein Gel auf Polyacrylamidbasis verwendet. Bei der Probenvorbereitung wird den Proteinlysaten Natriumduodecylsulfat (SDS) beigelegt, welches als anionisches Tensid Eigenladungen der Proteine überdecken kann. Die Proben werden auf 95° über 5 Minuten erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch die Eröffnung von Wasserstoffbrücken aufzubrechen. Dadurch erlangen alle Proteine eine ähnliche, ellipsoide Form und anionische Aufladung. Dies ist für eine systematische Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erforderlich.

Für die Elektrophorese wurde das diskontinuierliche System verwendet, bei dem das Trenngel (10%, pH 8.8) mit einem Sammelgel (5 %, pH 6.8) überschichtet wird. Das Trenngel wird nach vertikalem Aufgießen zwischen zwei Glasplatten mit H₂O überschichtet. Nach 45 Minuten Polymerisation wurde das Sammelgel aufgegossen und die Glaskammer mit einem Probenkamm verschlossen.

Die mit Ladepuffer vermischten Proteinlysate wurden mit gleichen Gesamtproteinmengen von 5-15 μ g in die Probetaschen verteilt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 110 V für 60-130 Minuten.

Substanz	5 % Sammelgel	10 % Trenngel
30 % Acrylamid	836 μ l	1,33 ml
1 M Tris/HCl pH 6,8	626 μ l	-
1 M Tris/HCl pH 8,8	-	1 ml
H ₂ O bidest.	3,5 ml	1,66 ml
20 % SDS	25 μ l	25 μ l
10 % APS	25 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l

Tabelle 3: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE

3.3 Western Blot Analyse

Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Semi-dry Blot elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wird ein Stapel zwischen zwei Elektrodenplatten gelegt. Diese Stapel bestehen aus mehreren Lagen Whatman-Papier, welche jeweils in Kathoden- bzw. Anodenpuffer getränkt wurden. Zwischen den puffergetränkten Papierschichten liegt die PVDF-Membran mit anliegendem Elektrophoresegel. Die Proteine wurden von dem Gel auf die PVDF-Membran bei konstanter Stromstärke von 225 mA für 60-180 Minuten (je nach Molekulargewicht des gesuchten Proteins) übertragen. Freie Proteinbindungsstellen an der Membran wurden anschließend durch 1 Stunde Inkubation in TTBS mit 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur geblockt. Primärantikörper wurden entsprechend der vorgegebenen Konzentrationen in TTBS und teilweise unter Zugabe von 5% Magermilchpulver verdünnt. Nach Inkubation der Membran mit der primären Antikörperlösung bei 4°C über Nacht wurde die Membran 3x7 min. in TTBS gewaschen und mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern in TTBS mit 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschvorgang (s.o.) und darauf folgend die Inkubation der Membran in ECL-Lösung. Die dabei entstehende Lichtreaktion wurde über einen Röntgenfilm aufgezeichnet.

4. Zellbiologische Assays

4.1 Zellvitalitätsbestimmung mittels MTT-Assay

Die Bestimmung der Vitalität von Zellen beruht auf der Fähigkeit einer biologisch aktiven Zelle, ein Chromophor durch die mitochondriale Dehydrogenase zu einem wasserunlöslichen Formazanfarbstoff zu reduzieren. Es besteht daher eine Korrelation zwischen der Farbintensität und metabolischer Aktivität der untersuchten Zellen. Dies erlaubt Rückschlüsse auf deren Vitalität zu Beginn des MTT-Assays.

Für den Ansatz wurden je 6000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und unter Zugabe von EGF, HNE, DMSO bzw. AG1478 in DMEM-Vollmedium inkubiert.

Je nach Versuchsdauer wurden nach 2-5 Tagen die MTT-Reagenzien des MTT-Kits der Fa. Roche den Wells beigefügt. Dabei wurde zunächst 10µl MTT-Reagenz und nach 4-6 Stunden bei 37°C Inkubation 100µl DMSO/Ethanol (1:2) in die Wells pipettiert. Im Anschluss wurde die Zellvitalität photometrisch über den ELISA Reader Multiscan Ascent bei 595 nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 620 nm) ermittelt. Die Zellvitalität wurde prozentual in Relation zur Kontrollgruppe aus den Extinktionswerten berechnet.

4.2 Evaluation der Migration mittels Wound-healing Assay

Das Wound-healing Assay ist eine der ältesten Methoden zur Untersuchung von Zellmigration. Diese Methode imitiert die Zellmigration während der Wundheilung. Die Grundschritte bestehen aus dem Anfertigen einer artifiziellen Wunde unter Zellkultur-Bedingungen innerhalb eines zellulären Monolayers und anschließender Dokumentation des migrationsbedingten Verschlusses.

Dabei wurden in 6-Well-Platten jeweils 4×10^5 Zellen pro Well nach vorheriger Zählung in je 2 ml DMEM Vollmedium kultiviert, bis eine Konfluenz des Monolayers von 70 % erreicht wurde. Dabei wurden jeweils 4 Wells identisch behandelt, was eine Summe von 40 Einzelmessungen pro Subgruppe ergibt. Bei Versuchsansätzen mit shRNA-transfizierten LN18-Klonen wurde dem Medium Puromycin (5µg/ml Medium) zur Sicherung der shRNA-transfizierten, Puromycin-resistenten Klone hinzugefügt.

Um eine Überdeckung des Migrationseffektes durch unerwünschte zelluläre Proliferation zu unterbinden, enthielt das Medium zusätzlich 5 µg/ml Mitomycin.

Es wurde in jedem Well mittels p200 Pipettenspitze der Zellrasen aufgekratzt (Scratch). Entlang des Scratches wurden vorher 10 verschiedene Stellen pro Well auf der Unterseite der Zellkulturplatte angezeichnet. Diese dienen als Markierung für die standardisierten Messungen der Scratch-Breite. Bei Ansätzen, welche eine Antagonisierung des EGF-Rezeptors mit AG1478 vorsahen, wurde das Agens 1h vor Aufkratzen beigemischt. Nach erfolgtem Scratch wurden die Zellen mindestens 3 mal mit PBS bei 37°C gewaschen, um die entstandenen Zellreste zu entfernen. Das anschließend erneuerte Medium enthielt wieder die gleichen Zusätze wie zu Beginn. Als letzter Schritt wurden die Zellen unmittelbar nach dem Scratch mit den Substanzen EGF, 4-Hydroxynonenal und als Kontrollen Ethanol und DMSO inkubiert. Ein Austausch sämtlicher Substanzen, einschließlich des Medium, wurde alle 12 Stunden durchgeführt.

Der Wundschluss als Indikator für Migration wurde sofort im Anschluss sowie nach 12, 24 und ggf. 36 Stunden mittels eines Zeiss Axiovert 135 und Digitalkamera dokumentiert. Als Maß für die Migration wurde mit der Software Axiovision an den fotografierten Stellen der Scratch ausgemessen.

5. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte über das Programm „Graphad Prism“.

Zunächst wurde überprüft, ob den jeweiligen Proben die Gaußsche Normalverteilung zugrunde liegt. Bei vorliegender Normalverteilung wurden einzelne Gruppen mittels Student's T-Test überprüft. Bei fehlender Normalverteilung erfolgte die statistische Prüfung mittels Mann-Whitney-U-Test.

Wenn innerhalb eines Datensatzes mehrere Gruppen verglichen wurden, wurde die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen angewendet, um das durch mehrfaches Testen steigende Risiko falsch positiver Ergebnisse auszugleichen.

Als globales Signifikanzniveau wurde ein P-Wert < 0,05 gewählt.

C. Ergebnisse

1. Einfluss von HNE auf die Zellproliferation

4-Hydroxynonenal scheint über zahlreiche Mechanismen Einfluss auf die Zellproliferation zu haben. Konzentrationsabhängig wurde sowohl von proliferativen (Zarkovic et al. 1993) als auch wachstumshemmenden Effekten berichtet: In B16-F10 Melanomzellen wurde eine wirksame Inhibition ab 50 μM 4-HNE nachgewiesen (Zarkovic et al. 1995). Ähnliches konnte auch bei A431 Zellen gezeigt werden (Liu et al. 1999), wobei hier die Wachstumsinhibition unter EGFR-Blockade aufgehoben werden konnte. Daher ging man von einer EGFR-vermittelten Wachstumsinhibition des 4-HNE aus. Ähnliche Effekte wurden bei glialen Tumorzelllinien bisher nicht publiziert und werden im Folgenden dargestellt.

Für die Ermittlung der Einflüsse von 4-HNE auf die Proliferation von Glioblastomen wurde ein MTT-Proliferationsassay auf 96-Well-Plates ausgeführt. Als etablierte Zelllinie wurden LN229-Zellen mit 4-HNE behandelt und der Proliferationsstatus anschließend entsprechend dem Protokoll ausgewertet. Für jede der unten tabellarisch aufgeführten 4-HNE-Konzentrationen wurden parallel 4 Ansätze ausgeführt und daraus das arithmetische Mittel der Extinktionswerte bestimmt.

Abkürzung der Versuchsreihe	HNE-Konzentrationen
0	0,3 % Ethanol
1	1 μM 4-HNE in Ethanol
5	5 μM 4-HNE in Ethanol
10	10 μM 4-HNE in Ethanol
20	20 μM 4-HNE in Ethanol
50	50 μM 4-HNE in Ethanol
100	100 μM 4-HNE in Ethanol

Tabelle 4: HNE-Konzentrationen der einzelnen Proben

Die einzelnen Proben wurden jeweils 4 Mal für 12 Stunden mit den oben genannten 4-HNE-Konzentrationen bzw. Ethanol als Kontrolle inkubiert.

Die statistische Auswertung zeigte eine signifikante Wachstumsinhibition ($p < 0,001$) der LN229 Zellen in Abhängigkeit der applizierten 4-HNE-Konzentration. Im Bereich von 0-20 μM 4-HNE konnte kein Einfluss auf die Zellproliferation gezeigt werden. Der wachstumsinhibierende Effekt von 4-Hydroxynonenal setzt im Experiment ab 50 μM Konzentration ein.

Der im Vergleich zu 50 μM geringere Mittelwert der Extinktion bei 100 μM -Proben ließ sich statistisch nicht bestätigen ($p < 0,001$). Ebenso war eine durch die Extinktion der 20 μM -Probe suggerierte Proliferation - verglichen mit der Kontrollgruppe - nicht signifikant.

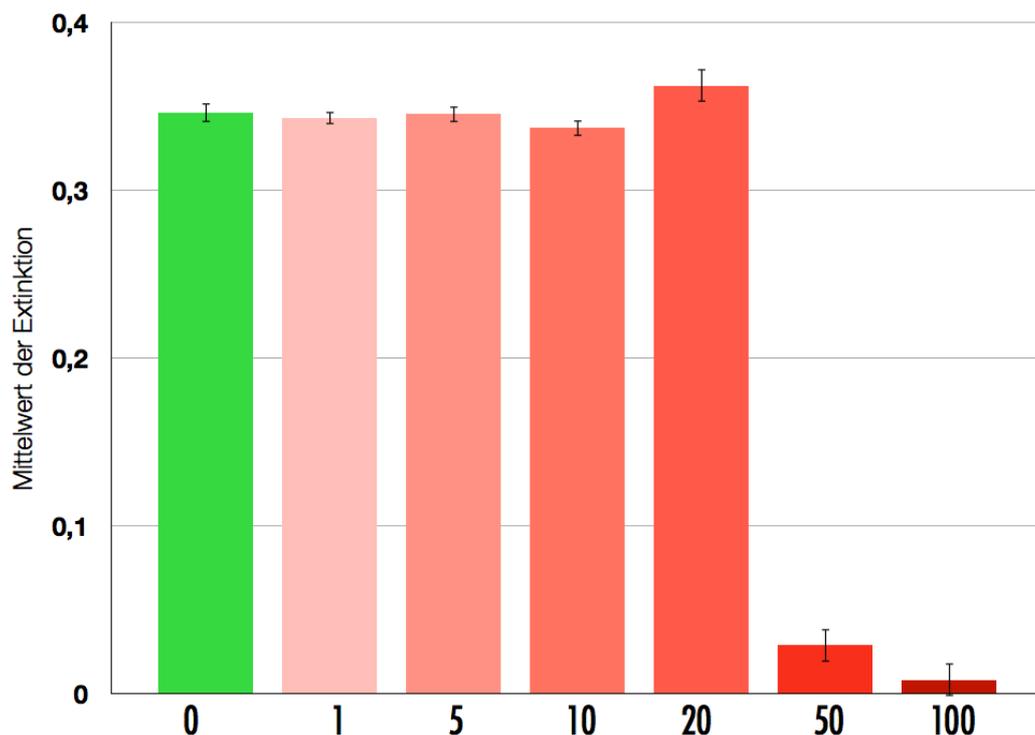


Diagramm 1: Mittelwert der Extinktion als Ausdruck für Proliferation in LN229 Zellen; die Werte der Abszisse sind aufsteigende Konzentrationen von 4-HNE in μM . Die Fehlerbalken zeigen das 99% Konfidenzintervall.

Der Einfluss des EGF-Rezeptors auf die gezeigte Wachstumsinhibition erfolgte durch Proliferationsassays mit zusätzlicher Inhibitorbehandlung. Als EGFR-Antagonist wurde Tyrphostin AG1478 verwendet. Die suffiziente Abwendung einer 4-HNE-

vermittelten Wachstumsinhibition durch Tyrphostin AG1478 könnte so einen Einfluss auf den beschriebenen Effekt aufzeigen.

Die Versuchsbedingungen entsprachen dem vorausgegangenen Versuch, zusätzlich wurden die Zellen neben der 4-HNE Inkubation jeweils 1 Stunde vor Zugabe des 4-HNE mit Tyrphostin AG1478 in 2 μM Konzentration behandelt.

Abkürzung der Versuchsreihe	HNE-Konzentrationen
ctrl	0,3 % Vol. Ethanol + 0,3 % Vol. DMSO
ag	0,3 % Vol. Ethanol + 7 μM AG 1478
1	1 μM 4-HNE in Ethanol + 7 μM AG1478
5	5 μM 4-HNE in Ethanol + 7 μM AG 1478
10	10 μM 4-HNE in Ethanol + 7 μM AG 1478
20	20 μM 4-HNE in Ethanol + 7 μM AG 1478
50	50 μM 4-HNE in Ethanol + 7 μM AG 1478
100	100 μM 4-HNE in Ethanol + 7 μM AG 1478

Tabelle 5: Aufschlüsselung der Abkürzungen aus Diagramm 2

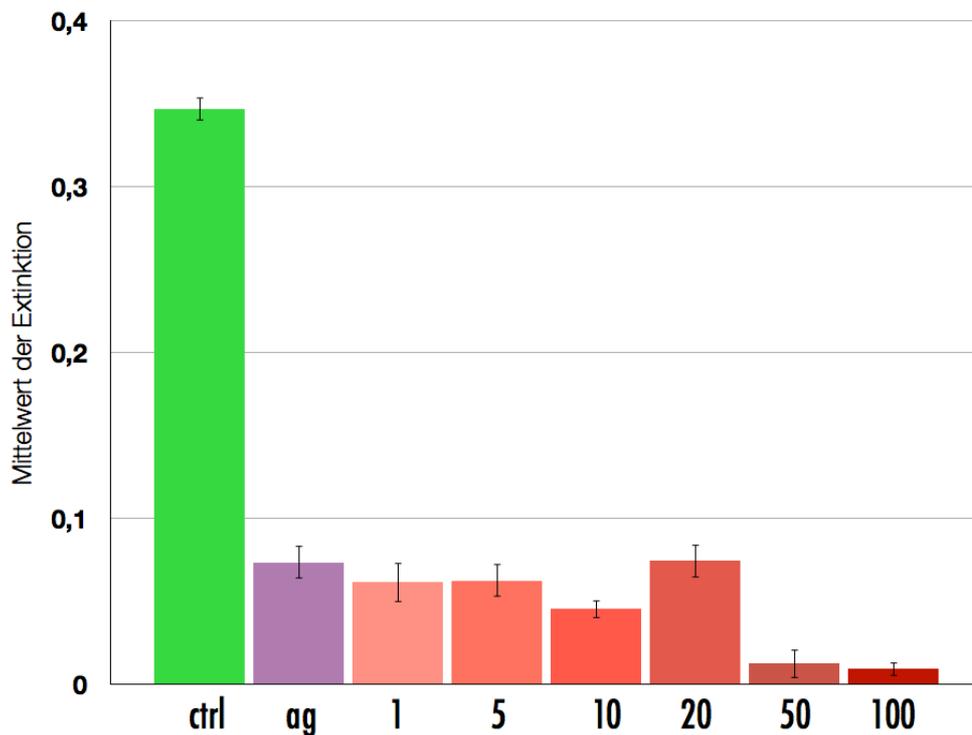


Diagramm 2: Mittelwert der Extinktion als Proliferationsindikator in LN 229 Zellen; Auf der Abszisse sind die jeweiligen 4-HNE Konzentrationen in μM dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen das 99% Konfidenzintervall.

Die arithmetischen Mittel der Extinktionen ergaben einen signifikanten Wachstumsinhibierenden Einfluss von AG 1478 ($p < 0,001$). Die im vorausgehenden Experiment gezeigte, 4-HNE-vermittelte antiproliferative Wirkung wurde durch Tyrphostin AG 1478 nicht verändert: Weiterhin bestand ein signifikanter Proliferationsabfall ab 4-HNE-Konzentrationen von 50 μM . Im Konzentrationsbereich 1-20 μM bestand zudem bei den AG-1478-behandelten Zellen eine signifikant geringere Proliferation als in den ausschließlich mit 4-HNE inkubierten Gruppen. Dies suggeriert eine additive, Wachstum inhibierende Wirkung von AG 1478.

2. Einfluss von 4-Hydroxynonenal auf die Rezeptortyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors

Die Aktivierung des EGFR durch 4-Hydroxynonenal mit anschließender Phosphorylierung von Downstream-Proteinen wie Erk1/Erk2 und MAPK konnte bereits in der Humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie A431 nachgewiesen werden (Liu et al. 1999; Vatsyayan et al. 2011; Uno et al. 2011). 4-HNE vermittelte Effekte in Glioblastomen wurden bisher nicht charakterisiert.

Dieser Versuchsansatz wurde zunächst ebenfalls an LN229 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden in 6 cm Zellkulturplatten in Vollmedium bis zu 80 % Konfluenz in DMEM Vollmedium mit 10% fetalem Kälberserum inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel auf serumfreies DMEM für 24 Stunden. Für die Untersuchung der Rezeptortyrosinkinase-Aktivität wurden die Zellen mit 4-Hydroxynonenal (in Ethanol gelöst) in verschiedenen Konzentrationen behandelt (siehe Tabelle). Einige Proben wurden mit dem EGFR-Antagonisten Tyrphostin AG 1478 in 10 μ M Konzentration vorbehandelt. Bei zielgerichteter EGFR-Aktivierung durch 4-HNE könnte damit die Tyrosinkinaseaktivität am EGFR und die Phosphorylierung an den Downstream-Proteinen suffizient antagonisiert werden.

Unmittelbar nach entsprechenden Inkubationszeiten mit oben genannten Substanzen wurden die Zellen lysiert und die Proteinphosphorylierung als Zeichen der Signalkaskaden-Aktivität mittels Western Blot analysiert.

C. Ergebnisse 2. Einfluss von 4-Hydroxynonenal auf die Rezeptortyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors

Abkürzung der Proben	HNE-Konzentrationen	Inkubationszeit	EGFR-Antagonisierung
10 μ M HNE 10 min	10 μ M	15 min	-
10 μ M HNE 30 min	10 μ M	30 min	-
100 μ M HNE 5 min	100 μ M	5 min	-
100 μ M HNE 15 min	100 μ M	15 min	-
100 μ M HNE 30 min	100 μ M	30 min	-
100 μ M HNE 15 min + AG 1478	10 μ M	15 min	10 μ M AG 1478
unbehandelt	-	-	-

Tabelle 6: 4-HNE Konzentrationen, Inkubationszeiten und Antagonisierung des EGFR mit AG 1478

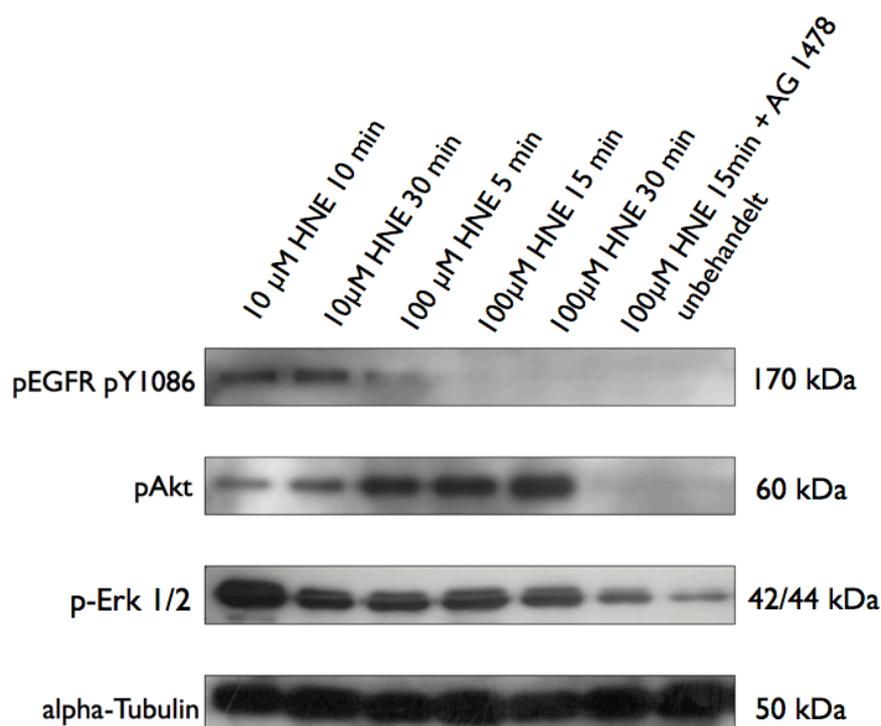


Abbildung 3: Western-Blot Analyse der Proteinphosphorylierung nach 4-HNE Vorinkubation in LN229-Zellen

Man erkennt in der Western Blot Analyse eine Zeit- und Konzentrationsabhängige Phosphorylierung des EGFR-Tyrosinrestes Nr. 1086 nach Inkubation mit 4-HNE. Eine EGFR-Antagonisierung vor der Inkubation mit 4-HNE (100µM HNE 15 min + AG1478) führt zu einer Signalabschwächung von pAkt und pERK 1/2. Die Negativkontrolle („unbehandelt“) wurde mit 0,3 % Vol. Ethanol als Äquivalent des 4-HNE Lösungsmittels inkubiert und zeigt in dieser Aufnahme keine intrinsische Tyrosin-Phosphorylierung am Y 1086-Rest des EGFR.

Vergleicht man die Aufnahmen der anti-pAkt und anti-pERK1/ERK2, so lässt sich eine 4-HNE konzentrationsabhängige, zueinander inverse Phosphorylierung erkennen. Die Banden der Negativkontrolle und der antagonisierten Probe sind hierbei jeweils schwächer bzw. kaum erkennbar.

3. Wechselwirkungen von 4-HNE und der ALDH1-Expression auf das EGFR-Signaling

Nachdem eine Aktivierung der EGFR-vermittelten Signalkaskade durch 4-HNE gezeigt werden konnte, sollte als nächstes der Stellenwert der Aldehyd-dehydrogenase 1 für diese Signalkaskade ermittelt werden.

Dafür wurden Klone der Zellreihe LN18 mit supprimierter ALDH1-Expression verwendet. Der ALDH1-Knockdown wurde dabei mittels shRNA-Plasmid-Transfektion erreicht, die Kontrolle erfolgte über MOCK1-transfizierte LN18-Klone. Es wurden LN18 Wildtyp, MOCK1 und shRNA-transfizierte Zellen mit 4-HNE behandelt und mittels Western Blot die Proteinphosphorylierung untersucht.

Die Transfektion der Zelllinien war nicht Bestandteil dieser Arbeit und wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Schlegel zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde die ALDH1-Expression der genannten Zelltypen untersucht und verglichen.

C. Ergebnisse 3. Wechselwirkungen von 4-HNE und der ALDH1-Expression auf das EGFR-Signaling

Abkürzung der Proben	HNE-Konzentrationen
LN18 wt	LN18 Wildtyp
LN18 MOCK1	LN18 MOCK1-Transfektion
LN18 shRNA	LN18 shRNA-Transfektion (ALDH1-Knockdown)

Tabelle 7: Abkürzungen der Proben zur Untersuchung der ALDH1-Expression

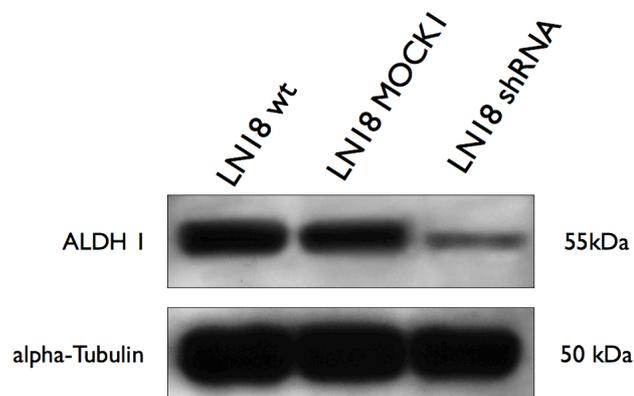


Abbildung 4: Western-Blot Analyse der ALDH1 Expression von verschiedenen LN18-Zellklonen

Man erkennt eine deutliche Signalabschwächung der ALDH1-Bande bei dem shRNA-transfizierten LN18 Klon. Bei vergleichbarer Ladungskontrolle ist daher von einer erfolgreichen Mindereexpression der ALDH1 bei den shRNA-transfizierten Klonen auszugehen.

Im folgenden Versuchsansatz wurden Wildtyp-Zellen mit ALDH1-Knockdowns gegenübergestellt und nach 4-HNE-Inkubation die Phosphorylierung der Proteine EGFR (Phosphorylierung am Tyrosinrest 1086), ERK1/ERK2 und SAPK/JNK verglichen.

Zusätzlich wurden Negativkontrollen ohne 4-HNE (mit äquivalenter Ethanolkonzentration) und Positivkontrollen mit EGF (100 ng/ml) behandelt. Des Weiteren erfolgte ein EGFR-Inhibitionsversuch mittels Tyrphostin AG 1478.

C. Ergebnisse 3. Wechselwirkungen von 4-HNE und der ALDH1-Expression auf das EGFR-Signaling

Abkürzung der Proben	Zelltyp	Reagenzien	Inkubationszeit	EGFR-Blockade
shRNA+HNE	shRNA	10 μ M 4-HNE	10 min	-
wt + HNE	wildtyp	10 μ M 4-HNE	10 min	-
shRNA + HNE + AG1478	shRNA	10 μ M 4-HNE	10 min	10 μ M AG 1478
wt + HNE + AG1478	wildtyp	10 μ M 4-HNE	10 min	10 μ M AG 1478
shRNA + EGF	shRNA	100 ng/ml EGF	10 min	-
wt + EGF	wildtyp	100 ng/ml EGF	10 min	-
shRNA + Ethanol	shRNA	0,8% Vol. Ethanol	10 min	-
wt + Ethanol	wildtyp	0,8% Vol. Ethanol	10 min	-

Tabelle 8: Abkürzungen der Proben; Aufschlüsselung der Zelltypen, Reagenzien und deren Inkubationszeiten.

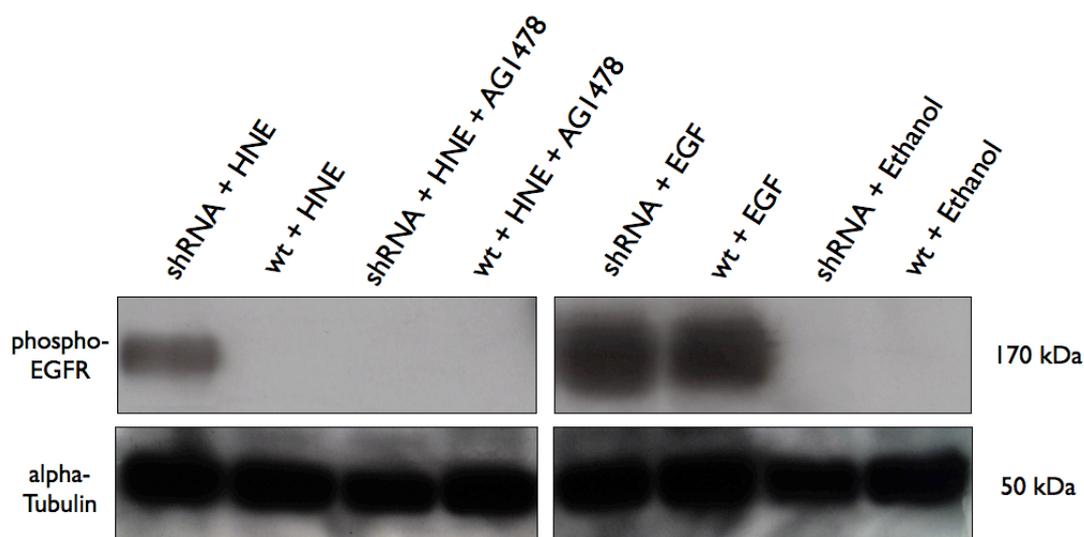


Abbildung 5: Western-Blot Analyse der EGFR-Phosphorylierung am Tyrosinrest 1086. Die Proben sind in Tab. 8 aufgeschlüsselt.

C. Ergebnisse 3. Wechselwirkungen von 4-HNE und der ALDH1-Expression auf das EGFR-Signaling

Im Phospho-EGFR Blot sind folgende Signale im Bereich von 170 kDa erkennbar: Eine schwächere Bande in 4-HNE behandelten shRNA-Zellen sowie stärkere Banden bei beiden Zelltypen mit EGF-Inkubation. Die mit 4-HNE behandelten Wildtyp-LN18 zeigten keine nachweisbare Bande. Bei regelrechten Positiv- und Negativkontrollen (shRNA ± EGF; wt ± EGF) ist davon auszugehen, dass die 4-HNE-abhängige EGFR-Aktivierung invers mit der ALDH1-Expression in LN18 Zellen korreliert.

Analoge Ergebnisse ließen sich auch bei der Western-Blot Analyse der Downstream-Proteine ERK1/ERK2 und SAPK/JNK erzielen.

Die selben Proben wurden in weiteren Proteinanalysen mit Phospho-ERK1/ERK2 bzw. Phospho-SAPK/JNK Primärantikörpern inkubiert und damit die Proteinphosphorylierung der spezifischen Banden (ERK1/ERK2: 42/44kDa; SAPK JNK: 46/54 kDa) untersucht.

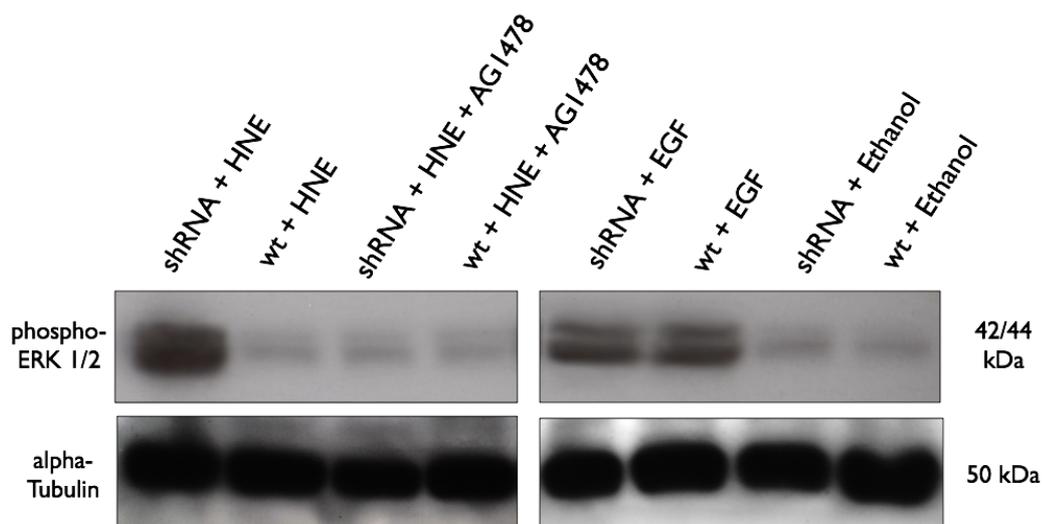


Abbildung 6: Western-Blot Analyse der ERK1/ERK2 Phosphorylierung an LN18 Wildtyp und ALDH1-Knockdown Zellen. Aufschlüsselung der Proben siehe Tab. 8; die Ladungskontrolle erfolgte mittels alpha-Tubulin. Die mit phospho-ERK1/2 bezeichnete Zeile zeigt einen Ausschnitt von ca. 35-50 kDa, die Proben wurden mit einem anti-Phospho-ERK1/ERK2 Primärantikörper inkubiert.

C. Ergebnisse 3. Wechselwirkungen von 4-HNE und der ALDH1-Expression auf das EGFR-Signaling

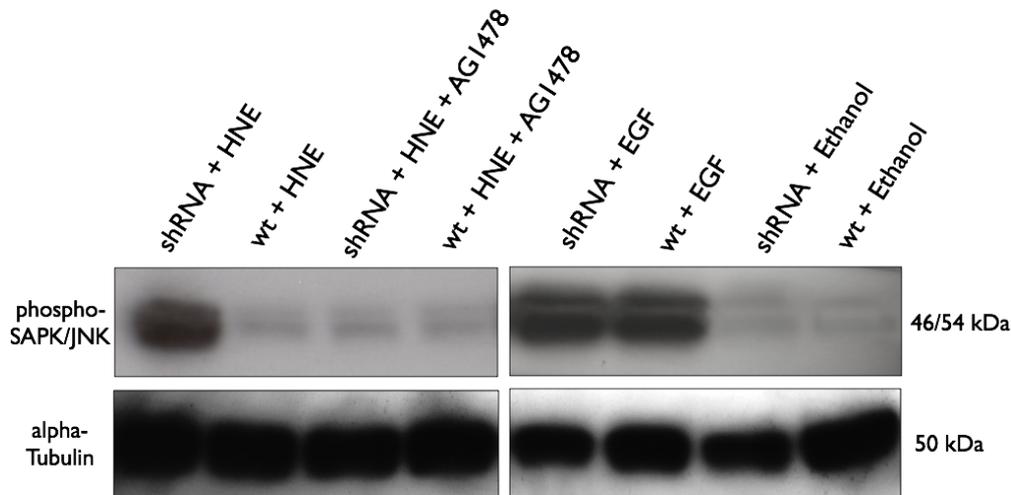


Abbildung 7: Western-Blot Analyse der SAPK/JNK Phosphorylierung an LN18 Wildtyp und ALDH1-Knockdown Zellen. Aufschlüsselung der Proben siehe Tab. 8; die Ladungskontrolle erfolgte mittels alpha-Tubulin; die mit phospho-SAPK/JNK bezeichnete Zeile zeigt einen Ausschnitt von ca. 40-60 kDa, die Proben wurden mit einem anti-Phospho-SAPK/JNK Primärantikörper inkubiert.

Es zeigt sich in diesen Versuchen das gleiche Ergebnis wie bei der Phospho-EGFR-Analyse. Die shRNA-transfizierte Gruppe zeigt eine den Positivkontrollen (shRNA + EGF; wt + EGF) entsprechende Bande nach 4-HNE-Inkubation, das Signal der Wildtyp-Gruppe ist hier auf dem Niveau der Negativkontrollen (shRNA/wt + Ethanol). Dieser Effekt ist durch Tyrphostin AG 1478 reversibel (shRNA/wt + HNE + AG1478).

Zum Ausschluss einer artifiziellen Verzerrung der Ergebnisse aufgrund der shRNA-Plasmidtransfektion wurde ebenfalls eine Versuchsreihe mit MOCK1-transfizierten LN18 Zellen ohne ALDH1-Suppression angefertigt. Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie im zuvor aufgeführten Versuch: Die MOCK1-transfizierten Klone wurden für 10 min mit 4-HNE, EGF bzw. Ethanol inkubiert. Zusätzlich erfolgte bei einer Probe die Vorinkubation mit Tyrphostin AG 1478 und anschließend mit EGF.

C. Ergebnisse 3. Wechselwirkungen von 4-HNE und der ALDH1-Expression auf das EGFR-Signaling

Abkürzung der Proben	Zelltyp	Reagenzien	Inkubationszeit	EGFR-Antagonisierung
MOCK1 + HNE	MOCK1 (LN18)	10 μ M 4-HNE	10 min	-
MOCK1 + Ethanol	MOCK1 (LN18)	0,8% Vol. Ethanol	10 min	-
MOCK1 + EGF + AG178	MOCK1 (LN18)	100 ng/ml EGF	10 min	10 μ M AG 1478
Mock1 + EGF	MOCK1 (LN18)	100 ng/ml EGF	10 min	

Tabelle 9: Aufschlüsselung der in Abb. 8 gezeigten Proben. Die Zellen waren MOCK1-transfizierte LN18 Zellen mit regelrechter ALDH1 Expression (siehe Abb. 4).

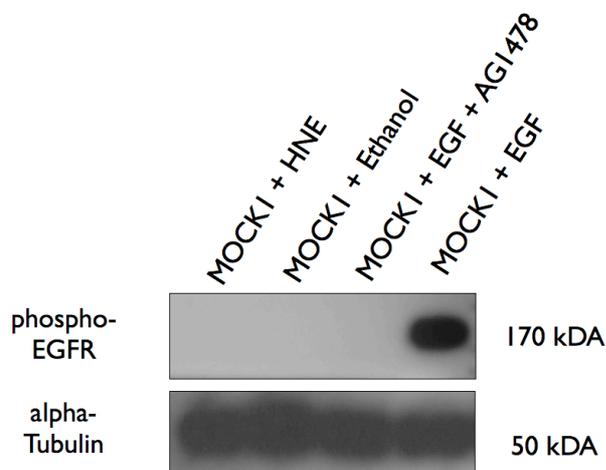


Abbildung 8: MOCK1-LN18 Lysate wurden mittels Elektrophorese aufgetrennt und mit anti-Phospho-EGFR Primärantikörpern inkubiert.

Die EGF-inkubierte Probe (MOCK1 + EGF) zeigt eine regelrechte Bande bei 170 kDA nach anti-Phospho-EGFR inkubation. In der 4-HNE inkubierten Probe (MOCK1 + HNE) ist ebenso wie bei den antagonisierten Proben (MOCK1 + EGF + AG1478) und der Ethanolkontrolle keine entsprechende Bande sichtbar. Die Ladungskontrolle erfolgte mittels alpha-Tubulin.

4. Einfluss von 4-Hydroxynonenal auf die Zellmigration

Die Migration regulierende Wirkung von Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Familie konnte sowohl im Rahmen der biologischen Ontogenese und Organregeneration (Barrandon 1987; Ware et al. 1998) als auch im Bereich der Tumorbiologie (Price et al. 1999) gezeigt werden. Diese Mechanismen wurden unter anderem durch Rappl et al. in glialen Tumorzellen nachvollzogen und weitergehend charakterisiert (Rappl et al. 2008).

Nicht zuletzt aufgrund der mehrfach beschriebenen Bedeutung von HNE auf das Rezeptortyrosinkinase-Signaling (Liu et al. 1999; Negre-Salvayre et al. 2003) ist es naheliegend, dass die Anwesenheit von 4-HNE das Migrationsverhalten beeinflusst. In den nachfolgenden Experimenten wurde das Migrationsverhalten verschiedener, etablierter Glioblastom-Tumorzellreihen in Abhängigkeit von 4-Hydroxynonenal charakterisiert.

4.1 4-HNE-vermittelte Migration im LN229 Wildtyp

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens wurde der Woundhealing Assay entsprechend der zuvor beschriebenen Methodik angewandt.

In diesem Versuchsansatz wurden 4 Gruppen der LN229-Wildtyp Zellreihe gebildet, welche auf verschiedene Arten behandelt wurden.

Ziel des Versuches war es, nicht nur einen Unterschied in der Migration der Zellen durch 4-HNE festzustellen - ebenfalls sollte dabei der Einfluss des EGF-Rezeptors erfasst werden.

Daher wurden zum einen jeweils eine Gruppe mit und ohne Zugabe von 4-HNE untersucht. Bei 2 weiteren Gruppen wurde der EGF-Rezeptor mittels Tyrphostin AG1478 antagonisiert und hier ebenfalls einmal 4-HNE zugegeben - als Kontrolle diente eine AG1478-vorinkubierte LN229-Gruppe ohne Zusatz von 4-HNE (siehe Tab. 10).

C. Ergebnisse 4. Einfluss von 4-Hydroxynonenal auf die Zellmigration

Abkürzung der Proben	Zelltyp	Reagenzien	Inkubationszeit	EGFR-Antagonisierung
LN229-	LN229 (Wildtyp)	0,1% Vol. Ethanol	12 h	-
LN229AG-	LN229 (Wildtyp)	0,1% Vol. Ethanol	12 h	10 μ M Tyrphostin AG 1478
LN229AG+	LN229 (Wildtyp)	5 μ M 4-HNE	12 h	10 μ M Tyrphostin AG 1478
LN229HNE	LN229 (Wildtyp)	5 μ M 4-HNE	12 h	-

Tabelle 10: Aufschlüsselung der in Abb. 9 und Diagramm 3 dargestellten Proben

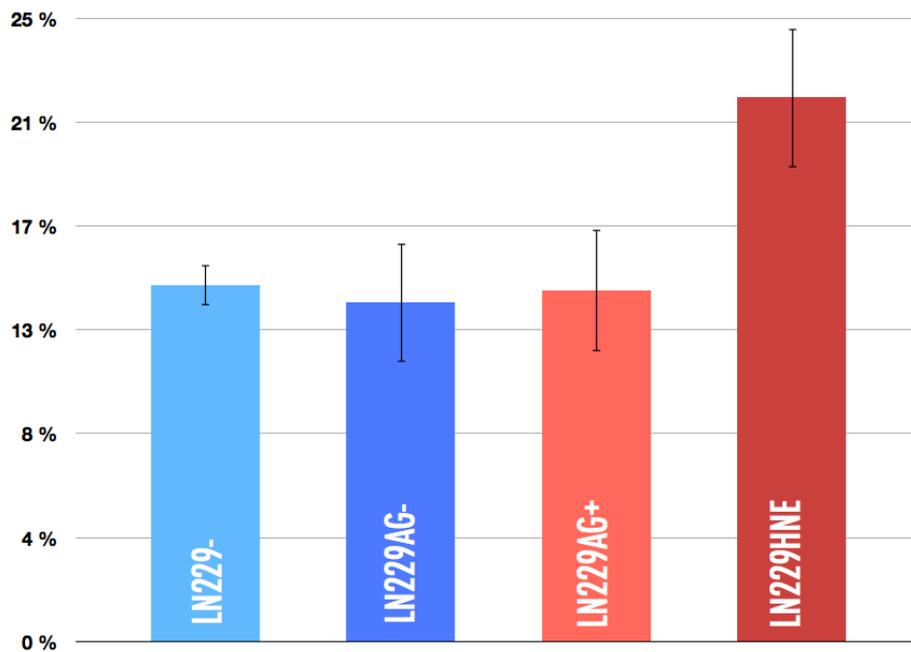


Diagramm 3: Graphische Darstellung der arithmetischen Mittel der Migrationswerte. Die Ordinate zeigt den relativen Wundverschluss in Prozent. Die Fehlerbalken enthalten das 99% Konfidenzintervall.

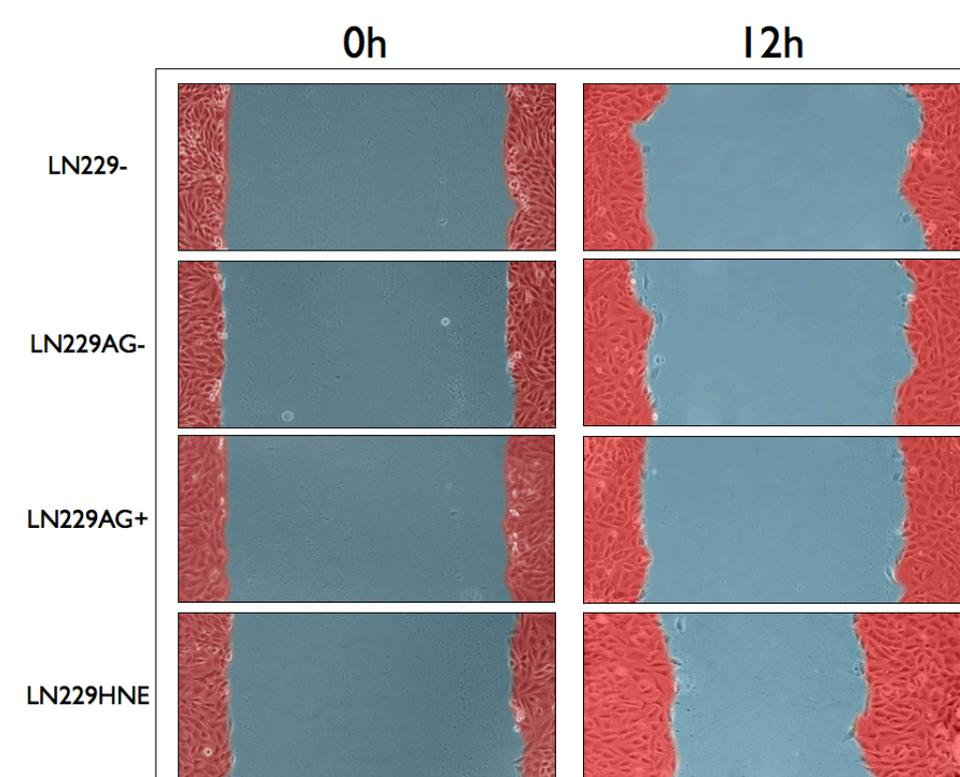


Abbildung 9: Graphische Veranschaulichung des in Diagramm 3 dargestellten Migrationsverhaltens. Die Abkürzungen der Proben sind jeweils in Tabelle 10 aufgeschlüsselt. Die Abbildungen sind eine Auswahl einzelner Proben aus den jeweiligen Gruppen, welche den Mittelwerten der einzelnen Gruppen entsprechen. Zur besseren Übersicht der Wundränder wurden diese im Nachhinein farbig markiert.

Die mit 4-HNE inkubierte LN229 Gruppe (LN229HNE) zeigte eine statistisch signifikant ($p < 0,001$) höhere Migrationsgeschwindigkeit als die Kontrollgruppe (LN229-), welche - bis auf die Abwesenheit von 4-HNE - unter identischen Versuchsbedingungen gemessen wurde.

Der positive Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit von 4-Hydroxynonenal ließ sich in diesem Versuch durch den EGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Tyrphostin AG1478 aufheben: Die mit 4-HNE und Tyrphostin AG1478 inkubierte Gruppe (LN229AG+) zeigte ein signifikant ($p < 0,001$) langsames Migrationsverhalten als die ausschließlich mit 4-HNE behandelte Gruppe (LN229HNE).

4.2 Die Bedeutung der ALDH1 Expression für das Migrationsverhalten unter 4-Hydroxynonenal

Im vorhergehenden Experiment ließ sich eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit von 4-HNE behandelten LN229 Zellen verifizieren.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Expression von Aldehyddehydrogenase 1 das durch 4-Hydroxynonenal vermittelte Migrationsverhalten beeinflusst.

Es wurden Klone der Zellreihe LN18 mit supprimierter ALDH1-Expression verwendet. Der ALDH1-Knockdown erfolgte mittels shRNA-Plasmid-Transfektion, die Kontrolle über MOCK1-transfizierte LN18-Klone mit einer dem Wildtyp entsprechenden ALDH1-Expression (siehe Abb. 4).

Es wurden LN18 Wildtyp, MOCK1- und shRNA-transfizierte Zellen mit 4-HNE behandelt und deren Migrationsverhalten mit entsprechend unbehandelten Zellreihen verglichen.

Des Weiteren wurden jeweils eine weitere Gruppe von MOCK1- und shRNA-transfizierten Zellen mit 4-HNE und dem EGFR-inhibitor Tyrphostin AG1478 behandelt. Hierbei sollte festgestellt werden, ob sich analog zum Migrationsversuch mit der LN229-Zellreihe eine entsprechende Suppression des Migrationsvorteiles in der 4-HNE behandelten Gruppe erzielen lässt.

Abkürzung der Proben	Zelltyp	Reagenzien	Inkubationszeit	EGFR-Antagonisierung
wt-	LN18 (Wildtyp)	0,1% Vol. Ethanol	12 h / 24 h	-
wt+		5 μ M 4-HNE	12 h / 24 h	-
Mock-	LN18 (Mock1-	0,1% Vol. Ethanol	12 h	-
MockAG+	transfiziert als Kontrolle der Plasmidtransfektion ohne veränderte ALDH1-Expression	5 μ M 4-HNE	12 h	10 μ M Tyrphostin AG 1478
Mock+		5 μ M 4-HNE	12 h / 24 h	-
shRNA-	LN18 (mittels	0,1% Vol. Ethanol	12 h / 24 h	-
shRNAAG+	shRNA-Plasmidtransfektion supprimierte ALDH1-Expression)	5 μ M 4-HNE	12 h / 24 h	10 μ M Tyrphostin AG 1478
shRNA+		5 μ M 4-HNE	12 h / 24 h	-

Tabelle 11: Aufschlüsselung der in den Abbildungen 10, 11 und den Diagrammen 4 und 5 verwendeten Proben.

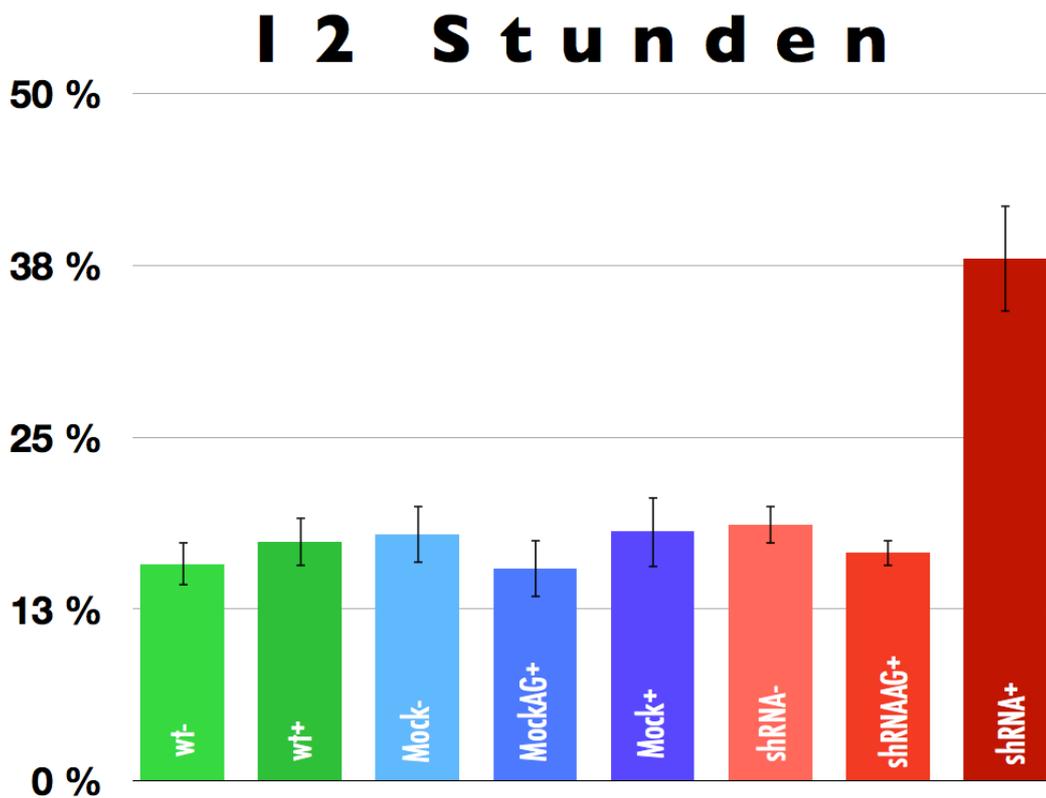


Diagramm 4: Graphische Darstellung der arithmetischen Mittel des relativen Wundverschlusses (Prozentual in der Ordinate). Die Fehlerbalken zeigen das 99% Konfidenzintervall. Die Probenabkürzungen sind in Tabelle 11 Aufgeschlüsselt.

Die erste Messung nach 12h Inkubationszeit veranschaulicht eine signifikant ($p < 0,001$) schnellere Verringerung der Wundbreite bei 4-HNE behandelten Zellen mit supprimierter ALDH-1 Expression (shRNA+) im Vergleich zu allen anderen in diesem Versuch angesetzten Gruppen.

Im Einzelnen erkennt man im Vergleich zum ALDH1-Knockdown (shRNA+) einen signifikant langsameren Wundverschluss nach 12 Stunden bei ebenso 4-HNE behandelten LN18 Wildtyp-Zellen (wt+). Die Differenz der Migration innerhalb der Gruppen durch Zugabe von 4-Hydroxynonenal ist in den Zellen mit ALDH1-Knockdown (Δ shRNA-/shRNA+) signifikant höher als in den Gruppen LN18 Wildtyp (Δ wt-/wt+) sowie den Mock1-transfizierten LN18 (Δ Mock-/Mock+) ($p < 0,001$).

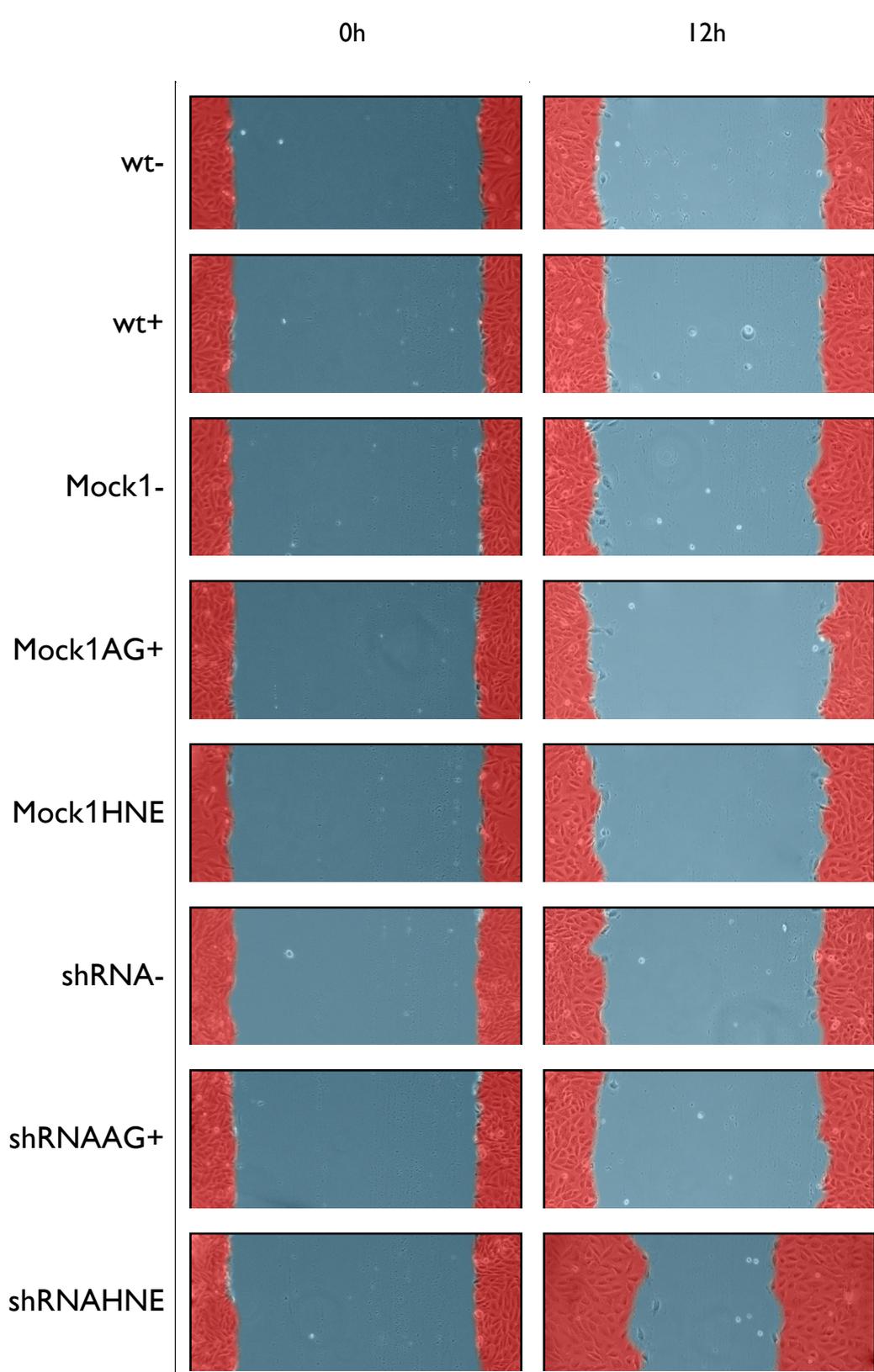


Abbildung 10: Graphische Veranschaulichung des in Diagramm 4 dargestellten Migrationsverhaltens. Die Abkürzungen der Proben sind jeweils in Tabelle 11 aufgeschlüsselt. Die Abbildungen sind eine Auswahl einzelner Proben aus den jeweiligen Gruppen, welche den Mittelwerten der einzelnen Gruppen entsprechen. Zur besseren Übersicht der Wundränder wurden diese im Nachhinein farbig markiert.

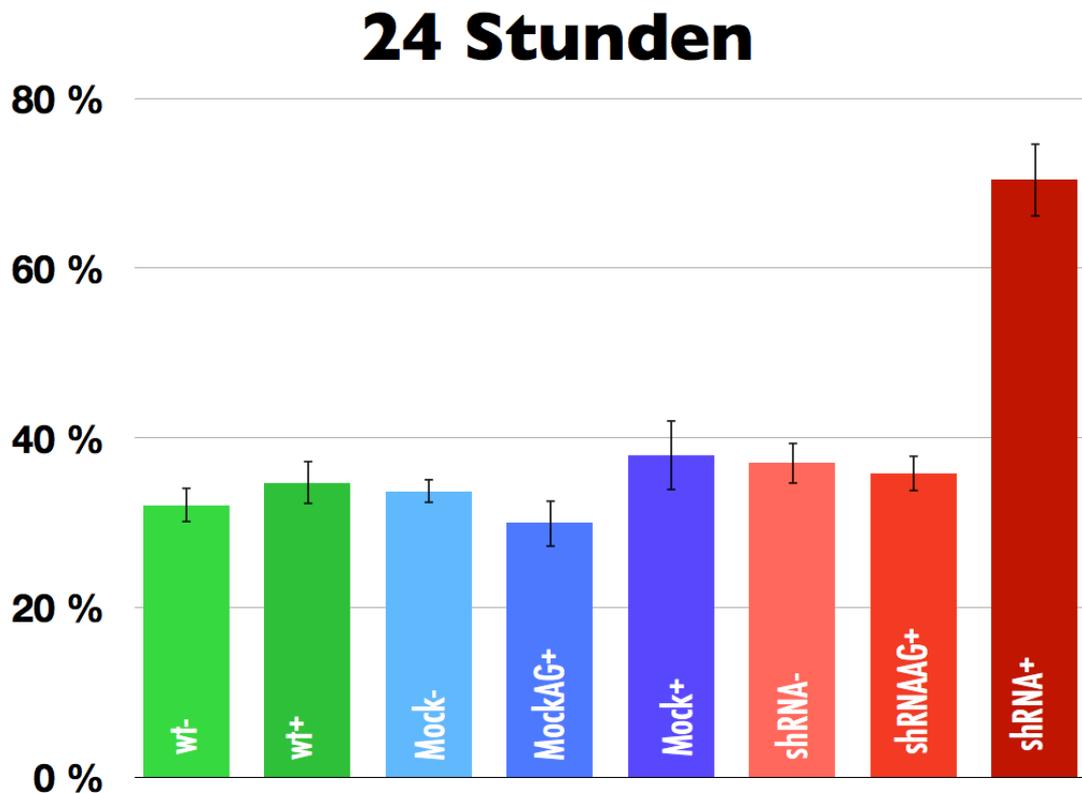


Diagramm 4: Graphische Darstellung der arithmetischen Mittel des relativen Wundverschlusses (Prozentual in der Ordinate). Die Fehlerbalken zeigen das 99% Konfidenzintervall. Die Probenabkürzungen sind in Tabelle 11 Aufgeschlüsselt.

Auch die zweite Messung nach 24h zeichnet die gleichen Resultate ab: Man findet wieder eine signifikant ($p < 0,001$) schnellere Verringerung der Wundbreite bei 4-HNE behandelten Zellen mit supprimierter Aldehyddehydrogenase-1 Expression (shRNA+) im Vergleich zu den übrigen, in diesem Versuch angesetzten Gruppen.

Der Wundverschluss schreitet nach 24 Stunden wieder bei 4-HNE behandelten LN18 Wildtyp-Zellen (wt+) langsamer als in der ALDH1-Knockdown Variante (shRNA+) voran.

Die Differenz der Migration nach 24 Stunden innerhalb der Gruppen durch Zugabe von 4-Hydroxynonenal ist im ALDH1-Knockdown (Δ shRNA-/shRNA+) signifikant höher als im LN18 Wildtyp (Δ wt-/wt+) und den Mock1-transfizierten LN18 (Δ Mock-/Mock+) ($p < 0,001$).

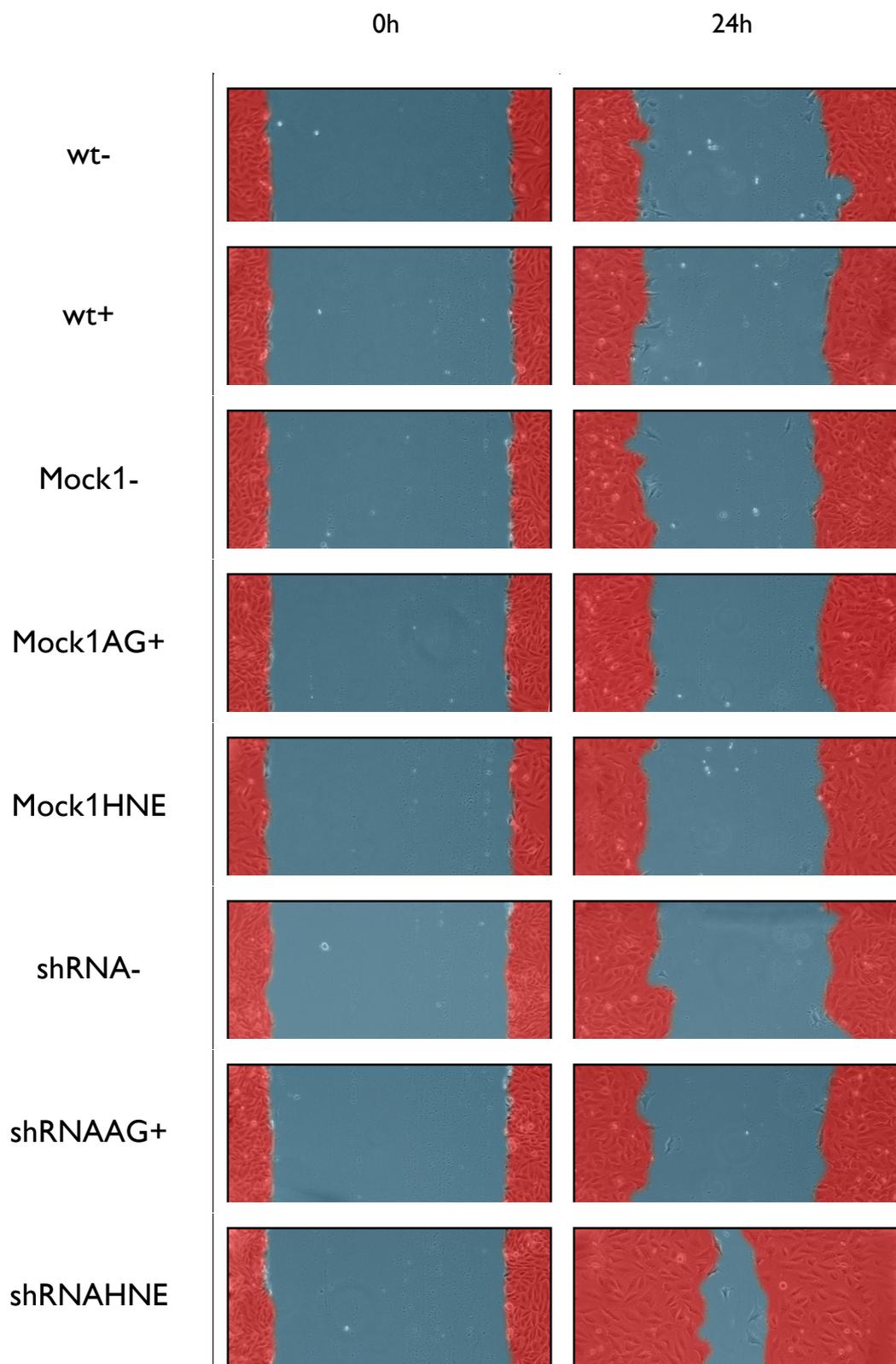


Abbildung 10: Graphische Veranschaulichung des in Diagramm 4 dargestellten Migrationsverhaltens. Die Abkürzungen der Proben sind jeweils in Tabelle 11 aufgeschlüsselt. Die Abbildungen sind eine Auswahl einzelner Proben aus den jeweiligen Gruppen, welche den Mittelwerten der einzelnen Gruppen entsprechen. Zur besseren Übersicht der Wundränder wurden diese im Nachhinein farbig markiert.

D. Diskussion

Trotz verbesserter Therapiekonzepte sind Rezidive des Glioblastoma multiforme die Regel. Weiterhin ist die Prognose dieser Entität infaust. Eine wichtige Ursache hierfür liegt in der Migration von Tumorzellen und der damit einhergehenden Ausbreitung im gesamten Zentralnervensystem, was eine onkologisch vollständige Resektion nahezu unmöglich macht. Ein Merkmal vieler hochmaligner Entitäten ist der ausgeprägte oxidative Stress innerhalb des Tumors – bedingt durch die unkontrollierte Proliferation und dementsprechend unzureichende Vaskularisation. Bislang wurde die Wirkung von Metaboliten des oxidativen Stress auf die Migration glialer Tumore nicht beschrieben. In dieser Arbeit sollte der (EGFR-vermittelte) Einfluss von 4-HNE, einem oxidativen Stressprodukt, auf die Migration in Glioblastomen beschrieben werden. Darüber hinaus sollte eine Korrelation mit dem glialen Tumorstammzellmarker ALDH1 untersucht werden.

Zunächst konnte eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition durch das 4-HNE beobachtet werden. Die EGFR-Blockade führte zu keiner Aufhebung der 4-HNE-induzierten Proliferationshemmung. Es ergibt sich daher kein Anhalt für eine EGFR-vermittelte Proliferationshemmung durch 4-HNE.

Im Western Blot zeigte sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung des EGF-Rezeptors durch 4-HNE. Eine nachhaltige Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase legt die Phosphorylierung der „Downstream“-Proteine ERK1/2 und SAPK/JNK nahe. Nachdem sich in den EGFR-Phosphorylierungen Unterschiede zwischen den Zelllinien LN229 und LN18 zeigten, wurde die ALDH1-Expression als möglicher Einflussfaktor untersucht.

Der ALDH1-Knockdown (shRNA-transfizierte LN18) zeigte nach 4-HNE-Inkubation eine stärkere EGFR-Phosphorylierung im Western Blot als der LN18-Wildtyp. Man kann in diesem Fall von einer höheren Sensitivität für 4-HNE bei ALDH1-Knockdowns ausgehen. Mock1-transfizierte LN18-Klone verhielten sich linear zum Wildtyp, was einen artifiziellen Effekt unwahrscheinlich macht.

Eine analoge Situation wurde bei der Zellmigration beobachtet. 4-HNE führte zu ausgeprägter Migration im Wound Healing Assay bei LN229-Wildtypzellen. Der EGF-Rezeptor scheint diesen Effekt maßgeblich zu vermitteln, nachdem das 4-HNE keine Migration bei EGFR-antagonisierten Zellen verursachte.

Darüber hinaus wurde der Einfluss der ALDH1-Expression auf die Wirkungen des 4-HNE am Migrationsverhalten überprüft. Analog zu den Beobachtungen aus der Proteinanalyse zeigten ALDH1-Knockdowns der Zellreihe LN18 eine erheblich höhere Sensitivität gegenüber dem 4-HNE am EGF-Rezeptor: Während ALDH1-Knockdowns im Vergleich zum Wildtyp und der MOCK1-transfizierten Variante unter 4-HNE-Inkubation ein deutlich ausgeprägtes Migrationsverhalten zeigten, ließ sich der Effekt erneut durch eine EGFR-Blockade aufheben.

1. Die Rolle des EGF-Rezeptors bei der Wachstumsinhibition durch 4-Hydroxynonenal

Die Kernaussage diverser Publikationen (Zarkovic et al. 1995; Liu et al. 1999), dass 4-Hydroxynonenal konzentrationsabhängig einen Einfluss auf die Proliferationshemmung von Zellen hat, konnte in dieser Arbeit ebenfalls in glialen Tumorzellen im Sinne einer konzentrationsabhängigen Wachstumsinhibition nachvollzogen werden.

Liu et al. sprach dabei dem EGF-Rezeptor eine zentrale Rolle bei der 4-HNE induzierten Wachstumsinhibition zu (Liu et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich die 4-HNE-vermittelte Wachstumsinhibition mit einem EGF-Rezeptorinhibitor nicht aufheben oder vermindern. Daher scheint ein direkter Zusammenhang zwischen der beschriebenen Proliferationsinhibition und der EGFR-Signalkaskade nicht wahrscheinlich.

Dieses Ergebnis deckt sich mit bisher publizierten Erkenntnissen, dass die Rezeptortyrosinkinasen der ErbB-Familie Wachstumssignale wie Proliferation, Antiapoptose und Migration vermitteln.

Gründe für die in glialen Tumorzellen festgestellte Wachstumsinhibition sind daher in anderen Mechanismen zu suchen, welche im Zusammenspiel eine Wachstumsinhibition und Apoptose zur Folge haben: Das breite Spektrum der bisher publizierten Wirkungsorte von 4-Hydroxynonenal (siehe Einleitung) verdeutlicht die Vielfalt der biologischen Effekte. Diese Eigenschaft ist typisch für die Gruppe der Aldehyde, welcher das 4-HNE angehört.

2. Die Aktivierung der EGFR-Signalkaskade durch 4-Hydroxynonenal

In dieser Arbeit konnte sowohl eine EGFR-Aktivierung am Tyrosinrest y1086 als auch eine Phosphorylierung der Downstream-Proteine pAkt und pErk1/2 durch 4-HNE in LN229 und LN18 Zelllinien nachgewiesen werden.

Die Kohärenz des Phosphorylierungsverhaltens vom EGF-Rezeptors und dessen Downstreamproteinen bekräftigt daher die Theorie einer konzentrationsabhängigen Aktivierung der EGFR-Signalkaskade durch das 4-Hydroxynonenal. Dies wird nicht zuletzt durch die Tatsache bekräftigt, dass sich die beschriebenen Effekte im Western Blot durch die Zugabe eines EGFR-Inhibitors aufheben lassen.

Zwar konnte bei der Untersuchung der Wachstumsinhibition durch 4-HNE kein Bezug zum EGFR hergestellt werden, dies schließt jedoch andere EGFR-vermittelte Effekte des 4-Hydroxynonenals nicht aus. Die positiven Ergebnisse aus der Western Blot Analyse bilden die Grundlage der Annahme, dass zelluläre Reaktionen auf verschiedene Konzentrationen von 4-HNE über die EGFR-Signalkaskade initiiert werden können.

3. ALDH1 moduliert die 4-Hydroxynonenal - induzierte Phosphorylierung von Tyrosinresten der EGFR-Signalkaskade

Neben der Induktion der Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität durch 4-HNE in LN229-Zellen wurde bei LN18-Klonen beziehungsweise entsprechenden ALDH1-Knockdownvarianten eine starke Korrelation zwischen der ALDH1-Expression und der 4-HNE-vermittelten Wirkung beobachtet.

Mit 4-Hydroxynonenal behandelte, ALDH1-supprimierte Zellen zeigen ausgeprägte Phosphorylierungen von EGFR und der Downstreamproteine Erk1/2 bzw. SAPK/JNK.

Erheblich geringere EGFR-Phosphorylierungen des ALDH1-positiven Wildtyps, der MOCK1-Kontrolle und des EGFR-antagonisierten ALDH1-Knockdown verdeutlichen eine inverse Korrelation von 4-HNE vermittelten Effekten und der ALDH1-Expression.

Dieser Versuchsansatz suggeriert, dass in Abhängigkeit der ALDH1-Expression biologische Effekte unter oxidativem Stress alteriert werden können. Im konkreten Fall bedeutet das also ein geringeres oder gar fehlendes Ansprechen der EGFR-Signalkaskade auf 4-Hydroxynonenal in Zellen, die eine hohe Expression von ALDH1 aufweisen.

4. 4-Hydroxynonenal induziert die Migration glialer Tumorzellen über den EGF-Rezeptor

Die Familie der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen wurde bereits mehrfach in Publikationen als migrationsinduzierender Faktor genannt (Verbeek et al. 1998; Dittmar et al. 2002).

Dieser Sachverhalt wurde durch Rappl et al. in Glioblastomen nachvollzogen und hierbei die Reorganisation von N-Cadherin als Mediator der Migration identifiziert (Rappl et al. 2008).

Im Wound Healing Assay konnte gezeigt werden, dass 4-Hydroxynonenal Einfluss auf das Migrationsverhalten von glialen Tumorzellen nehmen kann. Nachdem die Migration von 4-HNE behandelten Zellen sich unter EGFR-Blockade nicht von der unbehandelten Kontrollgruppe unterschied, zeigt dieser Ansatz, dass die Zellbewegung durch 4-HNE über den EGF-Rezeptor vermittelt werden kann.

Diese Wirkung von 4-Hydroxynonenal auf Tumorzellen wurde bislang - abgesehen von der gerichteten Chemotaxis in Granulozyten (Moldovan et al. 1994) und Polymorphonukleozyten der Ratte (Curzio et al. 1982) - noch nicht beschrieben.

5. Aldehyd-dehydrogenase 1 determiniert die EGFR-vermittelte Zellmigration in LN18-Klonen

Nachdem die migrationsinduzierende Wirkung von 4-HNE über den EGFR im Versuch mit der LN229 Zelllinie bereits verifiziert werden konnte, lässt sich aus dem Wound Healing Assay mit shRNA-transfizierten ALDH1-Knockdowns der Zelllinie LN18 ein weiterer Schluss ziehen:

Eine ausgeprägte Migrationsinduktion fand in der LN18-Zellreihe ausschließlich bei ALDH1-supprimierten Klonen statt, was folglich auf eine Korrelation zwischen 4-HNE Effekten und der ALDH1-Expression verweist. Die Rolle des EGFR als Mediator konnte erneut über einen analogen Inhibitionsansatz bestätigt werden.

Nach der Proteinanalyse konnte nun ebenfalls im in-vitro Migrationsversuch die Verknüpfung zwischen 4-HNE und ALDH1 hergestellt werden:

4-Hydroxynonenal vermittelt in Glioblastomen über den EGF-Rezeptor Zellmigration, welche durch hohe Expression des glialen Tumor-Stammzellmarkers ALDH1 unterbunden werden kann.

6. 4-HNE als Mediator von oxidativem Stress in Glioblastomen

Die EGFR-vermittelte Migration kann über verschiedene Impulse angeregt werden. Neben der klassischen Ligandenbindung durch EGF ist die konstitutive EGFR-Aktivität nach Genmutation bekannt. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit eine weitere Möglichkeit betrachtet, welche in Glioblastomen bislang nicht beschrieben wurde: Die EGFR-Phosphorylierung und nachfolgende Zellmigration kann ebenso durch Lipidperoxidationsprodukte, wie z.B. 4-Hydroxynonenal verursacht werden.

Lipidperoxidationsprodukte entstehen regelhaft durch freie Sauerstoffradikale, welche in Glioblastomen durch unkontrollierte Proliferation, Angiogenese und Hypoxie ubiquitär vorzufinden sind und daher hohe Konzentrationen von 4-HNE begünstigen können. Diese Annahme konnte in einer Arbeit bestätigt werden, welche eine Korrelation zwischen Gewebskonzentrationen von Lipidperoxidationsprodukten und den Malignitätsgraden hirneigener Tumore zeigen konnte: In Glioblastomen fand man dabei die höchsten Konzentrationen von 4-Hydroxynonenal (Juric-Sekhar et al. 2009). Die Migrationsinduktion durch oxidativen Stress liefert eine weitere Erklärung für die rasante Tumorausbreitung in Glioblastomen. Dabei könnte ALDH1 eine zentrale Rolle in der Modulation dieser Stressreaktionen einnehmen:

Das 4-Hydroxynonenal wird als Aldehyd unter anderem durch die Aldehyddehydrogenase 1 abgebaut (Canuto et al. 1991; Zhang et al. 2010). Zugleich konnte ALDH1 als Stammzellmarker verschiedener Tumore identifiziert werden, unter anderem bei Glioblastomen (Rasper et al. 2010).

Nachdem gliale Tumorstammzellen eine hohe ALDH1-Expression aufweisen können, reagieren diese vermutlich weniger sensibel auf das 4-Hydroxynonenal. Experimente mit 4-HNE, einem wichtigen Mediator von oxidativem Stress (Zarkovic et al. 1999) können daher funktionelle Aspekte des Tumor-Stammzellmarkers ALDH1 unter oxidativem Stress charakterisieren.

Zusammenfassend könnte der Stammzellmarker Aldehyd-dehydrogenase 1 ein wichtiges Element der biologischen Reaktionsvielfalt von Tumorzellen auf das sie umgebende Mikromilieu darstellen: Je nach Expressionsstatus und dem daraus resultierenden Differenzierungsgrad der Tumorzellen werden unterschiedliche Antworten auf oxidativen Stress determiniert.

E. Zusammenfassung

Das Glioblastoma Multiforme ist der häufigste maligne Hirntumor des Erwachsenen. Schnelles und vor allem stark invasives Wachstum machen eine vollständige Resektion nahezu unmöglich. Dadurch kommt es im weiteren Verlauf regelhaft zu Rezidiven.

Die EGFR-vermittelte Migrationsinduktion durch Lipidperoxidationsprodukte (wie z.B. 4-HNE) nach oxidativem Stress könnte eine Erklärung für das invasive Wachstum liefern. 4-HNE wird unter anderem durch ALDH1 metabolisiert. Die ALDH1-Expression könnte daher das Ausmaß der 4-HNE vermittelten Effekte beeinflussen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Beschreibung der EGFR-Signalkaskadenaktivierung durch 4-HNE in Glioblastomen sowie die Charakterisierung einer möglichen Wachstumsinhibition und Migrationsinduktion. Darüber hinaus sollte eine Modulation dieser Effekte durch den Tumorstammzellmarker ALDH1 untersucht werden.

In den ersten Versuchen konnte eine Wachstumsinhibition durch 4-HNE in glialen Tumorzellen nachvollzogen werden. Es ließ sich jedoch kein Zusammenhang mit dem EGFR als Mediator beweisen.

Die Aktivierung der EGFR-Signalkaskade durch 4-HNE konnte im Western Blot durch Nachweis von phosphoryliertem EGFR und dessen aktivierten Downstream-Proteinen pERK1/2 und pSAPK/pJNK sowie deren Fehlen nach vorheriger EGFR-Blockade gezeigt werden.

Nur Zellreihen mit geringfügiger ALDH1-Expression zeigen eine Phosphorylierung am EGF-Rezeptor (in diesem Versuch handelte es sich um einen ALDH1-Knockdown mittels shRNA-Transfektion in der Zelllinie LN18).

4-Hydroxynonenal induzierte Migration im Scratch Assay mit Glioblastom-Zelllinien. Die genannte Migrationsinduktion fand bei LN229 Zellen mit antagonisiertem EGF-Rezeptor nicht statt, daher ist von einer EGFR-vermittelten und 4-HNE induzierten Migration auszugehen.

Auch bei den Migrationsversuchen zeigte sich eine strenge Abhängigkeit von der ALDH1 Expression. Im Experiment mit shRNA-transfizierten ALDH1-Knockdowns der Zelllinie LN18 konnte man eine EGFR-abhängige, signifikant höhere Migrationsgeschwindigkeit von 4-HNE-behandelten Zellen im Vergleich zum Wildtyp mit hoher ALDH1-Expression verifizieren.

F. Bibliografie

- Adachi, M., M. Fukuda and E. Nishida (1999). "Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer." EMBO J **18**(19): 5347-5358.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." Curr Biol **7**(4): 261-269.
- Barker, F. G., 2nd, R. L. Davis, S. M. Chang and M. D. Prados (1996). "Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme." Cancer **77**(6): 1161-1166.
- Barrera, G., C. Di Mauro, R. Muraca, D. Ferrero, G. Cavalli, V. M. Fazio, L. Paradisi and M. U. Dianzani (1991). "Induction of differentiation in human HL-60 cells by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation." Exp Cell Res **197**(2): 148-152.
- Beier, D., P. Hau, M. Proescholdt, A. Lohmeier, J. Wischhusen, P. J. Oefner, L. Aigner, A. Brawanski, U. Bogdahn and C. P. Beier (2007). "CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles." Cancer Res **67**(9): 4010-4015.
- Brandes, A. A., A. Tosoni, E. Franceschi, M. Reni, G. Gatta and C. Vecht (2008). "Glioblastoma in adults." Crit Rev Oncol Hematol **67**(2): 139-152.
- Bravo, R., J. Burckhardt, T. Curran and R. Muller (1985). "Stimulation and inhibition of growth by EGF in different A431 cell clones is accompanied by the rapid induction of c-fos and c-myc proto-oncogenes." EMBO J **4**(5): 1193-1197.
- Brown, P. D., S. Krishnan, J. N. Sarkaria, W. Wu, K. A. Jaeckle, J. H. Uhm, F. J. Geffroy, R. Arusell, G. Kitange, R. B. Jenkins, J. W. Kugler, R. F. Morton, K. M. Rowland, Jr., P. Mischel, W. H. Yong, B. W. Scheithauer, D. Schiff, C. Giannini and J. C. Buckner (2008). "Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177." J Clin Oncol **26**(34): 5603-5609.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science **296**(5573):

F. Bibliografie

1655-1657.

Chardin, P., D. Cussac, S. Maignan and A. Ducruix (1995). "The Grb2 adaptor."

FEBS Lett **369**(1): 47-51.

Cheng, J. Z., S. S. Singhal, A. Sharma, M. Saini, Y. Yang, S. Awasthi, P. Zimniak and Y. C. Awasthi (2001). "Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling." Arch Biochem Biophys **392**(2): 197-207.

Cobb, M. H., J. E. Hepler, M. Cheng and D. Robbins (1994). "The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2." Semin Cancer Biol **5**(4): 261-268.

Curzio, M., H. Esterbauer, C. Di Mauro, G. Cecchini and M. U. Dianzani (1986).

"Chemotactic activity of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous hydroxyalkenals." Biol Chem Hoppe Seyler **367**(4): 321-329.

DeAngelis, L. M., P. C. Burger, S. B. Green and J. G. Cairncross (1998). "Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy?" Ann Neurol **44**(4): 691-695.

Dropcho, E. J. and S. J. Soong (1996). "The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study." Neurology **47**(3): 684-690.

Engelman, J. A., J. Luo and L. C. Cantley (2006). "The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism." Nat Rev Genet **7**(8): 606-619.

Esterbauer, H., A. Benedetti, J. Lang, R. Fulceri, G. Fauler and M. Comporti (1986). "Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation." Biochim Biophys Acta **876**(1): 154-166.

Esterbauer, H., K. H. Cheeseman, M. U. Dianzani, G. Poli and T. F. Slater (1982). "Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes." Biochem J **208**(1): 129-140.

Esterbauer, H., G. Jurgens, O. Quehenberger and E. Koller (1987). "Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes." J Lipid Res **28**(5): 495-509.

Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zollner (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol

F. Bibliografie

- Med **11**(1): 81-128.
- Gamow, R. I., B. Bottger and F. S. Barnes (1971). "Analysis of chemotaxis in white blood cells." Biophys J **11**(11): 860-867.
- Gill, G. N. and C. S. Lazar (1981). "Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells." Nature **293**(5830): 305-307.
- Ginestier, C., M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C. G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M. S. Wicha and G. Dontu (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." Cell Stem Cell **1**(5): 555-567.
- Gorin, F., W. Harley, J. Schnier, B. Lyeth and T. Jue (2004). "Perinecrotic glioma proliferation and metabolic profile within an intracerebral tumor xenograft." Acta Neuropathol **107**(3): 235-244.
- Hartley, D. P., J. A. Ruth and D. R. Petersen (1995). "The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase." Arch Biochem Biophys **316**(1): 197-205.
- Holsken, A., M. Gebhardt, M. Buchfelder, R. Fahlbusch, I. Blumcke and R. Buslei (2011). "EGFR signaling regulates tumor cell migration in craniopharyngiomas." Clin Cancer Res **17**(13): 4367-4377.
- Hurley, J. V. (1963). "Incubation of serum with tissue extracts as a cause of chemotaxis of granulocytes." Nature **198**: 1212-1213.
- Jorissen, R. N., F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward and A. W. Burgess (2003). "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling." Exp Cell Res **284**(1): 31-53.
- Katso, R., K. Okkenhaug, K. Ahmadi, S. White, J. Timms and M. D. Waterfield (2001). "Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 615-675.
- Kohutek, Z. A., C. G. diPierro, G. T. Redpath and I. M. Hussaini (2009). "ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration." J Neurosci **29**(14): 4605-4615.
- Krawczyk, W. S. (1971). "A pattern of epidermal cell migration during wound healing." J Cell Biol **49**(2): 247-263.

F. Bibliografie

- Ligon, K. L., E. Huillard, S. Mehta, S. Kesari, H. Liu, J. A. Alberta, R. M. Bachoo, M. Kane, D. N. Louis, R. A. Depinho, D. J. Anderson, C. D. Stiles and D. H. Rowitch (2007). "Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma." Neuron **53**(4): 503-517.
- Liu, W., A. A. Akhand, M. Kato, I. Yokoyama, T. Miyata, K. Kurokawa, K. Uchida and I. Nakashima (1999). "4-hydroxynonenal triggers an epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition." J Cell Sci **112** (Pt 14): 2409-2417.
- Minyailenko, T. D., V. P. Pozharov and M. M. Seredenko (1990). "Severe hypoxia activates lipid peroxidation in the rat brain." Chem Phys Lipids **55**(1): 25-28.
- Oudard, S., F. Arvelo, L. Miccoli, F. Apiou, A. M. Dutrillaux, M. Poisson, B. Dutrillaux and M. F. Poupon (1996). "High glycolysis in gliomas despite low hexokinase transcription and activity correlated to chromosome 10 loss." Br J Cancer **74**(6): 839-845.
- Park, C. H., D. E. Bergsagel and E. A. McCulloch (1971). "Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay." J Natl Cancer Inst **46**(2): 411-422.
- Pawson, T. and J. Schlessingert (1993). "SH2 and SH3 domains." Curr Biol **3**(7): 434-442.
- Pryor, W. A. and N. A. Porter (1990). "Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids." Free Radic Biol Med **8**(6): 541-543.
- Ramana, K. V., A. Bhatnagar, S. Srivastava, U. C. Yadav, S. Awasthi, Y. C. Awasthi and S. K. Srivastava (2006). "Mitogenic responses of vascular smooth muscle cells to lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): role of aldose reductase-catalyzed reduction of the HNE-glutathione conjugates in regulating cell growth." J Biol Chem **281**(26): 17652-17660.
- Rappl, A., G. Piontek and J. Schlegel (2008). "EGFR-dependent migration of glial cells is mediated by reorganisation of N-cadherin." J Cell Sci **121**(Pt 24): 4089-4097.
- Rasper, M., A. Schafer, G. Piontek, J. Teufel, G. Brockhoff, F. Ringel, S. Heindl, C. Zimmer and J. Schlegel (2010). "Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity." Neuro Oncol

F. Bibliografie

- 12**(10): 1024-1033.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Rossi, M. A., F. Fidale, A. Garramone, H. Esterbauer and M. U. Dianzani (1990). "Effect of 4-hydroxylalkenals on hepatic phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-phospholipase C." Biochem Pharmacol **39**(11): 1715-1719.
- Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson and D. Bowtell (1993). "The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1." Nature **363**(6424): 83-85.
- Salsbury, A. J. (1975). "The significance of the circulating cancer cell." Cancer Treat Rev **2**(1): 55-72.
- Schlegel, J., G. Piontek, B. Budde, F. Neff and A. Kraus (2000). "The Akt/protein kinase B-dependent anti-apoptotic pathway and the mitogen-activated protein kinase cascade are alternatively activated in human glioblastoma multiforme." Cancer Lett **158**(1): 103-108.
- Schlegel, J., G. Stumm, K. Brandle, A. Merdes, G. Mechttersheimer, N. E. Hynes and M. Kiessling (1994). "Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma." J Neurooncol **22**(3): 201-207.
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano and P. B. Dirks (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer and R. O. Mirimanoff (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-996.
- Suc, I., O. Meilhac, I. Lajoie-Mazenc, J. Vandaele, G. Jurgens, R. Salvayre and A. Negre-Salvayre (1998). "Activation of EGF receptor by oxidized LDL." FASEB J **12**(9): 665-671.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." Cell **61**(2): 203-212.

F. Bibliografie

- Uno, K., K. Kato, G. Kusaka, N. Asano, K. Iijima and T. Shimosegawa (2011). "The balance between 4-hydroxynonenal and intrinsic glutathione/glutathione S-transferase A4 system may be critical for the epidermal growth factor receptor phosphorylation of human esophageal squamous cell carcinomas." Mol Carcinog **50**(10): 781-790.
- Vatsyayan, R., P. Chaudhary, A. Sharma, R. Sharma, P. C. Rao Lelsani, S. Awasthi and Y. C. Awasthi (2011). "Role of 4-hydroxynonenal in epidermal growth factor receptor-mediated signaling in retinal pigment epithelial cells." Exp Eye Res **92**(2): 147-154.
- Verbeek, B. S., S. S. Adriaansen-Slot, T. M. Vroom, T. Beckers and G. Rijksen (1998). "Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts." FEBS Lett **425**(1): 145-150.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.
- Ward, S. G., P. Finan and M. J. Welham (2003). "PI3K comes of age." Nat Immunol **4**(1): 2.
- Wolf, A., S. Agnihotri, J. Micallef, J. Mukherjee, N. Sabha, R. Cairns, C. Hawkins and A. Guha (2011). "Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme." J Exp Med **208**(2): 313-326.
- Yan, H., D. W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B. A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G. J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, B. Vogelstein and D. D. Bigner (2009). "IDH1 and IDH2 mutations in gliomas." N Engl J Med **360**(8): 765-773.
- Zarkovic, N., Z. Ilic, M. Jurin, R. J. Schaur, H. Puhl and H. Esterbauer (1993). "Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal." Cell Biochem Funct **11**(4): 279-286.
- Zarkovic, N., M. H. Tillian, J. Schaur, G. Waeg, M. Jurin and H. Esterbauer (1995). "Inhibition of melanoma B16-F10 growth by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal." Cancer Biother **10**(2): 153-156.

F. Bibliografie

Zhang, M., M. Shoeb, J. Goswamy, P. Liu, T. L. Xiao, D. Hogan, G. A. Campbell and N. H. Ansari (2010). "Overexpression of aldehyde dehydrogenase 1A1 reduces oxidation-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells." J Neurosci Res **88**(3): 686-694.

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Univ. Prof. Dr. med. J. Schlegel bedanken. Er hat mir ermöglicht, in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen. Ausgehend von einer umfangreichen Einführung in die Thematik der Migration, des oxidativen Stoffwechsels sowie der Stammzellbiologie von glialen Tumorzellen begleitete und unterstützte er mich stets mit anregenden Diskussionen und mehr als umfassendem Hintergrundwissen, wann immer es nötig war.

Darüber hinaus möchte ich mich ebenfalls bei Andrea Schäfer, Julia Köritzer und Ingrid Hoepner bedanken für die schöne Zeit und kollegiale Atmosphäre im Labor.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, Freunden und meiner baldigen Ehefrau Lisa Jandl für den unersetzlichen Rückhalt während meiner Doktorarbeit.

Lebenslauf

Michał Mariusz Szyper

geboren am 29.06.1986 in Oppeln / Polen

Schulische Ausbildung

2006

Abitur am Robert-Koch-Gymnasium in Deggendorf (Note 1,5)

Akademische Ausbildung

10/2008 - 11/2012

Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der TU München / Klinikum rechts der Isar; 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

10/2006 - 09/2008

Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der LMU München; 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

Dissertation

Seit 09/2009

Doktorarbeit bei Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel, Professur für Neuropathologie, Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Weiterbildung zum Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

07/2013 - 06/2017

Weiterbildungsassistent zum Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in der Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar (Technische Universität München) Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Bier

Seit 07/2017

Weiterbildungsassistent zum Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in der HNO Praxis Holzkirchen (Dr. W. Huber)