

**Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische
Anatomie der Technischen Universität München**
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

**Die strahleninduzierte Migration von Glioblastomzellen und deren
Blockade**

Anja Carmen Pickhard

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prüfer der Dissertation:

Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

1. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

2. Priv.-Doz. Dr. C. Nieder
(schriftliche Beurteilung)

Priv.-Doz. Dr. H. C.-W. Geinitz
(mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 03.04.2007 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.06.2007
angenommen.

gewidmet
meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	3
Problemstellung	3
Klassifikation der Astrozytome	4
Signalwege	5
Therapie	8
Ziel der Arbeit	10
II. Material und Methoden	11
1. Material	11
Puffer und Reagenzien	11
Zelllinien	13
Geräte	13
2. Methoden	15
Zellkultur	15
Radiatio	17
Akuter Wundheilungsversuch	17
MTT-Test	18
Proteinisolierung	20
Bradford-Assay	20
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
Western Blot	22
Immunnachweis	22
Immunpräzipitation	23
Statistik	24
III. Ergebnisse	25
1. Biologische Effekte	25
Migrationsverhalten unter Radiatio	25
Festlegung der Strahlendosis	25
Akuter Wundheilungsversuch	27
MTT-Test	32
2. Biochemische Effekte	34
Bestimmung des Zeitpunkts der Proteinisolierung	34
Western Blot und Immunpräzipitation	34

IV. Diskussion	41
Eingesetzte experimentelle Methoden	42
Strahleninduzierte Migration	44
Signalwegsvermittelte Migration	45
Blockade der für Migration verantwortlichen Signalwege	46
Therapeutische Ansätze	48
V. Zusammenfassung	51
VI. Literaturverzeichnis	53
VII. Abkürzungsverzeichnis	61

I. Einleitung

Problemstellung

Astrozytome zählen zu den häufigsten primären Hirntumoren. Dabei ist das Glioblastom, das auch den Endpunkt der Tumorprogression bei Astrozytomen darstellt, durch eine extrem schlechte Prognose gekennzeichnet. So beträgt das durchschnittliche Überleben der Patienten nach Diagnosestellung weniger als ein Jahr (Tran, 2006). Gründe hierfür sind vor allem das ausgeprägt infiltrative Wachstum der Tumoren sowie die zwangsweise unzureichend im Gesunden erfolgende operative Exstirpation der Tumoren. Aus verbliebenen Tumorzellen nach Operation entwickelt sich oft ein Rezidiv, das häufig durch die enorme Proliferationskapazität den Krankheitsverlauf terminiert. Die notwendige adjuvante Therapie erreicht häufig nur einen temporären Effekt und scheitert vor allem an der ausgeprägten Therapieresistenz der malignen Gliome. Wie neuere Ergebnisse zeigen (Wilde-Bode, 2001 / Hegedus, 2004 / Wick, 2002), scheint die Radiotherapie das infiltrative Wachstum maligner glialer Zellen sogar noch zu fördern. Die enorme Proliferationskapazität gerade der hochmalignen glialen Tumoren beeinflusst dann den klinischen Verlauf durch die rapide intrakranielle Raumforderung (Holland, 2000).

Zusätzlich kann das klinische Verhalten der Gliome durch Schlagwörter wie Proliferation, Migration und Anti-Apoptose charakterisiert werden. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass dieses Verhalten der Tumoren vor allem auf genetische Veränderungen der dem Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) nachgeschalteten Signalwege beruhen könnte (Testa, 2001). Hierbei müssen vor allem der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K)-abhängige Signalweg und die Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK)-Kaskaden erwähnt werden. Neuere Ergebnisse zeigen, dass die PI3K-abhängige Aktivierung der Proteinkinase B (PKB / Akt) nicht nur für die Anti-Apoptose verantwortlich zu sein scheint, sondern auch bei der zellulären Migration involviert ist (Tamura, 1998).

Dass der EGF-Rezeptor eine außerordentlich wichtige Rolle für das Wachstumsverhalten von Gliomen spielt, spiegelt die Arbeit von Schlegel (1994) wider, in der gezeigt werden konnte, dass die Amplifikation des EGFR-Gens mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch Saito 2006. Allerdings gibt es hierzu sehr widersprüchliche Arbeiten; so zeigte Quan

2005, dass die Amplifikation des EGF-Rezeptors keine prognostische Signifikanz aufweist.

Von diesen unterschiedlichen Beobachtungen ausgehend interessierte in dieser Arbeit vor allem, ob die Migration bei Gliomen tatsächlich - wie von Wilde-Bode 2001 gezeigt - durch Strahlentherapie induziert werden kann. Zusätzlich sollte dabei untersucht werden, ob die dem EGF-Rezeptor nachstehenden Signalwege für die strahleninduzierte Migration verantwortlich gemacht werden können und ob es Möglichkeiten gibt, diese mit spezifischen Inhibitoren zu blockieren.

Klassifikation der Astrozytome

Die Astrozytome gehören zu den häufigsten primären Hirntumoren. Hierbei muss allerdings zwischen den hauptsächlich bei Kindern und Jugendlichen auftretenden, lokal begrenzt wachsenden Tumoren wie beispielsweise dem pilozytischen Astrozytom und den diffus und infiltrativ wachsenden Tumoren des Erwachsenenalters wie dem anaplastischen Astrozytom oder dem Glioblastom unterschieden werden (Schlegel, 2004).

Die WHO-Klassifikation unterscheidet bei den diffus infiltrierenden Astrozytomen drei Grade (WHO-Grade II-IV). Dabei geben anaplastische Veränderungen nicht nur Anhalt über die Prognose des Patienten, sondern erlauben auch die Einteilung in die verschiedenen Grade. Ein zusätzliches Vorliegen von Tumorgewebsnekrosen und/oder Gefäßproliferationen erübrigt die Diagnose eines Glioblastoms (WHO-Grad IV) (Kleihues, 2000).

Das Konzept der schrittweisen Tumorprogression wurde erstmals von Nowell gezeigt (Nowell, 1986). Fearon und Vogelstein konnten 1987 / 1988 dieses Konzept für das Coloncarcinom auf molekularer Ebene nachweisen. 1999 konnte Kleinhues zeigen, dass diese Tumorprogression auch bei Astrozytomen vorkommt: Dabei führen unterschiedliche genetische Veränderungen zum Glioblastom. So zeichnen sich *de novo* Glioblastome durch Polysomie des Chromosoms 7 und Verluste des Chromosoms 10 aus sowie molekulargenetisch durch Amplifikation des EGFR-Gens und eine Deletion des PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosom ten)-Gens. Im Gegensatz dazu weisen sekundäre Glioblastome eine Mutation des TP53-Gens auf.

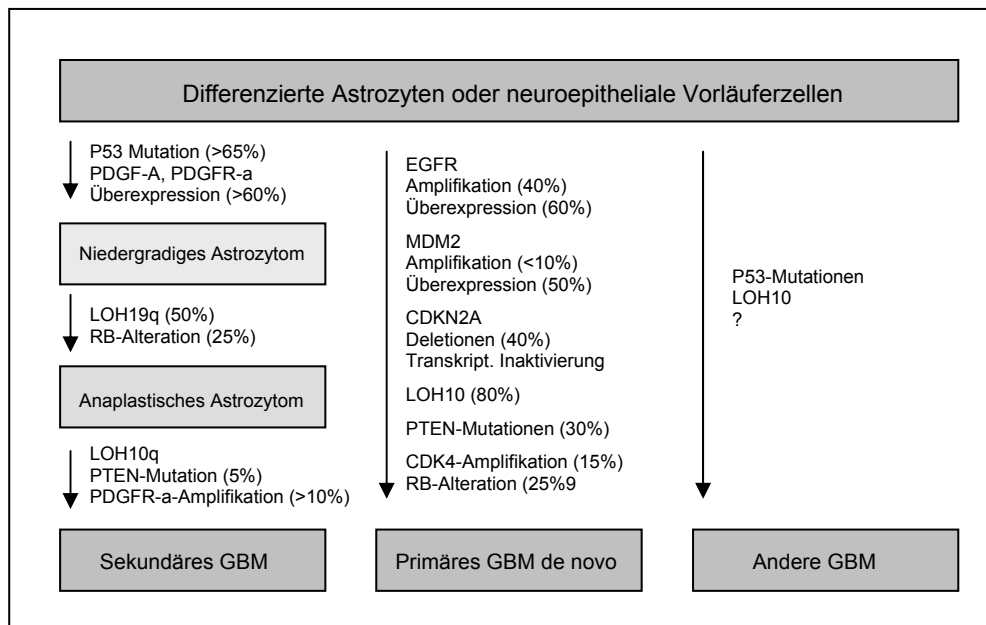


Fig. 1
Prinzip der Tumorprogression bei Gliomen (aus Schlegel, 2004).

Signalwege

Die zellulären Determinanten des klinischen Verhaltens - Proliferation, Migration und Anti-Apoptose - scheinen zum Teil durch genetische Veränderungen an Zielstrukturen der zellulären Signaltransduktion beeinflusst zu werden. Dabei spielen unter anderem der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K)-abhängige Signalweg und die Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK)-Kaskaden eine große Rolle in der Tumorbilogie (Testa, 2001). Die MAPKs vermitteln eher mitogene Signale, während vor allem die PI3K-abhängige Aktivierung der Proteinkinase B (PKB/Akt) der wesentliche anti-apoptotische Signalweg der Zelle zu sein scheint. Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieser Signalweg auch bei der zellulären Migration involviert ist (Tamura, 1998).

Die häufigsten genetischen Veränderungen in Glioblastomen betreffen - wie bereits erwähnt - den Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und die PTEN-Phosphatase. Beide Aberrationen führen zu funktionellen Konsequenzen in der intrazellulären Signaltransduktion. Es konnte gezeigt werden, dass PTEN Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat in der D3-Position dephosphoryliert und damit

der direkte Gegenspieler der PI3K ist. PTEN-Knockout-Mäuse zeigten eine konstitutive Aktivierung des MAPK- und des PI3K/PKB-Signalweges in transgenen Mäusen induzierten Tumoren, die humanen Glioblastomen entsprachen (Holland, 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in PTEN-defekten Tumoren eine Blockade des PKB/Akt-Zielmoleküls mTOR/FRAP (Mammilian target of Rapamycin) zu einer effizienten Wachstumsinhibition führt (Neshat, 2001).

Die intrazellulären Signaltransduktionswege stellen ein attraktives funktionelles System zum Verständnis der Tumorbilogie dar. Darüber hinaus erscheint eine Beeinflussung der Signalwege als therapeutischer Ansatz höchst vielversprechend.

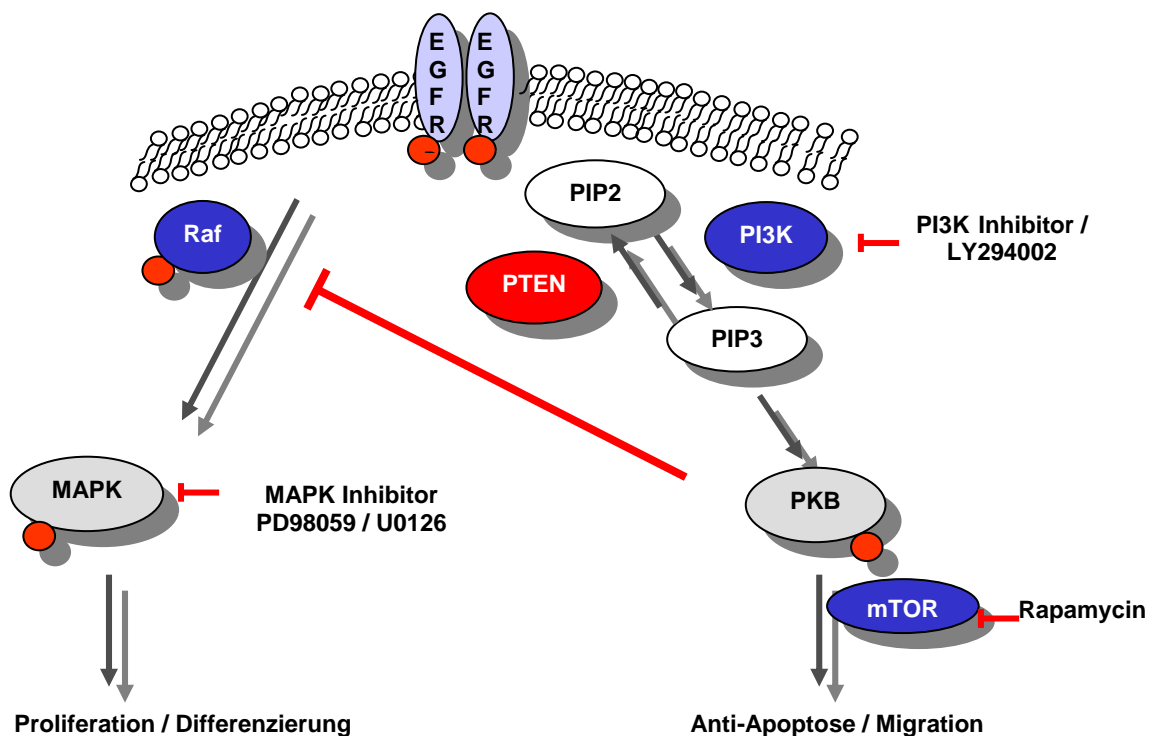


Fig. 2
Schematische Darstellung der verschiedenen Pathways.

Die Beschäftigung insbesondere mit funktionellen Veränderungen der Rezeptor-Tyrosinkinase der EGFR-Genfamilie in Tumoren des Nervensystems konnte zeigen, dass eine Amplifikation des EGFR-Gens in 45% aller Glioblastome auftritt und mit einer Verkürzung des rezidivfreien Intervalls im Vergleich zu Patienten

einhergeht, deren Tumoren keine Genamplifikation aufweisen (Schlegel, 1994). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei Jarvela (2006), wobei eine Gen-Amplifikation in 32% korrelierend mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten nachgewiesen werden konnte. Aufgrund dieser Resultate scheinen Alterationen des EGFR-abhängigen Signalweges zu einer klinisch relevanten Veränderung im Wachstumsverhalten der Tumoren zu führen. In einem experimentellen Hirntumormodell der Ratte konnte mit dominant-negativen Konstrukten des ErbB2/HER2neu (Human epidermal growth factor receptor 2)-Gens, das eine hohe Homologie zum EGFR-Gen aufweist und in den experimentellen Tumoren durch eine Punktmutation aktiviert wird, eine deutliche Reduktion der Proliferation unter niedrigen Serumbedingungen und im Koloniebildungs-Assay nachgewiesen werden (Schlegel, 1997). Diese Daten deuten auf eine wesentliche Rolle rezeptorvermittelter zellulärer Signaltransduktionswege in der Wachstumskontrolle in Tumoren des Nervensystems hin. Die Charakterisierung der in glialen Tumoren beteiligten Signalwege ergab eine Dissoziation der beiden Signalwege der MAPK-Kaskade und der PI3K-abhängigen Signaltransduktion (McCubrey, 2006 / Schlegel, 2000). Tumoren mit PTEN-Deletion zeigten eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges, während in Tumoren mit wild-typ PTEN-Status die MAPK-Kaskade aktiviert wurde. Durch EGF-Stimulation war die Aktivität des konstitutiv phosphorylierten Signalweges nicht weiter zu steigern, dagegen war der nicht aktivierte Signalweg sehr wohl EGF-responsibel (Schlegel, 2000). Auch Mizoguchi (2006) konnte eine Korrelation zwischen dem EGFR-Status und der PKB/Akt-Aktivierung zeigen. Diese Daten ließen sich auch an Tumor-Biopsaten *in situ* nachvollziehen (Schlegel, 2002). Auch bei Medulloblastomen konnte Hartmann 2006 nachweisen, dass die Aktivierung des PI3K/PKB-Signalwegs eine entscheidende Rolle in der molekularen Pathogenese spielt, vor allem im Zusammenhang mit der Dysregulation von PTEN. Die Steuerung insbesondere des anti-apoptotischen Signalweges scheint im Rahmen therapeutischer Interventionen interessant zu sein. So konnte bei einem Versuch durch Blockade des PI3K/PKB-Signalweges der Effekt einer experimentellen Strahlentherapie erhöht werden, was in dieser Arbeit noch näher untersucht werden soll.

Therapie

Das größte klinische Problem glialer Hirntumoren ist das bereits bei niedergradigen Tumoren ausgeprägt infiltrative Wachstum. Parameter, die vor Indikationsstellung zur chirurgischen Therapie beachtet werden sollten, sind die lokale Operabilität, d.h. die Zugänglichkeit und die Resektabilität, die eventuelle Verfügbarkeit alternativer Therapien oder Modalitäten und natürlich auch der Allgemeinzustand und das Alter des Patienten (Steiger, 2004). Darüber hinaus spielen auch die Größe und die Progressionsgeschwindigkeit eine Rolle bei der Therapieentscheidung; so wird eine chirurgische Therapie bei großen Tumoren mit einem sehr raumfordernden Effekt bevorzugt. Eine Operation weit im Gesunden verbietet sich aufgrund der Besonderheit des Organs, so dass das Wachstumsverhalten die wesentliche Einschränkung der chirurgischen Kurabilität dieser Tumorentität darstellt. Die mikrochirurgische Therapie der Gliome ist somit eine rein palliative (Stummer, 2000).

Damit stehen bei der operativen Therapie der Gliome die Aspekte Effizienz und Risikoarmut im Vordergrund. Eine retrospektive Studie der neurochirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Großhadern konnte bei mikrochirurgischer Operation von Hirnmetastasen und malignen Gliomen eine transiente Morbidität und perioperative Letalität von respektive 7,7% und 1,9% (Metastasenserie) bzw. 7,7% und 0% (Gliomserie) aufzeigen (Steiger, 2004 / Stummer, 2000). Überraschenderweise wies Muacevic 1999 eine vergleichbare Komplikationsrate bei radiochirurgischer Therapie von singulären Metastasen nach (Morbidität 8,9%, Letalität 1,8%).

Die perkutane Strahlentherapie hat mittlerweile einen hohen Stellenwert bei der Behandlung von primären und sekundären Hirntumoren. Am häufigsten findet die Strahlentherapie als adjuvante Radiatio Anwendung. Etwa zwei Wochen nach einer Operation kann mit der perkutanen Bestrahlung begonnen werden. In der Regel wird die Radiatio mit ultraharten Photonen, die in einem Linearbeschleuniger erzeugt werden, durchgeführt. Mittels Lagerungshilfen wie beispielsweise einer Kopfmaske lassen sich die notwendigen Sicherheitsabstände zum klinischen Zielvolumen deutlich reduzieren, womit der Anteil des mitbestrahlten gesunden Gehirns so gering wie möglich gehalten werden kann. Entscheidend für das Ansprechen der Therapie ist unter anderem auch die Aufteilung der Gesamtdosis (fraktionierte Radiotherapie). Eine tägliche Einzeldosis von 1,8-2,0 Gy an fünf Tagen pro Woche bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy ist beim Erwachsenen ein bewährtes Therapieschema. Als unmittelbare Folgen der Strahlentherapie sind endokrinologische,

neuropsychologische und intellektuelle Funktionseinschränkungen zu nennen. Als Spätschäden, die in der Regel irreversibel sind, können beispielsweise Leukenzephalopathien mit Persönlichkeitsveränderungen und Hirnnekrosen aufgezählt werden (Siefert, 2004).

Einen deutlich niedrigeren Stellenwert in der Therapie maligner Gliome hat die Chemotherapie. Sie wird bei einzelnen Patienten konkomitant gleichzeitig zur Bestrahlung oder nach abgeschlossener Strahlentherapie durchgeführt. Es ist auch eine verzögerte Therapie nach Auftreten eines Tumorrezidivs denkbar (Dudel, 2004). Verschiedene Faktoren erschweren die Therapie mit Chemotherapeutika. Als erstes wäre hierbei eine intakte Blut-Tumor-Schranke zu nennen. Da diese oft Defekte aufweist, ist sie so inhomogen, dass die Medikamente nicht alle Tumoreareale erreichen können. Des Weiteren erschweren chemoresistente Zellpopulationen die Therapie; nennenswert wären dabei DNA-Reparaturenzyme oder Zytostatikaresistenzgene (Tanaka, 2001). Ansätze, die diese Schwierigkeiten umgehen sollten, brachten bislang nicht den gewünschten Effekt: So konnten blockierende Substanzen der DNA-Reparaturenzyme (Esteller, 2000) oder tumornahe intraarterielle lipophile Zytostatika-Applikationen (Doolittle, 2000) keinen Erfolg verzeichnen.

Neuere Therapieansätze zielen auf die Beeinflussung spezieller molekularer Alterationen bei Gliomen ab. Diese *targeted therapy* scheint eine vielversprechende Methode zur Behandlung von Glioblastomen zu sein. Hierbei ist vor allem der epidemiale Wachstumsfaktor (EGFR) als Zielstruktur zu nennen, der bei Gliomen häufig eine Alteration aufweist. Angriffspunkt dieser Therapie stellt dabei die Variante des EGF-Rezeptors EGFRvIII dar. Aber nicht nur molekulare Strukturen auf der Zelloberfläche stellen einen möglichen Ansatzpunkt der Therapie dar; so kann durch eine gezielte Blockade des konstitutiv aktivierten PI3K/PKB-Signalwegs oder des MAPK-Signalwegs Einfluss auf das Fortschreiten des Tumors genommen werden. Zudem wird versucht, durch die Inhibition der Angiogenese Einfluss auf das Tumorwachstum zu nehmen. In diesem Zusammenhang werden derzeit verschiedene klinische Studien durchgeführt.

Ziel der Arbeit

Bei den malignen Gliomen entwickelt sich aus den zwangsläufig verbliebenen Tumorzellen nach der Operation regelmäßig das Rezidiv, das häufig durch die enorme Proliferationskapazität den Krankheitsverlauf terminiert. Die notwendige adjuvante Therapie erreicht nicht selten nur einen temporären Effekt und scheitert vor allem an der ausgeprägten Therapieresistenz der malignen Gliome. Wie neuere Ergebnisse zeigten, scheint die radiologische Therapie das infiltrative Wachstum maligner glialer Zellen sogar noch fördern zu können.

Ziel dieser Arbeit war es (I.) nachzuweisen, ob durch Radiatio tatsächlich Migration induziert wird, (II.) die für die strahleninduzierte Migration verantwortlichen Signalwege zu identifizieren und (III.) zu überprüfen, ob eine Blockade des EGFR-abhängigen Signalweges die strahleninduzierte Migration hemmt.

Um die Migration unter Strahlentherapie zu untersuchen wurden drei etablierte Gliomzelllinien herangezogen, die mit unterschiedlichen Strahlendosen behandelt wurden.

Der funktionelle Status der Signaltransduktionswege ist bei den eingesetzten etablierten Gliomzelllinien gut charakterisiert, wobei Unterschiede in der Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges bei den Zelllinien vorliegen.

Die Bedeutung des EGFR-abhängigen PI3K/PKB-Signalweges für die Migration und Infiltration sollte durch die Gabe spezifischer chemischer Inhibitoren analysiert werden. Andere Komponenten der intrazellulären Signaltransduktion sollten durch weitere chemische Inhibitoren hinsichtlich eigener Effekte und Summationseffekte auf die Migration untersucht werden. Die biologischen Effekte wurden dann durch akuten Wundheilungsversuch und MTT-Test festgehalten.

Die biochemische Analyse der Signalwege unter den genannten experimentellen Bedingungen geschah mit Hilfe von Western Blot-Untersuchungen mit phosphorylierungssensitiven Antikörpern.

II. Material und Methoden

1. Material

Puffer und Reagenzien

30% Acrylamid-/0,8%Bisacrylamidlösung	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
1M Tris-OH/HCl, pH 8,8	18,5g Tris (Base) (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) ad 100ml H ₂ O _{bidest.} , mit 1M HCl (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) pH auf 8,8 einstellen
1M Tris-OH/HCl, pH 6,8	6g Tris (Base) (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) ad 100ml H ₂ O _{bidest.} , mit 1M HCl (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) pH auf 6,8 einstellen
10% SDS	10g Sodiumdodecylsulfat (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) ad 100ml H ₂ O _{bidest.}
10% APS	1g Ammoniumperoxidsulfat (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) ad 10ml H ₂ O _{bidest.}
Elektrodenpuffer	3g Tris (Base) (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe), 14,4g Glycin (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) und 1g SDS (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) ad 1000ml H ₂ O _{bidest.}
Laemmli-Probenpuffer	1ml 0,5M Tris-OH/HCl pH 6,8, 0,8ml Glycerin (E. Merck, Darmstadt), 1,6ml 10% SDS, 0,8g Dithiotreitol (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe), 4,6ml H ₂ O _{bidest.}

	0,05% (w/v) Bromphenolblau (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
Anodenlösung I – pH 10,5	3g Tris (Base) (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) und 200ml Methanol (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) p.a. ad 1000ml H ₂ O _{bidest.}
Anodenlösung II – pH 10,4	3,03g Tris (Base) (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) und 200ml Methanol (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) p.a. ad 1000ml H ₂ O _{bidest.}
Kathodenlösung – pH 7,5	5,2g ε-Amino-Caprone Säure (= 6-Amino-Hexansäure) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 200ml Methanol (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) p.a. ad 1000ml H ₂ O _{bidest.}
Waschpuffer	0,9% NaCl (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe), 10mM Tris-OH/HCl pH 7,4, 0,2% Tween20 (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
Verdünnungspuffer für Antikörper und Konjugat	Waschpuffer + 5% Magermilchpulver (BETA GmbH, Essen)
0,01% Triton X-100	10µl Triton X-100 (ICN Biomedicals, Ohio) ad 100ml Dulbecco's PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
0,2mg/ml Bovine Serum Albumin	0,2µl BSA (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) ad 1ml 0,01% Triton X-100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Protein Assay, Farbstoffkonzentrat/PBS 10ml Protein Assay, Farbstoffkonzentrat
(Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
ad 30ml Dulbecco's PBS (PAA
Laboratories GmbH, Pasching)

Zelllinien

Zelllinie	Tumor	Alter Geschlecht	Tumorloka- lisation ^a	PTEN Status Codon	p53 Status Codon
LN18	de novo G	65 / m	RT	WT	238/WT
LN229	de novo G	60 / w	RFPO	WT	98
LNZ308	de novo G	65 / m	RPO	Exon 6	null/null

Tab. 1

Quelle: Ishii, 1999

^a R: rechts, T: temporal, F: frontal, P: parietal, O: occipital

Der funktionelle Status der Signaltransduktionswege ist bei den eingesetzten etablierten Gliomzelllinien gut charakterisiert. Durch PTEN-Mutation zeigt die Linie LNZ308 eine konstitutive Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges, während die Linie LN229 einen normalen PTEN- und PI3K/PKB-Status aufweist. LN18 zeigt eine EGFR-abhängige Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges.

Geräte

Zellzähler: CASY1, Modell TT
isotone Salzlösung: CASYton

Schärfe System GmbH, Reutlingen

Zentrifuge, Typ 4K-15

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Wasserbad, Typ 1002

Gesellschaft für Labortechnik mbH,
Burgwedel

Cleanbanc: Hera safe, Typ HS 12 Inkubator: Cytoperm 2	Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Hanau
MS1 Minishaker	IRA Works Inc., Wilmington
Eppendorf Research-Pipetten Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop: Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Göttingen
Absaugpumpe, Typ N035.3AN.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Beckman DU530, Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter Inc., Fullerton
Olympus SC 35 Camera	Olympus Schweiz AG, Volketswil
ASYS Hitech DigiScan, ELISA Reader	ASYS Hitech GmbH, Eugendorf
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine SRX-101°	Konica Minolta GmbH, Unterföhring
Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Siemens elektronik, Gefrierschrank	Siemens AG, München
SANYO Ultra low, Gefrierschrank	SANYO Fisher Sales GmbH, München

2. Methoden

Zellkultur

Die Zellkultivierung erfolgte mittels Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (D-MEM) (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), dem 10% Fötale Bovines Serum (FBS) (Biochrom AG, seromed, Berlin), 1% L-Glutamin 200mM (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 Einheiten/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin) (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zugegeben wurden. Falls die Zellen für längere Zeit eingefroren werden sollten, wurde dem Grundmedium noch zusätzlich 5% DMSO (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) zugefügt. Die Lagerung erfolgte dann bei -80°C im Gefrierschrank SANYO Ultra low.

Die benötigten Plastikprodukte stammten von der Firma Sarstedt AG & Co., Nümbrecht. Die Gewebepplatten mit den adhärennten Zellen wurden im Inkubator Cytoperm 2 (Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Hanau) bei 37°C , 5% CO_2 und 92% rH aufbewahrt.

Für Zellexperimente wurde eine 70-90%ige Konfluenz des Zellrasens angestrebt. Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurden diese zunächst einmal in Dulbecco's PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching) geschwenkt und danach für 5 Minuten mit 0,05% Trypsin / 0,53mM EDTA•4Na (GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) inkubiert.

Die Zellzählung, zur Herstellung bestimmter Zellkonzentrationen, erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe eines elektronischen Zellzählers, CASY1 Modell TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen). Hierzu wurden 50µl der Zellsuspension mit 10ml einer isotonen Salzlösung (CASYton) gemischt und hierauf deren Zellkonzentration durch den CASY1 Zellzähler bestimmt. Daran anschließend konnte die gewünschte Verdünnung hergestellt werden.

Für anschließende Versuche wurden die Zellen mit verschiedenen Inhibitoren bzw. Wachstumsfaktoren stimuliert. Es gab zwei unterschiedliche Stimulationsprotokolle, je nachdem ob die Zellen zur Proteinisolierung (Bestimmung des biochemischen Effekts) oder für andere Assays (Bestimmung des biologischen Effekts) vorbereitet wurden. Die Reagenzien wurden dabei direkt zum Medium dazugegeben.

Inhibitor - Wachstumsfaktor	Hersteller	Konzentration	Zeitpunkt der Zugabe vor Radiatio	
			Biochem. Assay	Biolog. Assay
Rapamycin (C ₅₁ H ₇₉ NO ₁₃)	Biomol Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting	100nM	1h	12h
LY294002 (C ₁₉ H ₁₇ NO ₃)	Calbiochem, EMD Biosciences, Inc, Darmstadt	50µM	30min	12h
PD98059 (C ₁₆ H ₁₃ NO ₃)	Biomol Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting	50µM	30min	12h
U0126 (C ₁₈ H ₁₆ N ₆ S ₂)	Biomol Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting	25µM	30min	---
Epidermal Growth Faktor (EGF)	Upstate biotechnology, New York	10ng/ml	15min	12h

Tab. 2
Benutzte Inhibitoren und Wachstumsfaktoren in dieser
Arbeit

An die erfolgte Radiatio schlossen sich die Proteinisolierung nach weiteren 24h, die Auswertung des Scratch-Testes nach 12h und die Durchführung des MTT-Tests nach 12h, 24h und 72h an. Auf die einzelnen Assays wird weiter unten noch ausführlicher eingegangen.

Radiatio

Die experimentelle Radiatio der Zellen erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Molls). Hierfür stand der Linearbeschleuniger MX2 von Siemens zur Verfügung. Der Versuchsaufbau sah vor, dass die Zellkulturplatten zwischen je zwei Plexiglasscheiben von 1cm zu liegen kamen. Die applizierte Strahlendosis betrug zwischen 2Gy und 10Gy und erfolgte mit einer Stärke von 6MeV aus einem Cobalt-60-Bestrahlungsgerät. Hierbei wurde das Dosimeter direkt vor der Strahlenbehandlung kalibriert und auf einen Abstand von 1m eingestellt.

Akuter Wundheilungsversuch

Dieser Test, der auch häufig als *Scratch-Test* bezeichnet wird, stellt eine einfache Methode dar, um einen schnellen Überblick über das Migrationsverhalten von Zellen zu erlangen.

Nach Aussäen der Zellen 48h vor Bestrahlung wurden die Inhibitoren bzw. die Wachstumsfaktoren in den oben erwähnten Konzentrationen zugesetzt. Unmittelbar vor Radiatio wurde auf der Rückseite einer 10cm-Zellkulturplatte mit Hilfe einer Schablone ein Gitternetz zur Orientierung aufgetragen. Danach wurden die Zellen in der Mitte der Platte mit Hilfe einer Pipettenspitze abgekratzt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellplatten für ca. 5 Minuten in den Brutschrank gestellt und anschließend an definierten Stellen, die mit Hilfe des Gitternetzes auf der Rückseite der Schale gefunden werden konnten, fotografiert. Hierauf wurden die Gewebepplatten für weitere 12h inkubiert und anschließend erneut an bereits markierten Stellen abgelichtet. Dabei wurde ein 4-facher Ansatz gewählt.

Die Ergebnisse für Migration bzw. Proliferation wurden 12h nach Bestrahlung der Zellen erhoben, da zu einem späteren Zeitpunkt die Proliferationsrate zu hoch war und die sehr dicht aneinanderliegenden Zellen nicht mehr ausgezählt werden konnten. Aus diesem Grund wurde der Zeitpunkt 12h nach Radiatio ausgewählt, um die migrierenden Zellen zu bestimmen. Wie bereits erwähnt, wurden Bilder zum Zeitpunkt 0h, d.h. unmittelbar nach Bestrahlung, und 12h, nach Behandlung der Zellen, erstellt. Mit Hilfe einer Schablone wurden die migrierenden Zellen ermittelt

und anschließend ausgezählt. Zusätzlich wurde die Zellzahl zum Zeitpunkt 0h und 12h bestimmt. Mit nachstehender Formel wurde der Proliferationsindex berechnet:

$$PI = ((T_2 - T_1) / T_1) \times 100$$

PI: Proliferationsindex
 T₁: Zellzahl zum Zeitpunkt 0h
 T₂: Zellzahl zum Zeitpunkt 12h

Dieser Wert wurde dann bei der Berechnung des Migrationsindex subtrahiert, da unserer Meinung nach die hohe Proliferationsrate Zellen in den ‚Scratch-Spalt‘ drängte und es sich somit um keine reine Migration handelte. Folgendermaßen wurde die Migration ausgewertet:

$$MI = (M - (M \times ((T_2 - T_1) / T_1)) / T_1) \times 100$$

MI: Migrationsindex
 T₁: Zellzahl zum Zeitpunkt 0h
 T₂: Zellzahl zum Zeitpunkt 12h
 M: Migrierende Zellen

MTT-Test

Die Quantifizierung zellulärer Proliferation erfolgte anhand des MTT-Tests (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg). Ebenso können auch Aussagen über anti-proliferative Effekte getroffen werden. Der Test dient der Messung metabolischer Aktivität von Zellen. Dabei kommt es zu einer Ringspaltung des wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes MTT durch die mitochondriale Dehydrogenase lebender Zellen in das wasserunlösliche dunkelblaue Formazan. Dieses Formazan kann durch organische Lösungsmittel wieder in Lösung gebracht werden und bei einer Wellenlänge von 550nm photometrisch bestimmt werden.

Analog zum akuten Wundheilungsversuch wurde der MTT-Test durchgeführt. So wurden 48h vor Bestrahlung die Zellen auf eine 96-well-Platte ausplattiert (1000 Zellen/well) und nach 36h die Faktoren wie oben aufgeführt zugesetzt. Dabei wurde ein 4-facher Ansatz gewählt. Nach erfolgter Bestrahlung wurde die spectrophotrische Absorbenz der Proben 12h, 24h bzw. 72h später in einem ELISA-Reader (ASYS HITECH DigiScan) gemessen. Hierbei betrug die Wellenlänge 570nm und die Referenz-Wellenlänge 650nm.

Um die geeignetste Zellzahl zu eruieren, die pro 96-well ausplattiert werden sollte, wurden in einem Vorversuch 500, 1x 10³, 1,5x 10³, 2x 10³ und 5x 10³ Zellen/well ausgesät und nach 12h die Absorption gemessen.

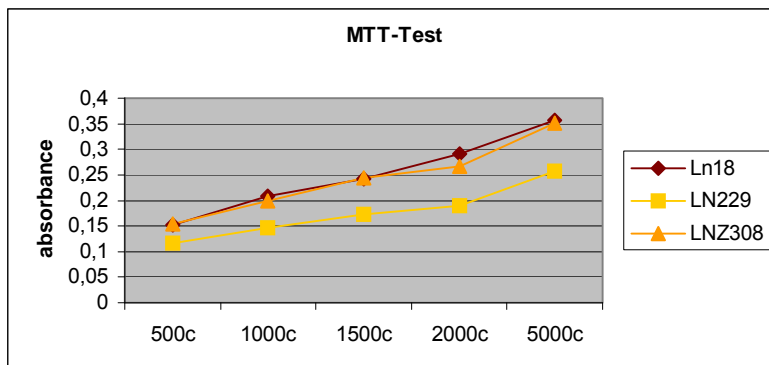


Fig. 3
Bestimmung der Absorption
bei unterschiedlicher Zellzahl.

Anhand dieser Ergebnisse wurden für anschließende Versuche immer 1×10^3 Zellen/well ausgesät.

Da erst 48h, nachdem die Zellen ausplattiert worden waren, die Bestrahlung erfolgte, war zu erwägen, ob in dieser Zeit die Zellen nicht schon enorm proliferierten und so das Ergebnis verfälschten. Deshalb wurden erneut Zellen ausgebracht, die nach 12h, 48h und 60h gemessen wurden. Der 12h-Wert entsprach in diesem Fall der Zeit, die Zellen benötigten, um zu adhären, der 48h-Wert stellte den Zeitpunkt dar, zu dem die Radiatio erfolgte, während der 60h-Wert dem Zeitpunkt entsprach, in dem im anschließenden Versuch die erste Messung erfolgte. Man erkennt anhand der nachstehenden Abbildung, dass innerhalb der ersten 48h keine Proliferation stattfindet, so dass sich die anschließenden Messergebnisse rein auf die erfolgte Proliferation nach Radiatio beziehen.

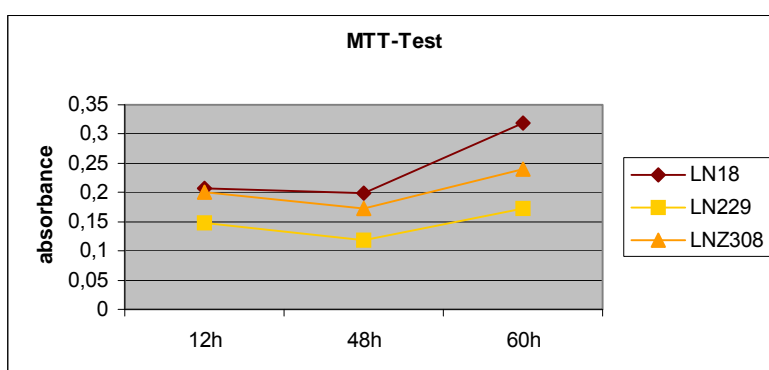


Fig. 4
Ab 48h, dem Zeitpunkt der
Radiatio, konnte eine Proliferation
gefunden werden.

Proteinisolierung

24h nach Radiatio erfolgte die Isolierung von Protein. Dazu wurde nach Spülung mit PBS (Dublecco's PBS, PAA Laboratories GmbH) 1x Lyse-Puffer (Cell Lysis Buffer, NEB) zugegeben. Für eine 10cm-Petrischale war ein Volumen von 500µl Lyse-Puffer ausreichend. Die anschließende Inkubation auf Eis betrug 15 Minuten. Die Zellen wurden dann mittels Zellschaber abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde danach bei 4°C 15 Minuten lang bei 10000rpm (Eppendorf Centrifuge 5417 R) zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde abpipettiert und das Lysat anschließend bei -20°C (Siemens elektronik Gefrierschrank) eingefroren.

Bradford-Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Es wurde der Proteinbestimmungs-Assay der Firma Bio-Rad, München, nach Angaben des Herstellers verwendet. Von den zu untersuchenden Proben wurden Doppelbestimmungen in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Messung des Leerwertes, der Standards und der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 595nm mit dem Photometer Beckman DU530 (life science UV/Vis Spectrophotometer). Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit der Standardkurve ermittelt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinlysaten wurde durch diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) mit einer Bio-Rad-Apparatur (Mini-PROTEAN 3 Cell) durchgeführt. Es wurden sowohl 10%ige als auch 12,5%ige Polyacrylamid-Trenngele, abhängig von der

Proteingröße des im Anschluss durch Immundetektion dargestellten Proteins, und 5%ige Sammelgele verwendet:

Trenngel	10%	12,5%
Acrylamide/Bis (30% / 0,8%)	1,67ml	2,1ml
1M Tris pH 8,8	1,87ml	1,87ml
Aqua dest.	1,43ml	1,0ml
20% SDS	0,025ml	0,025ml
TEMED	0,002ml	0,002ml
10% APS	0,025ml	0,025ml

Sammelgel	5%
Acrylamide/Bis (30% / 0,8%)	0,835ml
1M Tris pH 6,8	0,625ml
Aqua dest.	3,49ml
20% SDS	0,025ml
TEMED	0,005ml
10% APS	0,025ml

Tab. 3
Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben 1:4 mit Laemmliprobenpuffer verdünnt und fünf Minuten bei 94°C denaturiert. Es wurden pro Spur 5µg Gesamtprotein auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde der Proteinmarker der Firma BioLabs (Prestained Protein Marker, Broad Range) mitgeführt. Die Laufzeit betrug bei einer Stromstärke von 500mA und einer konstanten Spannung von 120V etwa 60-120 Minuten.

Western Blot

Der Proteintransfer von präparativen SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen erfolgte nach dem Prinzip des „Semi-dry-blottings“ nach Kyhse-Andersen (Kyhse-Andersen, 1984) mit einem Semidry Blotter (Trans-Blot® SD Bio-Rad, München). Der Proteinaufbau wurde mit einem diskontinuierlichen Puffersystem mit folgendem luftblasenfreien Schichtenaufbau von der Anode zur Kathode durchgeführt: sechs Lagen Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) angefeuchtet mit Anodenlösung I, drei Lagen Filterpapier und die Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel) angefeuchtet mit Anodenlösung II, das Polyacrylamidgel und neun Lagen Filterpapier getränkt mit der Kathodenlösung. Der Transfer erfolgte unmittelbar nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese für eine Stunde bei einer Stromstärke von 230mA. Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurde die Nitrocellulosemembran mit Absättigungspuffer für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach wiederholtem Spülen mit TTBS konnte die Membran für den spezifischen Immunnachweis verwendet werden.

Immunnachweis

Der erfolgte Immunnachweis von Proteinen wurde in modifizierter Form nach Vogel (Vogel, 1986) durchgeführt.

Die Nitrocellulosemembranen wurden über Nacht mit einem monoklonalen Antikörper in den wie weiter unten aufgeführten Verdünnungen unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Es folgten drei zehninütige Waschschrte mit Waschpuffer und eine zweistündige Inkubation mit polyvalentem Anti-Rabbit-Peroxidase-Konjugat (Anti-Rabbit Antibody, MRP linked IgG, Cell Signaling Technology, Inc.) in einer 1:2000-Verdünnung. Nach dreimaligem Waschen wurden die immunreaktiven Proteine durch die Peroxidase-Reaktion mit einer fluoreszierenden Lösung (ECL Detection System, Amersham Biosciences UK) markiert und durch Auflage eines Röntgenfilms (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences UK) sichtbar gemacht.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Phospho-PKB/Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology, Inc.	1:1000
PKB/Akt	Cell Signaling Technology, Inc.	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology, Inc.	1:1000
p44/42 MAPK	Cell Signaling Technology, Inc.	1:1000
Cleavage PARP	Cell Signaling Technology, Inc.	1:1000
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling Technology, Inc.	1:1000
Phospho-Raf (Ser259)	Cell Signaling Technology, Inc.	1:1000

Tab. 4
Verwendete Antikörper in dieser Arbeit

Immunpräzipitation

Nach erfolgter Proteinisolierung wurden 200µg des gewonnenen Proteins mit 1x Lysis Puffer (Cell Lysis Buffer, NEB) auf ein Endvolumen von 1ml verdünnt. Anschließend wurden 3µg des Antikörpers 14-3-3 β zugegeben. Die Proben inkubierten unter Schütteln über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde jeder Probenlösung 60µl Protein G (Upstate biotechnology, New York) zugegeben und es erfolgte eine erneute Inkubation der Proben für 2h bei 4°C unter Schütteln. Nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit 1x Lysis-Puffer wurde nach erneuter Zentrifugation das Zellpellet in 25µl Laemmlipobenpuffer resuspendiert. Die Proteine wurden hierauf für 10 Minuten bei 94°C denaturiert. Abschließend wurden 20µl des Überstandes auf das Gel aufgetragen.

Die anschließende SDS-Gelelektrophorese und Immundetektion erfolgte wie weiter oben bereits ausführlich beschrieben.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
14-3-3 β (FL-246)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	3 μ g / 1ml

Tab. 5
Antikörper für die Immunpräzipitation

Statistik

Zur Ermittlung der Signifikanz bei der Auswertung des akuten Wundheilungsversuchs wurde als parameterfreies Prüfverfahren der Fisher exact-Test durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe des StatXact-5 erhoben.

III. Ergebnisse

1. Biologische Effekte

Migrationsverhalten unter Radiatio

Zu Beginn der Arbeit wurde das Migrationsverhalten verschiedener Zelllinien untersucht. So wurde die Zahl migrierender Zellen der Linien LN18, LN229 und LN308 unter Bestrahlung mit 2Gy, 4Gy, 6Gy, 8Gy und 10Gy in Beziehung zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Zu diesem Zweck wurde der akute Wundheilungsversuch (siehe S.18) verwendet. Dazu wurden die Zellen 72h lang beobachtet; mit steigender Strahlendosis stellte sich eine Zunahme migrierender Zellen dar. Allerdings gestaltete sich das Migrationsverhalten der einzelnen Zelllinien unterschiedlich: So migrierten die Zellen der Zelllinien LN18 und LN229 wesentlich rascher und zu einem höheren Prozentsatz als die der Zelllinie LN308. Im nachfolgenden Diagramm wurde dieser Sachverhalt nochmals dargestellt:

	0 Gy			2 Gy			4 Gy			6 Gy			8 Gy			10 Gy		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Ln 18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Ln 229	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
LnZ 308	o	o	+	o	o	+	o	o	+	o	o	+	o	o	+	o	+	+

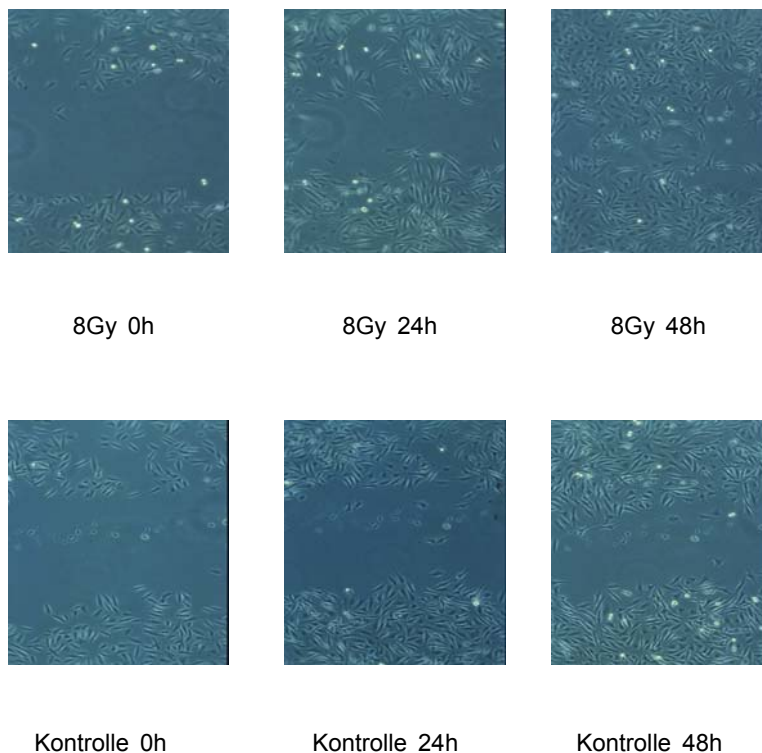
Fig. 5
Die Zelllinien LN18, LN229 und LN308 zeigen ein unterschiedliches Migrationsverhalten unter Radiatio.

o keine Migration
+ leichte Migration
++ mittelgradige Migration
+++ starke Migration

Festlegung der Strahlendosis

Anschließend an dieses Experiment wurden Zellen einer stärker migrierenden Zelllinie - nämlich LN229 - nochmals mit 2Gy, 4Gy, 6Gy, 8Gy und 10Gy bestrahlt und

mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Hierbei sollte die ideale Strahlendosis und der geeignete Zeitpunkt für die Auswertung des akuten Wundheilungstests eruiert werden. Deshalb wurden nach 0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 32h, 48h und 72h Fotos erstellt und anschließend ausgewertet. Es stellte sich heraus, dass bereits nach 8h migrierende Zellen zu beobachten waren.



*Fig. 6
Unter Radiatio kann ein
gesteigertes Migrationsver-
halten der Zellen beobachtet
werden.*

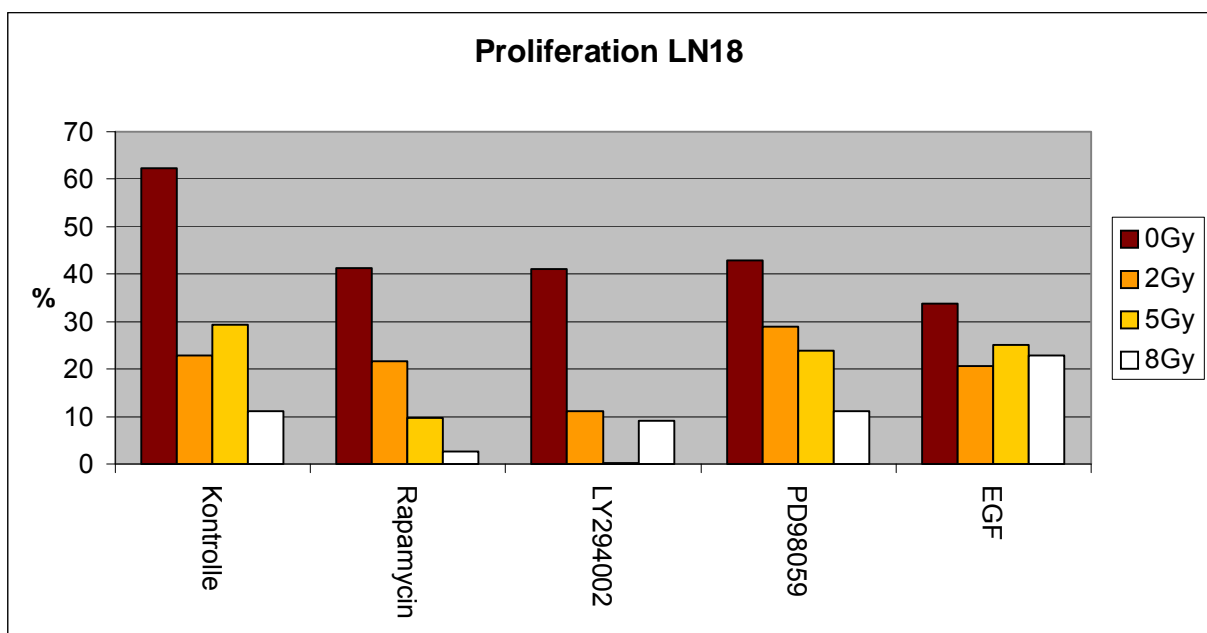
Zudem zeigte sich wie zuvor ein zunehmendes migrierendes Verhalten der Zellen mit steigender Strahlendosis. Aus diesem Grund wurden für zukünftige Versuche Strahlendosen von 2Gy, 5Gy und 8Gy sowie eine Kontrolle verwendet. Der Zeitpunkt der Auswertung des akuten Wundheilungsversuchs wurde auf 12h festgesetzt, da zu einem späteren Zeitpunkt die Zellen durch die hohe Proliferationsrate zu dicht lagen, um sie auszählen zu können.

Zusätzlich wurden die bestrahlten Zellen für weitere drei Wochen kultiviert und danach nochmals einem akuten Wundheilungsversuch unterzogen. Hierbei wurden dieselben Ergebnisse wie bei den unmittelbar nach Radiatio erhobenen Daten erlangt.

Akuter Wundheilungsversuch

Der Test wurde, wie auf Seite 17 ausführlich beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse für Migration bzw. Proliferation 12h nach Bestrahlung der Zellen erhoben. Da es unserer Meinung nach aufgrund eines hohen Proliferationsdrucks zu einer Verdrängung von Zellen in den ‚Scratch-Spalt‘ kommt, wurde ein so genannter Proliferationsindex bei der Migrationsermittlung subtrahiert.

Mit Hilfe einer Schablone wurden die migrierenden Zellen ermittelt und anschließend ausgezählt. Zusätzlich wurde die Zellzahl zum Zeitpunkt 0h und 12h bestimmt. Hierdurch war auch eine Aussage über die Proliferation möglich. Die so ermittelten Werte ergaben folgendes Bild für die Proliferation:



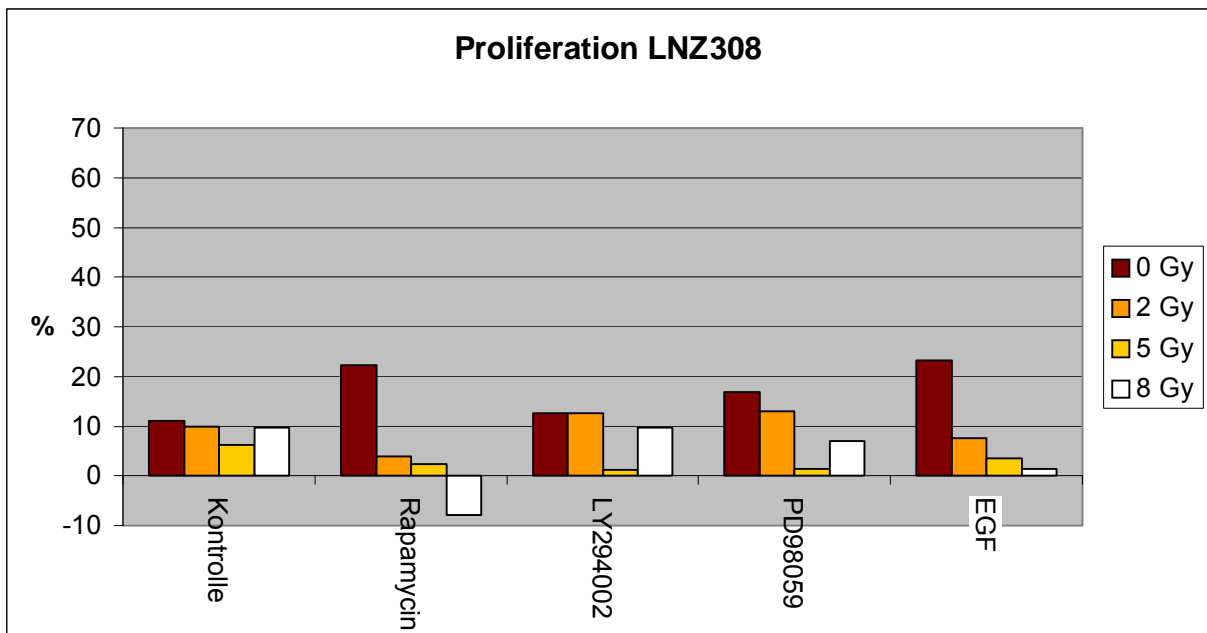
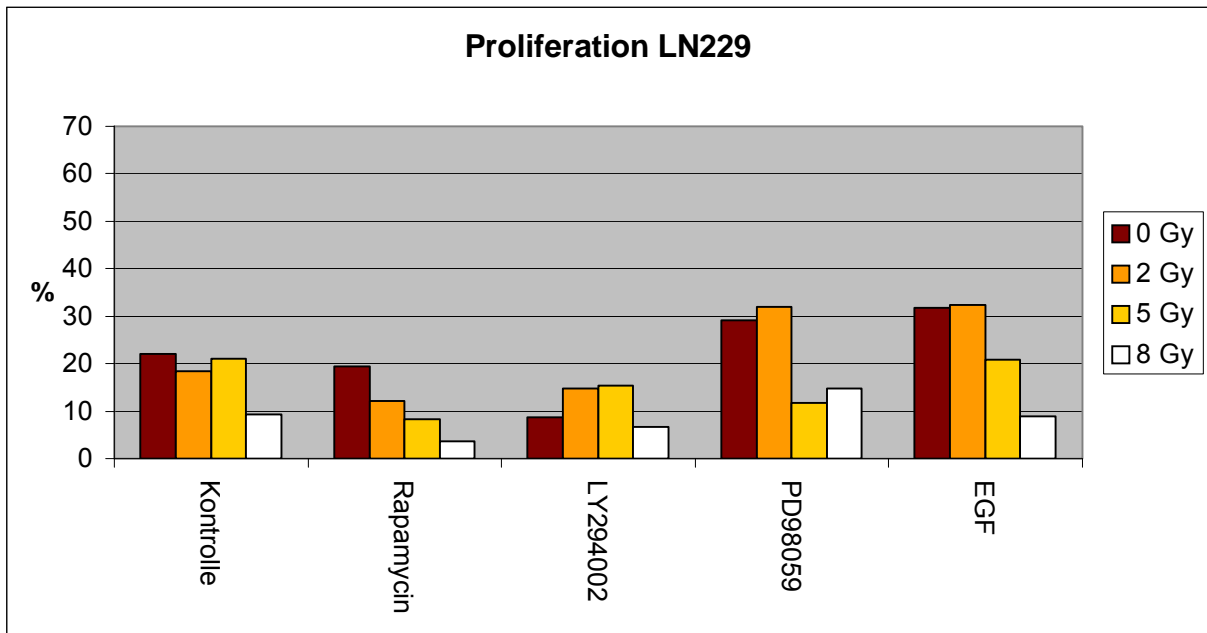


Fig. 7

Die Proliferation nimmt mit zunehmender Grayzahl ab.

Folgendermaßen wurde der Prozentsatz proliferierender Zellen ermittelt:

$$PI = ((T_2 - T_1) / T_1) \times 100$$

PI: Proliferationsindex

T₁: Zellzahl zum Zeitpunkt 0h

T₂: Zellzahl zum Zeitpunkt 12h

Man erkennt, dass mit steigender Grayzahl die Proliferation in allen Zelllinien abnimmt. Zudem ist zu erwähnen, dass dies unabhängig davon geschieht, ob die Zellen mit Inhibitoren oder mit Wachstumsfaktoren behandelt werden.

Es bleibt noch anzumerken, dass die Zellen der Linie LN229 nach Bestrahlung noch für drei Wochen weiterkultiviert wurden. Da sich der biologische Effekt, der unmittelbar nach Applikation einer bestimmten Strahlendosis nachweisbar ist, weitestgehend verflüchtigte, der biochemische Effekt, auf den weiter unten noch ausführlich eingegangen wird, sich nicht von den zuvor erhobenen Daten unterschied, wurde dieser Versuchsansatz wieder fallen gelassen. Im Übrigen ist noch zu berichten, dass die mit 8Gy behandelten Zellen nach spätestens zwei Wochen abstarben.

Bei der Auswertung der Migrationsdaten fiel auf, dass die Anzahl migrierender Zellen abhängig von der Strahlendosis war:

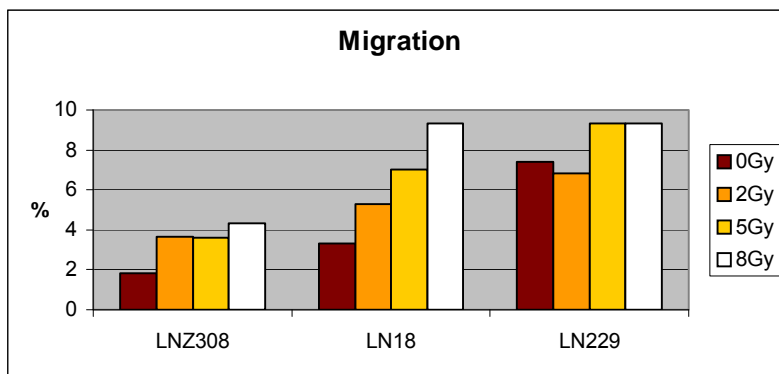


Fig. 8

Die Migration war abhängig von der applizierten Strahlendosis.

Der Prozentsatz migrierender Zellen wurde wie folgt errechnet:

$$MI = (M - (M \times ((T_2 - T_1) / T_1)) / T_1) \times 100$$

MI: Migrationsindex

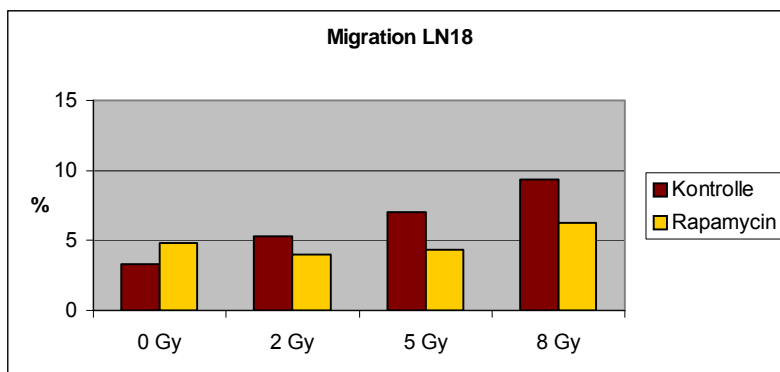
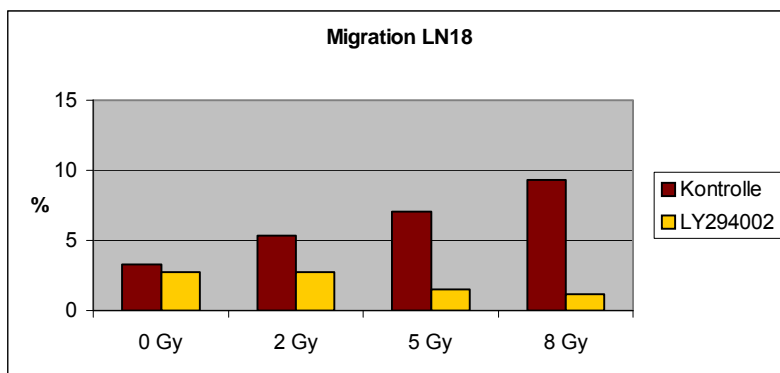
T₁: Zellzahl zum Zeitpunkt 0h

T₂: Zellzahl zum Zeitpunkt 12h

M: Migrierende Zellen

Dabei konnte allerdings nur bei der Zelllinie LN18 bei 8Gy ($p=0,0048$) eine statistisch relevante Zunahme der Migration gefunden werden.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass der PI3K-Inhibitor LY294002 die strahleninduzierte Migration hemmen kann. Statistische Relevanz fand sich nur bei den Zelllinien LN18 und LN229 (siehe Fig. 10). Auch Rapamycin führt zu einer Hemmung der Migration, abhängig von der Strahlendosis, wenn auch in geringerem und statistisch nicht relevantem Maße.



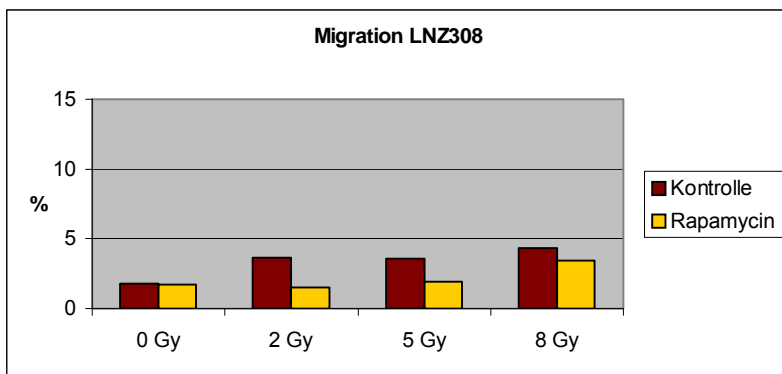
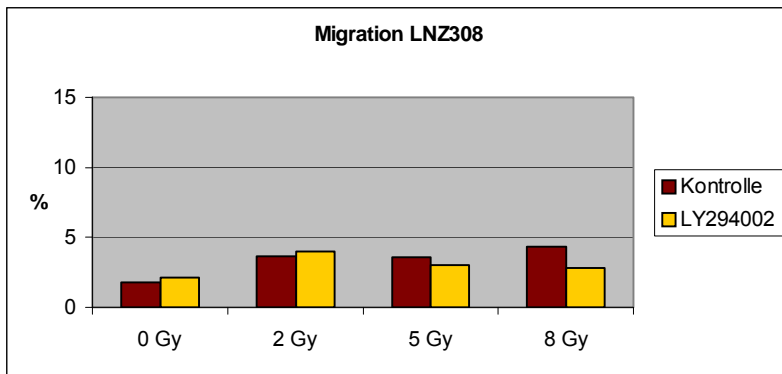
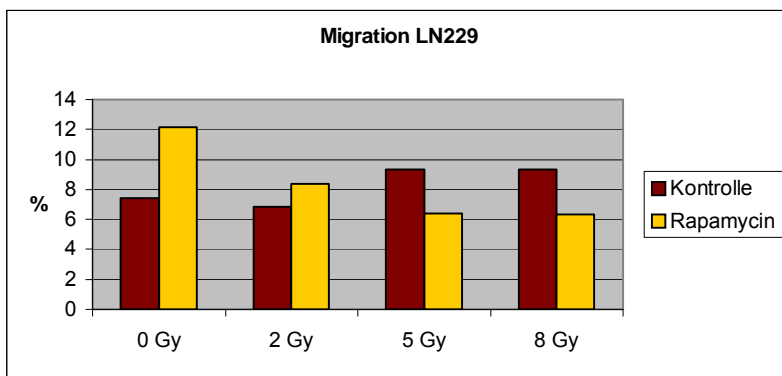
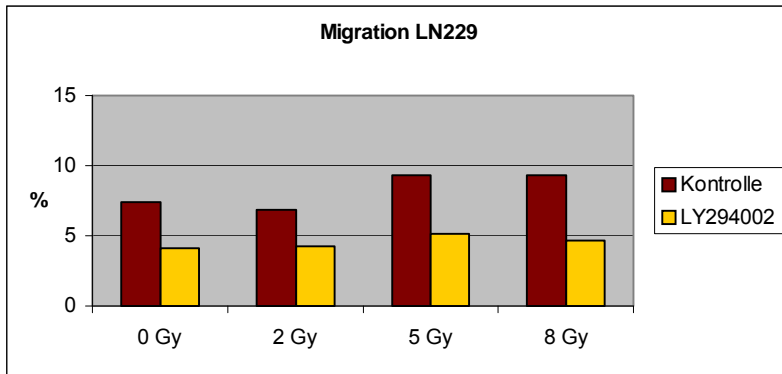


Fig. 9
Die Anzahl migrierender Zellen kann durch den PI3K-Inhibitor LY294002 reduziert werden.

Darüber hinaus zeigte sich auch eine signifikante Abnahme der Migration nach Radiatio bei gleichzeitiger Inhibition des ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Signalweges mit PD98059, während es unter Stimulation mit EGF zu keiner signifikanten Zunahme der vermehrt migrierenden Zellen unter Radiatio kam (siehe Fig.10).

Zelllinie	Inhibitor	Strahlendosis			
		0Gy	2Gy	5Gy	8Gy
LN18	Rapamycin	0,7280	0,4013	0,0519	0,0261
	LY294002	0,0617	0,0644	0,0002	0,0000
	PD98059	0,0059	0,0081	0,0023	0,0000
	EGF	0,0008	0,6512	0,5712	0,4806
LN229	Rapamycin	0,2105	0,4883	0,1630	0,2969
	LY294002	0,4267	0,2280	0,0776	0,0937
	PD98059	0,8156	0,4256	0,0265	0,0642
	EGF	1,0000	0,6458	0,7803	0,3314
LNZ308	Rapamycin	1,0000	0,4053	0,5018	0,7875
	LY294002	1,0000	1,0000	1,0000	0,4135
	PD98059	0,4299	1,0000	0,1284	0,3882
	EGF	0,0366	0,1320	0,4247	0,5012

Fig. 10
Tabellarische Auflistung der errechneten p -Werte.

MTT-Test

Die Auswertung der Ergebnisse dieses Versuchs ergab bei allen Zelllinien eine Abnahme der Proliferation bei gleichzeitiger Inhibition der Signalwege. Hierbei zeigte der PI3K-Inhibitor LY294002 die größte Auswirkung auf das proliferative Verhalten der Zellen, während Rapamycin und PD98059 weniger anti-proliferativ wirkten. Von Bedeutung scheint noch zu sein, dass diese Effekte weniger stark bei der Zelllinie LNZ308 zu beobachten waren. Zudem sollte noch erwähnt werden, dass der „anti-proliferative Effekt“ bei niedrigeren Strahlendosen besser ausgeprägt ist. Die Stimulation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor EGF, die als Positiv-Kontrolle zu werten ist, zeigte eine Zunahme proliferierender Zellen.

Die Kontrollen, die bei jedem Versuch mitliefen, wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt.

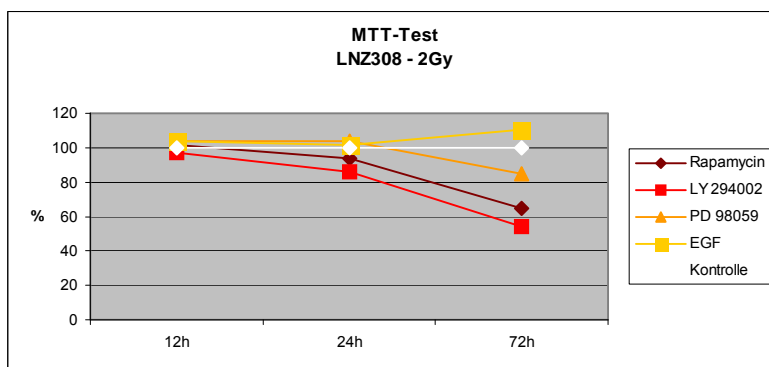
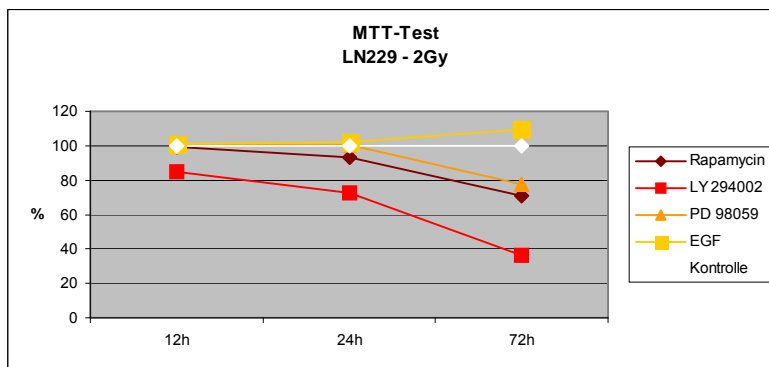
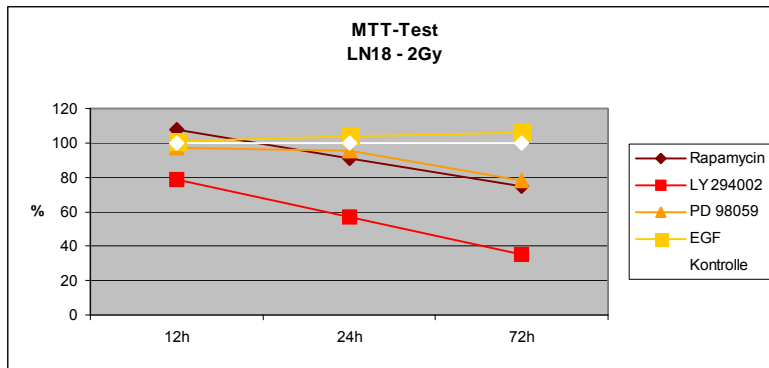


Fig. 11
Der anti-proliferative Effekt war bei den Inhibitoren des PI3K-Signalweges am deutlichsten ausgeprägt. Hier am Beispiel der mit 2Gy behandelten Zellen.

2. Biochemische Effekte

Bestimmung des Zeitpunktes der Proteinisolierung

Um den Zeitpunkt für die Proteinisolierung und um gleichzeitig den Zeitpunkt für die Zugabe der Inhibitoren zu bestimmen, wurden die Zelllinien LN18, LN229 und LN2308 24 Stunden lang in DMEM ohne FCS, aber mit 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde eine unbestrahlte Kontrollgruppe und eine mit 8Gy bestrahlte Gruppe gebildet: Die Kontrollgruppe bestand aus einer Platte unbehandelter Zellen und einer zweiten Platte, der 30 Minuten vor Proteinisolierung LY294002 zugesetzt wurde. Die zweite, bestrahlte Gruppe bestand aus drei Proben. Bei der ersten wurde nur eine Radiatio durchgeführt, bei der zweiten wurde 30 Minuten vor der Bestrahlung LY294002 zugesetzt und bei der dritten schließlich wurde 30 Minuten vor Radiatio sowie 1h nach Bestrahlung LY294002 zugeführt. Bei der bestrahlten Gruppe wurde jeweils nach 1 Stunde, nach 6 Stunden und nach 24 Stunden Protein isoliert.

Nach Abschluss dieses Experimentes wurde zukünftig 24h nach Radiatio die Proteinisolierung durchgeführt. Die Zugabe der Inhibitoren und Wachstumsfaktoren, die für diese Arbeit benötigt wurden, erfolgte nur noch vor Bestrahlung der Zellen, da kein entscheidender Unterschied zwischen der Zugabe des Inhibitors LY294002 vor bzw. nach Radiatio bestand.

Western Blot und Immunpräzipitation

24h nach Bestrahlung der Zellen erfolgte die Proteinisolierung wie unter Abschnitt 2 (siehe Seite 20) genauer erläutert. Nachdem anhand des Bradford-Assays die Proteinmengen der einzelnen Proben bestimmt worden waren, wurden je 5µg Gesamtprotein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die sich anschließende Proteindetektion erfolgte wie oben bereits ausführlich beschrieben. Um nachzuweisen, dass pro Spur gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Membranen nach vorhergehender Behandlung mit einem Phospho-Antikörper anschließend mit 1M Glycin-Lösung pH 2,5 behandelt, danach mit TTBS und schließlich mit dem Gesamtantikörper inkubiert. Folgende Ergebnisse konnten erhoben werden (Um einen Überblick zu bekommen, wurden die wichtigsten

Ergebnisse in einer Tabelle zusammengefasst. Nachfolgend wird auf die einzelnen Ergebnisse noch einmal dezidiert eingegangen):

	Rapamycin	LY294002	PD98059
p-PKB/Akt	↓	↓↓	↔
p-MAPK	↔	↑	↓
p-Raf (Immunpr. 14-3-3)	↔	↓	↔
PARP	↔	↑ unter Radiatio	↔

Fig. 12

Zur Veranschaulichung wurden die wichtigsten Western-Blot-Daten in einer Tabelle zusammengefasst.

- ↑ Aufregulation des Proteins
- ↑↑ Starke Aufregulation
- ↓ Herabregulation des Proteins
- ↔ zur Kontrolle keine Signalveränderung

Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Inhibitoren, nämlich Rapamycin, LY294002 und PD98059 behandelt und zusätzlich mit EGF stimuliert. Zur Kontrolle wurden immer unbehandelte Zellen mitgeführt. Außerdem wurden die Zellen mit 2Gy, 5Gy und 8Gy bestrahlt. Unterschiede bei den Western Blot-Ergebnissen konnten in Bezug auf die verschiedenen Strahlendosen nicht verzeichnet werden.

Phospho-PKB/Akt

Zu erwähnen ist, dass bei der Zelllinie LN229, bei der im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien keine konstitutionelle Aktivierung des PKB/Akt-Pathways besteht, die Signale deutlich schwächer waren. Unbestrahlte Zellen der Zelllinien LN18, LN229 und LN2308 zeigten bei Inhibition mit LY294002 eine Herabregulation von phospho-PKB/Akt, bei der Zelllinie LN229 konnte eine zusätzliche Herabregulation bei Inhibition der Zellen mit Rapamycin verzeichnet werden. Bei bestrahlten Zellen der Linien LN18, LN229 und LN2308 konnten ähnliche Ergebnisse

eruiert werden; bei LNZ308 konnte vor allem mit steigender Strahlendosis ein verstärktes Signal bei Inhibition mit Rapamycin gefunden werden. Sowohl die Stimulation mit EGF als auch die Inhibition mit PD98059, als auch die Bestrahlung der Zellen konnten 24h nach der zugeführten Strahlendosis keine Signaländerung bei Behandlung mit dem phospho-Akt-Antikörper hervorrufen.

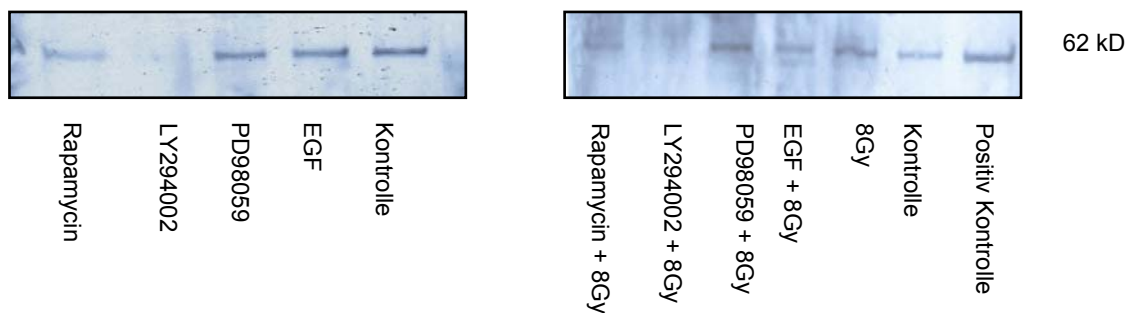


Fig. 13
Bei der Zelllinie LN18 konnte bei Blockade der PI3K mit LY294002 ein vermindertes Signal bei Western Blot-Versuchen und Immundetektion mit phospho-Akt gefunden werden, während die Behandlung der Zellen mit Rapamycin, PD98059, EGF oder die Bestrahlung der Zellen ein ähnlich starkes Signal wie die Kontrolle zeigte.

Phospho-p44/42 MAPK

Der Inhibitor PD98059 führte bei den durchgeführten Experimenten aller drei Zelllinien zu einer Herabregulation der phospho-MAP-Kinase sowohl bei Bestrahlung als auch bei den unbestrahlten Kontrollen.

Die Zelllinien LN18 und LN229 zeigten bei Zugabe von Rapamycin einen Anstieg der Kinase. Bei gleichzeitiger Bestrahlung und Inhibition von mTOR durch Rapamycin konnte nur bei der LN229-Zelllinie ein Ansteigen verzeichnet werden, während die LN2308-Linie ein vermindertes Signal zeigte.

Zusammen durchgeführte Radiatio und Inhibition der PI3-Kinase mit LY294002 führten bei den Zelllinien mit konstitutiver Aktivierung des PI3K-Pathways zu einer Vermehrung der phosphorylierten MAP-Kinase.

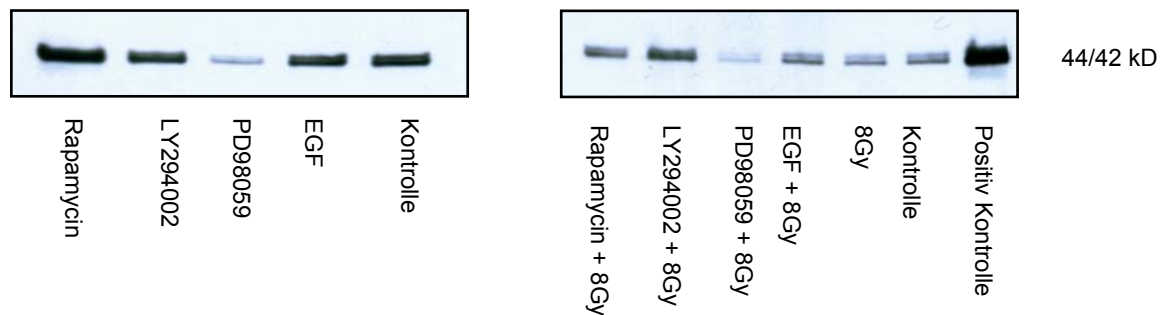


Fig. 14

Bei der Zelllinie LN18 kam es nach Inhibition der MAP-Kinase mit PD98059 zu einem verminderten Signal bei Western Blot-Versuchen und Immundetektion mit phospho-p44/42 MAPK.

Positiv Kontrolle: LN18 5 Minuten mit EGF stimuliert.

Immunpräzipitation mit 14-3-3 β / Phospho-Raf

Nachdem die Proteinlysate mit Anti-14-3-3-Protein immunpräzipitiert worden waren, konnte anschließend eine Immundetektion mit phospho-Raf erfolgen. Es zeigte sich ein Ergebnis, das darauf schließen ließ, dass eine Kreuzreaktion zwischen dem PI3K-Signalweg und dem MAPK-Weg bestand: Denn bei Blockade der PI3-Kinase mit LY294002 konnte eine verminderte Phosphorylierung von c-Raf aufgezeigt werden. Dies traf bei den bestrahlten und unbestrahlten Proben gleichermaßen zu. Lediglich die LN229-Zellen konnten bei Zugabe von Rapamycin - unabhängig von der Radiatio - eine Aktivierung von c-Raf vorweisen.

Immunpräzipitation:
anti-14-3-3 β

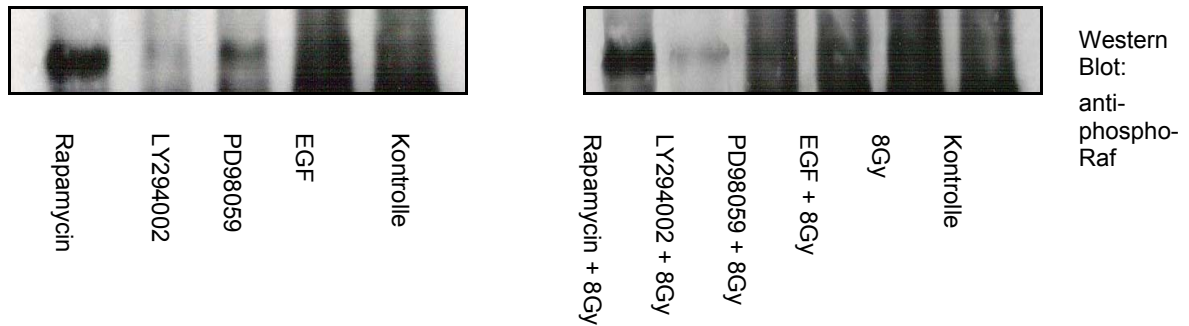


Fig. 15

Bei der Zelllinie LN229 fand sich nach Zugabe von LY294002 bei Immunpräzipitation mit anti-14-3-3 β und Immundetektion mit anti-phospho-Raf eine verminderte Signalantwort im Western Blot-Versuch.

Phospho-SAPK

Dephosphorylierte SAP-Kinase konnte bei Inhibition von MEK1 mit PD98059 gezeigt werden. Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen konnten nicht nachgewiesen werden.

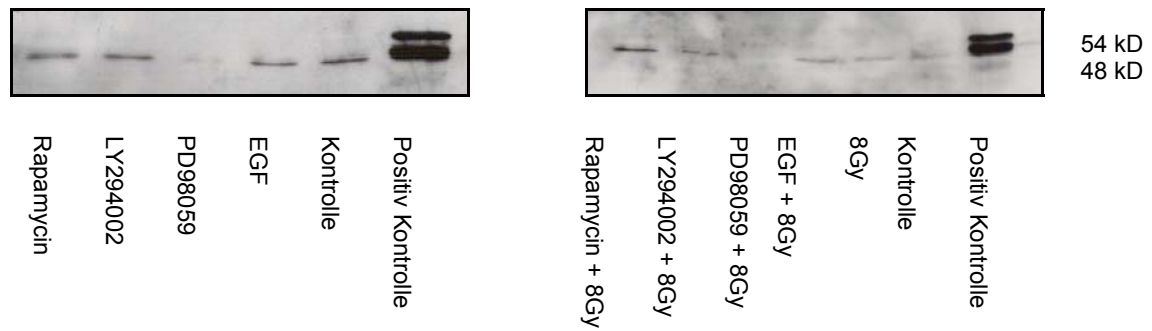


Fig. 16

Im Western Blot-Versuch fand sich bei Immundetektion mit phospho-SAPK eine dephosphorylierte SAP-Kinase bei der Zelllinie LN229 nach Inhibition von MEK1 mit PD98059.

Cleavage PARP

Bei Blockade der Zellen mit LY204002 und gleichzeitiger Behandlung mit Radiatio zeigte sich eine Aktivierung der Cleavage PARP. Ansonsten konnte kein Anstieg des Signals im Western Blot gefunden werden.

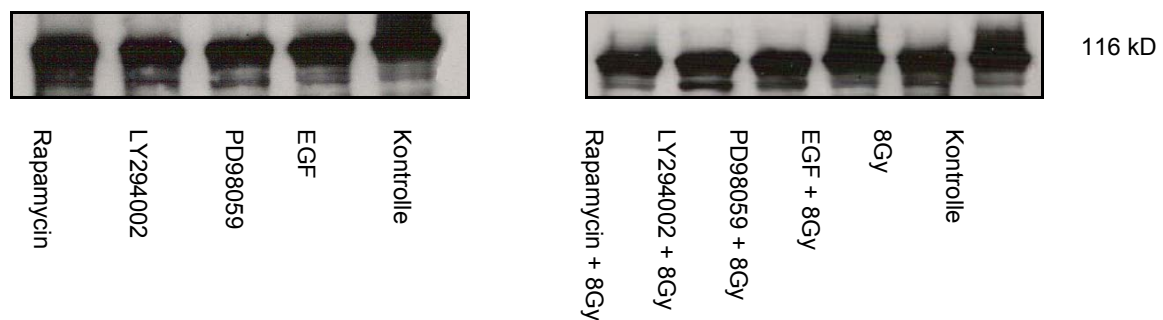


Fig. 17

Bei der Zelllinie LN18 erkennt man nach Radiatio und Inhibition mit LY294002 eine Aufregulierung des Signals nach Immundetektion mit Cleavage PARP im Western Blot im Gegensatz zu den zusätzlich durchgeführten Behandlungen mit Rapamycin, PD98059, EGF und Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle.

Phospho-PKB/Akt und phospho-p44/42 MAPK bei Doppelinhibition

Bei gleichzeitiger Inhibition der Zellen mit einem Inhibitor des PI3K/PKB-Signalweges und des ERK-Signalweges zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Bei Inhibition von mTOR mit Rapamycin und gleichzeitiger Zugabe des MEK1-Inhibitors PD98059 erfolgte eine Aufregulierung von phospho-MAPK. Im Gegensatz dazu kam es zu keinem Anstieg der phospho-MAP-Kinase bei zusätzlicher Inhibition mit U0126, welches MEK1/2 (mitogen/extracellular signal-regulated kinase) blockiert. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Blockierung der PI3-Kinase mit LY294002 erreicht. Bei Blockade des PI3K/PKB-Signalweges mit LY294002 kam es zu einer Abnahme des phospho-PKB/Akt-Signals, während die Inhibition mit Rapamycin keinen Unterschied zur Kontrolle zeigte. Die Ergebnisse waren in allen drei Zelllinien vergleichbar.

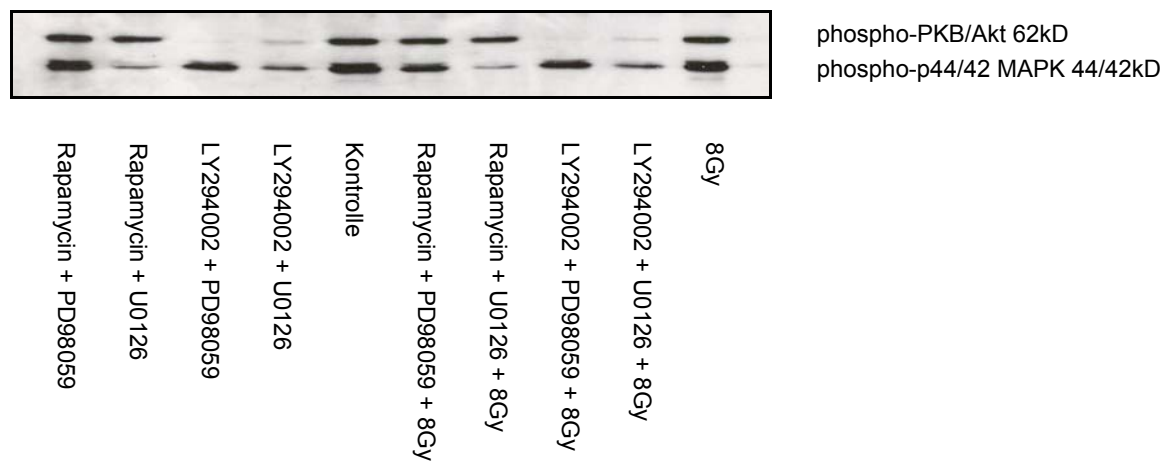


Fig. 18
Die Zelllinie LNZ308 zeigte ein starkes Signal bei Immundetektion mit phospho-MAPK bei gleichzeitiger Inhibition des PI3K-Pathways mit LY294002 und Inhibition von MEK1 durch PD98059.

IV. Diskussion

Gliomzellen zeichnen sich durch infiltratives Wachstum in das umgebende Gewebe aus. Da die Exstirpation des Tumors aufgrund der Besonderheit des Organs Gehirn nicht weit im Gesunden erfolgen kann, gilt heute die mikrochirurgische Exstirpation mit anschließender adjuvanter Strahlentherapie als therapeutische Standardtherapie.

In den letzten Jahren wurden mehrere Versuche unternommen, die Effektivität der Strahlentherapie zu optimieren, mit allerdings nur mäßigem Erfolg: Der Versuch einer Erhöhung der Strahlendosis auf über 60Gy erbrachte keine Verbesserung der lokalen Tumorkontrollraten (Pinsker, 2004): So finden sich Glioblastomzellen stark migratorisch und invasiv wachsend, weshalb es fast immer im Verlauf der Erkrankung zu einem Rezidiv kommt. Beobachtungen zeigten außerdem, dass es meist zu einem Rezidiv im Randgebiet des Primarius kommt, allerdings fast nie im Zielgebiet der Bestrahlung. Aus diesem Grund wurde die Therapie der Ganzhirnbestrahlung eingeführt (Mornex, 1993 / Hess, 1994). Allerdings konnten auch Ganzhirnbestrahlungen das Risiko eines Rezidivs nicht senken, sondern führten zu neuropsychologischen Defiziten wie beispielsweise einer Demenz (Garden, 1991). Die Einführung einer stereotaktischen Therapie hatte das Ziel eine möglichst große Dosis der Bestrahlung direkt ins Zielgebiet einzubringen und dabei eine minimale Toxizität auf das umgebende gesunde Gewebe auszuüben. Interessanterweise führte dieses Therapieregime allerdings zu einem Anstieg von Rezidiven im entfernter gelegenen Gewebe (Mornex, 1993 / Pederson, 1993).

Wie neuere Ergebnisse überraschenderweise zeigten, scheint die Radiatio sogar ein gesteigertes Migrations- und Infiltrationsverhalten zu bewirken (Wilde-Bode, 2001). Diese Daten könnten vielleicht die vorher beschriebenen vergeblichen Versuche erklären, die Rezidivhäufigkeit durch unterschiedliche Bestrahlungsarten zu senken. Wenn sich diese ersten Hinweise wirklich bestätigten, könnte das Auswirkungen auf die adjuvante Therapie in der bisherigen Form haben. Deshalb sollten in dieser Arbeit die Fragen beantwortet werden, ob (I.) Strahlentherapie mit einer erhöhten Migrationsrate einhergeht, (II.) welche intrazelluläre Signalwege mit der strahleninduzierten Migration in Zusammenhang gebracht werden können und (III.) ob die Blockade der EGFR-abhängigen Signalwege die strahleninduzierte Migration hemmt:

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nun zum Ersten *in vitro* eine Steigerung der Migration maligner humaner Gliomzellen nach experimenteller Radiatio.

Interessanterweise nahm die Zahl migrierender Zellen mit Erhöhung der Strahlendosis zu, während die Proliferation in umgekehrter Weise abnahm. Zur Beantwortung der zweiten Frage wurde in dieser Arbeit bei der Untersuchung relevanter Signalwege ausschließlich auf die Signalwege, die dem EGF-Rezeptor nachgeschaltet sind, eingegangen. Denn wie in einigen Arbeiten gezeigt werden konnte, führt die Radiatio zu einer Aktivierung des EGF-Rezeptors (Kimura, 2004 / Contessa, 1999). Es fand sich bei Western Blot-Untersuchungen kein Unterschied bei den Ergebnissen zwischen den bestrahlten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es zeigte sich eine Dephosphorylierung von PKB/Akt nach Zugabe des PI3K-Inhibitors LY294002, während nach Inhibition von MEK1 eine Herabregulation der phospho-MAP-Kinase zu verzeichnen war. Zudem sah man bei Blockade der PI3-Kinase eine verminderte Phosphorylierung von c-Raf. Diese Western Blot-Daten konnten die Ergebnisse von Zimmermann (1999) und Moelling (2002) bestätigen, dass es eine Querverbindung zwischen dem PI3-Kinase- und dem MAP-Kinase-Signalweg gibt. Darüber hinaus konnten drittens beim akuten Wundheilungsversuch mittels des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 sowohl die strahleninduzierte Migration als auch die Migration unter Standardbedingungen reduziert werden. Wir versprechen uns von diesen Ergebnissen einen Beitrag zur individuellen Therapie der Patienten beisteuern zu können, die auf molekularer Ebene basieren sollte. Diese sollte in naher Zukunft auch möglich sein.

Eingesetzte experimentelle Methoden

Vor Messung der strahleninduzierten Migration musste zunächst bedacht werden, dass Zellen nicht nur ein migratorisches Verhalten, sondern auch ein infiltratives Wachstum aufweisen. Um die Migration, Motilität oder Invasivität von Zellen bestimmen zu können, wurden in der Literatur bereits unterschiedliche Assays beschrieben. Allerdings kann es sich hierbei nur um einen Versuch handeln Migration und Invasion getrennt voneinander zu betrachten. Denn *in vivo* können die beiden Komponenten Migration und Invasion nicht unabhängig voneinander auftreten und auch der Versuch beide experimentell getrennt voneinander zu untersuchen, kann den anderen Parameter nicht komplett unterdrücken. In der hier verfassten Arbeit wurde auf den akuten Wundheilungsversuch zurückgegriffen, da dieser zum einen reproduzierbar ist und zum anderen gleichzeitig zur Migration auch die

Proliferation der Zellen bestimmt werden konnte, indem im Gesichtsfeld zur Bestimmung der migrierenden Zellen nicht nur deren Zahl, sondern auch die Gesamtzahl der abgebildeten Zellen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt wurde.

Die experimentelle Bestrahlung der Glioblastomzellen erfolgte mittels eines Linearbeschleunigers mit unterschiedlichen Strahlendosen. Zur Bestimmung der Strahlendosen wurden die Zellen zunächst mit unterschiedlichen Dosen behandelt. Hierbei zeigte sich ein zunehmendes migratorisches Verhalten der Zellen mit steigender Strahlendosis. Aus diesem Grund wurden Strahlendosen von 2Gy, 5Gy und 8Gy sowie eine Kontrolle verwendet, um die unterschiedlichen Effekte bei steigender Grayzahl festzuhalten.

Man geht davon aus, dass die strahleninduzierte Migration - wie auch Proliferation oder Apoptose - durch Signalwege vermittelt wird. Dabei scheint vor allem der PI3K/PKB-Signalweg eine entscheidende Rolle zu spielen (Meng, 2006 / Zheng, 2007). Dieser, vom EGF-Rezeptor abhängige Signalweg, sollte nun auch hinsichtlich der strahleninduzierten Migration genauer untersucht werden. Denn wie in einzelnen Arbeiten gezeigt werden konnte, bewirkt die Bestrahlung eine Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und somit eine Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege (Kimura, 2004). Die nach Radiatio sich abspielenden Interaktionen der verschiedenen Signalwege liegen aber auch weiterhin im Dunkeln.

Um genauere Aussagen über die dem EGF-Rezeptor nachstehenden Signalwege treffen zu können, wurden die drei Zelllinien LN18, LN229 und LN2308, die sich von humanen Glioblastomen ableiten, verwendet mit genau bekannten Mutationen (Ishii, 1999). Dabei zeigen zwei der Gliomzelllinien eine Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges: Durch PTEN-Mutation zeigt die Linie LN2308 eine konstitutive Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges, während LN18 eine EGFR-abhängige Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges zeigt. Die Linie LN229 hingegen weist einen normalen PTEN- und PI3K/PKB-Status auf. Durch das eventuell unterschiedliche Verhalten der Zellen auf die Blockade der einzelnen Signalwege sollen Rückschlüsse auf die Tumoren *in vivo* mit vergleichbaren Mutationen gezogen werden. Allerdings muss beachtet werden, dass wegen des nicht vergleichbaren funktionellen Status der Signaltransduktionswege die Ergebnisse auf biologischer Ebene zwischen den einzelnen Linien daher nur schlecht vergleichbar sind.

Strahleninduzierte Migration

Die Ergebnisse nach Bestrahlung der drei Zelllinien zeigten eine strahleninduzierte Migration, die mit steigender Strahlendosis zunahm. Dabei fiel auf, dass die Zelllinien mit der konstitutiven Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges mehr migrierende Zellen nach Radiatio aufwiesen, als die Zelllinie LN229 mit normalem PTEN- und PI3K/PKB-Status (siehe Fig.4).

Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse einiger Studien, die ebenfalls die Zunahme des Migrationsverhaltens von Tumorzellen unter Bestrahlung zeigten (Wilde-Bode, 2001 / Hegedus, 2004 / Wick, 2002). Allerdings fand sich bei den Arbeiten von Gliemroth (2003) und Kleynen (2003) keine Zunahme, sondern sogar eine Abnahme der Zellmigration unter Strahlentherapie. Es sollte aber erwähnt werden, dass die Invasivität der Zellen, die Gliemroth getrennt untersuchte, durch die Radiatio nicht eingeschränkt war. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass die Messung der Migration, für die in den einzelnen Arbeiten verschiedenste Methoden angewandt wurden, nicht auch die Invasion der Zellen miterfasst.

Das Migrationsverhalten der Zellen unter Radiatio wurde nicht nur für Gliomzellen untersucht, sondern beispielsweise auch für Pankreas-Carcinomzellen. Hierbei ergab sich interessanterweise ein ähnliches Bild wie bei Gliemroth: Während die Migration und Proliferation durch die Bestrahlung signifikant inhibiert werden konnten, zeigte sich nach Bestrahlung sogar ein gesteigertes invasives Potential der Zellen. Dabei muss bedacht werden, dass zwischen der Migration und Invasion der Zellen deutlich unterschieden werden muss. Diesen Unterschied *in vitro* experimentell abzubilden wirft einige Schwierigkeiten auf und man kann die beiden Vorgänge – Migration und Invasion – auch nicht komplett getrennt voneinander beurteilen. Hierzu stellt die Arbeit von Friedl (2003) einen interessanten Aspekt dar: Denn er beschreibt hierbei, dass nach Blockade verschiedener Rezeptoren zur Inhibition der Migration Tumorzellen in der Lage sind ihre Migrations- und Invasionsprogramme zu ändern.

Da bei der Bestimmung der Migration die gleichzeitige Erfassung der Proliferation einen interessanten Aspekt liefern würde, stellte der akute Wundheilungsversuch, bei dem beide Parameter parallel ausgewertet werden konnten, ein ideales Assay dar. Hierbei ergab sich, dass die Proliferation unter experimenteller Strahlentherapie mit zunehmender Strahlendosis abnahm (siehe Fig.3). Dieses Phänomen konnten auch andere Autoren an unterschiedlichen Tumorzelllinien nachweisen (Enns, 2004). Zusätzlich wurde es in der Arbeit von Enns in Zusammenhang mit dem p53-Status gebracht. Der Anstieg von p53 nach

Radiatio konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, zusammen mit einer Abnahme des Proliferationsverhaltens von bestrahlten Zellen (Fehlauer, 2004).

Signalwegsvermittelte Migration

In vorliegender Arbeit wurde hauptsächlich auf die EGFR-abhängigen Signalwege eingegangen. Hierfür verantwortlich sind einige Arbeiten, die eine Aktivierung des EGF-Rezeptors durch Radiatio zeigen konnten (Kimura, 2004 / Contessa, 1999). Zudem scheint der dem EGF-Rezeptor nachgeschaltete PI3K/PKB-Signalweg für die Migration von Bedeutung zu sein (Meng, 2006 / Zheng, 2007), weshalb auf die Frage eingegangen werden sollte, ob er zudem für die strahleninduzierte Migration verantwortlich gemacht werden kann.

Die Untersuchung der EGFR-abhängigen Signalwege ergab in dieser Arbeit folgendes Bild: Nach Blockade der PI3-Kinase mit LY294002 konnte die strahleninduzierte Migration am deutlichsten eingeschränkt werden. Rapamycin zeigte sich weniger effektiv, während die Inhibition des MAP-Kinase-Signalwegs durch PD98059 nur bei hohen Strahlendosen eine offensichtliche Auswirkung auf die Migration zeigte. Zudem ist zu berichten, dass die Zelllinien LN18 und LN2308, die eine konstitutive Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges aufweisen, auf Radiatio mit einer deutlich höheren Migrationsrate antworteten als die Gliomlinie LN229, die einen normalen PTEN- und PI3K/PKB-Status aufweist.

Wenn man unter Inhibition der Signalwege die Proliferation mittels MTT-Test betrachtet, fand sich die größte Auswirkung auf das proliferative Verhalten der Zellen bei Blockade der PI3-Kinase. Die Inhibition von mTOR oder MEK1 wirkten weniger anti-proliferativ. Diese Beobachtungen waren weniger ausgeprägt bei der Zelllinie LN2308. Zudem zeigte sich, dass der „anti-proliferative Effekt“ bei niedrigeren Strahlendosen besser ausgeprägt ist. Allerdings sollte hierbei überlegt werden, ob es sich dabei nicht um einen additiven Effekt handelt.

Einige Arbeiten identifizierten die PI3-Kinase als Regulator der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlen. Dabei steigerten die Inhibitoren der PI3-Kinase, LY294002 und Wortmannin, den antineoplastischen Effekt der gleichzeitig erfolgten Radiatio (Gupta, 2003 / Rosenzweig, 1997 / Shi, 2001). Zusätzlich wurde berichtet, dass die Expression des Tumorsuppressorgens PTEN die zelluläre Migration hemmt und dass eine *wt PTEN* Expression eine Sensibilisierung auf Strahlen bewirkt (Wick,

1999). In unserer Arbeit fand sich bei der Zelllinie LN229 (PTEN wt) die geringste Migrationszunahme nach Radiatio, während LN2308 (PTEN mut) und LN18 (PTEN wt / konstitutive Aktivierung der PI3K) einen deutlichen Anstieg von migrierenden Zellen aufwiesen. Der Versuch, die strahleninduzierte Migration zu inhibieren, gelang bei den Zelllinien mit einem wt *PTEN* deutlich besser. Hierbei konnte der Inhibitor der PI3-Kinase LY294002 den größten Erfolg verzeichnen. Ein ähnliches Ergebnis beschrieb auch Nakamura 2005. Zusätzlich fand er ein geringeres Ansprechen des mTOR-Inhibitors Rapamycin hinsichtlich der Migrationsrate der Zellen. Dieses Ergebnis konnte durch unsere Versuche bestätigt werden. Im Weiteren fand man, dass PD98059, ein Inhibitor der MEK1-Kinase, nur bei höheren Strahlendosen eine Abnahme der strahleninduzierten Migration bewirkt. Dabei muss bedacht werden, dass Li 2006 zeigen konnte, dass die Aktivierung der MAP-Kinase durch Strahlentherapie nicht ausschließlich durch eine Aktivierung des EGF-Rezeptors zustande kommt, was eventuell die Abnahme der Migration erst bei höheren Strahlendosen erklären könnte. Außerdem wies auch Hwang 2006 einen fehlenden Einfluss von PD98059 auf die Migration nach.

Blockade der für Migration verantwortlichen Signalwege

Bei den Western Blot-Ergebnissen zeigte sich erwartungsgemäß, dass bei Zelllinien mit konstitutiver Aktivierung des PI3K-Signalwegs (LN18 und LN2308) die Zugabe des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 eine Unterdrückung der Aktivierung von PKB/Akt zur Folge hatte. Dabei fand sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den bestrahlten und den als Kontrolle zusätzlich kultivierten Zellen.

Der MAPK-Signalweg war bei den drei Zelllinien LN18, LN229 und LN2308 unter Standardbedingungen immer aktiviert. Eine Steigerung der phosphoryliert vorliegenden MAP-Kinase war durch Bestrahlung nicht möglich. Der MEK1-Inhibitor PD98059 führte bei allen durchgeführten Experimenten zu einer Herabregulation der phospho-MAP-Kinase sowohl bei Bestrahlung als auch bei den unbestrahlten Kontrollen.

Zusammen durchgeführte Radiatio und Inhibition der PI3-Kinase mit LY294002 führten bei den Zelllinien mit konstitutiver Aktivierung des PI3K-Signalwegs zu einer Vermehrung der phosphorylierten MAP-Kinase.

Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass zwischen den beiden Signalwegen eine Querverbindung besteht. Die Daten der Arbeit Zimmermann et al. (1999) zeigten, dass die aktivierte Proteinkinase B (PKB/Akt) eine Phosphorylierung von cRaf bewirkt. Aus diesem Grund wurden auf der Ebene von phospho-Raf Untersuchungen durchgeführt. Es fand sich, dass eine Kreuzreaktion zwischen dem PI3K-Signalweg und dem MAPK-Weg bestand: Denn bei Blockade der PI3-Kinase mit LY294002 konnte eine verminderte Phosphorylierung von c-Raf nachgewiesen werden. Dies traf bei den bestrahlten und unbestrahlten Proben gleichermaßen zu.

Die durchgeführte Doppelinhibition mit einem Inhibitor des PI3K-Signalweges und des ERK/MAPK-Signalweges lässt außerdem eine zusätzliche Interaktion zwischen den beiden Signalwegen denkbar erscheinen. Denn bei Inhibition von mTOR mit Rapamycin und gleichzeitiger Zugabe des MEK1-Inhibitors PD98059 zeigte sich eine vermehrt vorliegende phospho-MAP-Kinase. Im Gegensatz dazu kam es zu keinem Anstieg der phospho-MAP-Kinase bei zusätzlicher Inhibition mit U0126, welches MEK1/2 blockiert. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Blockierung des PI3K-Signalwegs mit LY294002.

Wie Arbeiten anderer Forschungsgruppen zeigen, ist der EGF-Rezeptor bei vielen humanen Tumoren überexprimiert, was häufig mit einer hohen Metastasierungsrate, schlechter Prognose und kurzem Gesamtüberleben der Patienten korreliert (Milas, 2000 / Reardon, 1999). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ausschließlich das Verhalten der Zellen nach Radiatio in Bezug zum EGF-Rezeptor und seinen nachgeschalteten Signalwegen gesetzt. Zudem kann eine EGFR-Überexpression in klinischen Studien mit einem schlechten Ansprechen auf eine Radio- oder Chemotherapie assoziiert werden (Ang, 2002 / Barker, 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Bestrahlung mit therapeutischen Dosen zu einer Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors führt (Kimura, 2004 / Contessa, 1999) mit einer anschließenden Aktivierung der nachstehenden Signalkaskaden wie dem MAPK- (Contessa, 1999 / Rak, 1995) und dem PKB/Akt-Signalweg (Arteaga, 2002 / Dent, 2003). Eine Aufregulierung dieser Signalwege konnte in unserer Arbeit nicht dargestellt werden. Allerdings muss man zu bedenken geben, dass dieser Effekt höchstwahrscheinlich zum Zeitpunkt 24h nach Radiatio, an dem die Proteinisolierung stattfand, nicht mehr nachweisbar war. So war es aber in einer früheren Arbeit beispielsweise möglich, 5 Minuten nach Bestrahlung eine Aufregulation von phospho-PKB/Akt zu beobachten (Daten nicht veröffentlicht). Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine Aufregulation von phospho-PKB/Akt nach Bestrahlung finden (Park, 2006 / Loree, 2006).

Allerdings konnte eine Querverbindung zwischen den Signalwegen auf der Ebene von Raf und Akt gezeigt werden. Diese wurde erstmals 1999 von Zimmermann beschrieben: Hierbei zeigte sich, dass Akt im aktivierten Zustand zu einer Phosphorylierung von Raf führt. Die Phosphorylierung von Raf bewirkt eine Inhibition des Raf-MEK-ERK-Signalwegs. Die Interaktion zwischen den beiden Signalwegen kann auch das Phänomen erklären, dass bei einer hohen Expression von phospho-Akt phospho-MAPK nur in geringem Maße nachzuweisen war. Hierauf verweist auch Reusch in seiner Studie 2001. Zudem scheint es, dass diese Interaktion der beiden Signalwege nur bei Vorliegen von hohen Dosen des phospho-Akts getriggert wird (Moelling, 2002).

Darüber hinaus bleibt zu erwähnen, dass eine zusätzliche Querverbindung zwischen den beiden Signalwegen bestehen könnte. Diese Vermutung legen die Ergebnisse nach einer Doppelinhibition mit Inhibitoren des Akt- und des MAPK-Signalwegs nahe. Dabei zeigte sich, dass sich bei Inhibition von mTOR mit Rapamycin und gleichzeitiger Zugabe des MEK1-Inhibitors PD98059 eine Aufregulierung von phospho-MAPK ergab. Im Gegensatz dazu kam es zu keinem Anstieg der phospho-MAP-Kinase bei zusätzlicher Inhibition mit U0126, welches MEK1/2 blockiert. Auf welcher Ebene sich diese Interaktion allerdings abspielen könnte, bleibt spekulativ.

Therapeutische Ansätze

Durch die Blockade der PI3-Kinase mit LY294002 konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl die Abnahme der Proliferation unter Radiatio beobachtet werden als auch die strahleninduzierte Migration vermindert werden. Es bleibt deshalb zu überlegen, ob nicht eine zusätzliche medikamentöse Therapie mit gezielter Inhibition der PI3-Kinase zur bisherigen adjuvanten Strahlentherapie sinnvoll wäre:

Wie neuere klinische Studien aufzeigen, kann durch Inhibition des EGF-Rezeptors mit Gefitinib bei nicht kleinzelligen Lungentumoren mit einer hohen Genkopienzahl des Rezeptors das Überleben der Patienten signifikant verlängert werden (Cappuzzo, 2005). Die Wirksamkeit von Gefitinib wurde auch bei anderen Tumorentitäten wie den Prostatacarcinomen, den colorectalen Tumoren und den Ovarialcarcinomen gefunden (Yano, 2003). Zudem wird beispielsweise auch der Inhibitor der KIT-Kinase Imatinib bei gastrointestinalen Stromatumoren angewandt.

Allerdings kann durch verschiedene molekulare Mechanismen eine Therapieresistenz gegen den Inhibitor entstehen (Heinrich, 2006).

So wird in neuester Zeit auch bei Gliomen der Versuch einer so genannten *targeted therapy* durchgeführt (Mischel, 2003). Angriffspunkte können dabei die häufig überexprimierten Rezeptoren EGFR und PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) und die Mutationen und Deletionen der Tumorsuppressorgene PTEN und p53 sein. Diese Alterationen führen häufig zu einer Aktivierung der PI3K/PKB- und der Raf-MEK-ERK-Signalwege, die ihrerseits wieder ein Therapieziel darstellen. Hierbei kommen Rezeptor-Inhibitoren wie beispielsweise Gefitinib/Iressa zum Einsatz. Wie Studien zeigen, ist die gleichzeitige Expression der EGFR-Variante EGFRvIII und PTEN mit einem deutlich besseren Ansprechen der Patienten auf die Therapie assoziiert (Mellinghoff, 2005). Darüber hinaus finden Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie zum Beispiel Imatinib und Erlotinib, aber auch der Farnesyl-Transferase-Inhibitor Tipifarnib Anwendung (Newton, 2003). Zudem werden klinische Studien unternommen, um den Einsatz von Rapamycin, dem Inhibitor von mTOR, in verschiedenen Tumoren zu erproben (Xu, 2004 / Newton, 2004).

Es sollte nun überlegt werden, ob eine solche *targeted therapy* nicht mit den herkömmlichen Standardtherapien verknüpft werden kann. Wie Sartor (2004) in seiner Arbeit schreibt, bewirkt der Einsatz von EGFR-Inhibitoren einen positiven Effekt bei gleichzeitiger Anwendung der Strahlentherapie. Wie anhand der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, fördert die Strahlentherapie, die aktuell als Standardtherapie bei Gliomen eingesetzt wird, ein gesteigertes Migrationsverhalten der Zellen. Es bleibt deshalb zu überlegen, ob nicht durch eine *targeted therapy* dieser die Migration vermittelnde Signalweg ausgeschaltet werden kann. Leider konnte bisher kein Signalweg identifiziert werden, der für die strahlenvermittelte Migration verantwortlich gemacht werden kann. Allerdings konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass durch die gezielte Blockade der PI3-Kinase die strahleninduzierte Migration gehemmt werden kann, besonders bei Zelllinien mit einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs. Diese Tatsache belegt, dass verschiedene Faktoren zusammenspielen müssen, um einen Erfolg bei Inhibition spezifischer Signalwegskomponenten zu erzielen. Dies zeigen auch andere Arbeiten, in denen nachgewiesen werden konnte, dass ein Ansprechen auf eine Therapie mit einem EGFR-Kinase-Inhibitor die Coexpression von EGFRvIII und PTEN verlangt (Mellinghoff, 2005). Zudem darf nicht vergessen werden, dass ein Signalweg häufig mehrere Querverbindungen zu anderen Signalwegen aufweist. In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen den beiden Signalwegen PI3K/PKB und Raf-MEK-ERK besteht. Durch die Blockade

beispielsweise der PI3-Kinase wird somit nicht nur auf einen, sondern auf mehrere Signalwege Einfluss genommen.

Ziel sollte es meiner Meinung nach sein, in Zukunft eine individuelle Tumorthherapie, je nach vorkommenden Mutationen, anwenden zu können. Die immer besseren Aufschlüsselungen der intrazellulären Signalwege und auch die gezielte Blockade einzelner untergeordneter Faktoren weisen in die richtige Richtung und werden eine gezielte und individuelle Therapie hoffentlich bald ermöglichen.

V. Zusammenfassung

Glioblastome sind wegen ihres infiltrativen Wachstums operativ nicht im Gesunden zu resektieren. Dabei stellt insbesondere die Rand- und Infiltrationszone ein Problem dar, da fast ausschließlich von ihr die den Krankheitsverlauf zumeist terminierenden Rezidive ausgehen. Die deshalb nötige adjuvante Strahlentherapie erreicht häufig nur einen temporären Effekt. Zusätzlich zeigen neuere Studien, dass es sogar zu einer Steigerung der Migration bei Glioblastomzellen nach Radiatio kommen kann (Wilde-Bode, 2001).

Ziel dieser Arbeit war es deshalb (I.) das Migrationsverhalten von Glioblastomzellen unter experimenteller Strahlentherapie zu untersuchen, (II.) die EGF-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion hinsichtlich ihrer Bedeutung für eine mögliche strahleninduzierte Migration zu analysieren und (III.) Möglichkeiten zur Blockade einer strahleninduzierten Migration durch Inhibitoren des Phosphatidylinositol-3'-Kinase- und des Raf-MEK-ERK-Signalwegs zu identifizieren.

Unter experimenteller Strahlentherapie konnte eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation bei gleichzeitiger Steigerung der Motilität der überlebenden Zellen der eingesetzten Glioblastomzelllinien LN18, LN229 und LN2308 beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit konnten damit nicht nur die in der Literatur berichteten Befunde einer strahleninduzierten Migration glialer Tumorzellen bestätigt werden, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass dieser Effekt auch noch bei relativ hohen Strahlendosen auftritt, wie sie unter therapeutischen Bedingungen *in situ* zu erwarten sind.

Die biochemischen Effekte der experimentellen Strahlenbehandlung legen den Schluss nahe, dass die Regulation dieser Signalwege durch ionisierende Strahlung beeinflusst werden kann. In der Zusammenschau der Ergebnisse der untersuchten EGF-Rezeptor vermittelten Signalwege kann außerdem eine Querverbindung zwischen den beiden nachgeschalteten Signalwegen Raf-MEK-ERK und PI3K/PKB auf Ebene von Akt und Raf gefunden werden. Eine vermutete zweite Interaktion zwischen den beiden Signalwegen sollte in einer weiteren Arbeit noch näher untersucht werden.

Hierzu passend zeigen sich auch die erhobenen Migrationsdaten, die bei Inhibition der PI3-Kinase eine verminderte Migration aufweisen. Die zeitgleiche Abnahme der Proliferation wäre zudem eine Bestätigung des zuvor erstellten Modells, nämlich, dass der PI3K/PKB-Signalweg verantwortlich ist für Migration und Antiapoptose. Die mit der Signalwegsaktivierung auftretende verstärkte Migration

könnte zum Beispiel durch die strahleninduzierte Migration des EGF-Rezeptors erklärt werden (Kimura 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Strahlentherapie zu einem gesteigerten Migrationsverhalten glialer Tumorzellen führen kann. Da diese Migrationssteigerung durch den PI3K-Inhibitor LY294002 erfolgreich blockiert werden konnte und zusätzlich eine Abnahme der Zellproliferation beobachtet werden konnte, stellt eine Blockade des PI3-Kinase/PKB-Signalwegs einen interessanten Ansatz einer zielgerichteten Tumorthherapie maligner Gliome dar.

VI. Literaturverzeichnis

Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. 2002. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.* 62(24):7350-7356

Arteaga CL. 2002. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist.* 7:31-39

Barker FG 2nd, Simmons ML, Chang SM, Prados MD, Larson DA, Sneed PK, Wara WM, Berger MS, Chen P, Israel MA, Aldape KD. 2001. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 51(2):410-418

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M. 2005. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 97(9):643-655

Contessa JN, Reardon DB, Todd D, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, Bowers GD, Schmidt-Ullrich RK. 1999. The inducible expression of dominant-negative epidermal growth factor receptor-CD53 results in radiosensitization of human mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 5(2):405-411

Dent P, Acoub A, Contessa J, Caron R, Amorino G, Valerie K, Hagen MP, Grant S, Schmidt-Ullrich R. 2003. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signalling pathways. *Radiat Res.* 159(3):283-300

Doolittle ND, Miner ME, Hall WA. 2000. Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer.* 88(3):637-647

Dudel C, Schalhorn A. 2004. *MANUAL Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks.* 2. Auflage. Zuckschwerdt Verlag München Wien New York. pp 55-57

Enns L, Bogen KT, Wizniak J, Murtha AD, Weinfeld M. 2004. Low-dose radiation hypersensitivity is associated with p53-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res.* 2(10):557-566

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E. 2000. Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the clinical response of glioma to alkylating agents. *N Engl J Med.* 343(19):1350-1353

Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. 1987. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science.* 238(4824):193-197

Fehlauer F, Stalpers LJ, Panayiotides J, Kaaijk P, Gonzalez GD, Leenstra S, van der Valk P, Sminia P. 2004. Effect of single dose irradiation on human glioblastoma spheroids in vitro. *Oncol Rep.* 11(2):477-485

Friedl P, Wolf K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 3(5):362-374

Garden A, Maor MH, Yung WK, Bruner JM, Woo SY, Moser RP, Lee YY. 1991. Outcomes and patterns of failure following limited-volume irradiation for malignant astrocytomas. *Radiother Oncol.* 20:99-110

Gliemroth J, Feyerabend T, Gerlach C, Arnold H, Terzis AJ. 2003. Proliferation, migration, and invasion of human glioma cells exposed to fractionated radiotherapy in vitro. *Neurosurg Rev.* 26(3):198-205

Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, Ahmed MS, Bakanauskas VJ, Muschel RJ, McKenna WG. 2003. Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 56:846-853

Hartmann W, Digon-Sontgerath B, Koch A, Waha A, Endl E, Dani I, Denkhau D, Goodyer CG, Sorensen N, Wiestler OD, Pietsch T. 2006. Phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signalling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of PTEN. *Clin Cancer Res.* 12(10):3019-3027

Hegedus B, Zach J, Czirok A, Lovey J, Vicsek T. 2004. Irradiation and Taxol treatment result in non-monotonous, dose-dependent changes in the motility of glioblastoma cells. *J Neurooncol.* 67(1-2):147-157

Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, Eisenberg BL, von Mehren M, Fletcher CD, Sandau K, McDougall K, Ou WB, Chen CJ, Fletcher JA. 2006. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 24(29):4764-4774

Hess C, Schaaf J, Kortmann R, Schabet M, Bamberg M. 1994. Malignant glioma: patterns of failure following individually tailored limited volume irradiation. *Radiother Oncol.* 30:146-149

Holland EC, Celestino C, Dai L, Schaefer RE, Sawaya, Fuller GN. 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet.* 25:55-7

Holland EC. 2000. Glioblastoma multiforma: the terminator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:6242-4

Hwang SY, Jung JW, Jeong JS, Kim YJ, Oh ES, Kim TH, Kim JY, Cho KH, Han IO. 2006. Dominant-negative Rac increases both inherent and ionizing radiation-induced cell migration in C6 rat glioma cells. *Int J Cancer*. 118(8):2056-2063

Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, van Meir EG. 1999. Frequent Co-Alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14^{ARF}, PTEN Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. *Brain Pathology*. 9:469-479

Jarvela S, Helin H, Haapasalo J, Jarvela T, Junttila TT, Elenius K, Tanner M, Haapasalo H, Isola J. 2006. Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours by chromogenic in situ hybridization: association with clinicopathological features and patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 32(4):441-450

Kimura T, Holland WS, Kawaguchi T, Williamson SK, Chansky K, Crowley JJ, Doroshow JH, Lenz HJ, Gandara DR, Gumerlock PH. 2004. Mutant DNA in plasma of lung cancer patients: potential for monitoring response to therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 1022:55-60

Kleihues P, Ohgaki H. 1999. Primary and secondary glioblastoma: from concept to clinical diagnosis. *Neurooncol*. 1:44-51

Kleihues P, Scheithauer BW, Burger PC. 2000. Histological typing of tumours of the central nervous system. 2nd edition. Springer, Stuttgart New York

Kleynen CE, Stoter TR, Tadema TM, Stalpers LJ, Dirven CM, Leenstra S, van der Valk P, Slotman BJ, Sminia P. 2003. The effects of irradiation on cell migration from glioblastoma multiforme biopsy spheroids. *23(6C):4907-4912*

Kyhse-Andersen J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth*. 10:203-209

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685

Li Z, Hosoi Y, Cai K, Tanno Y, Matsumoto Y, Enomoto A, Morita A, Nakagawa K, Miyagawa K. 2006. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 341(2):363-368

Loree J, Koturbash I, Kutanzi K, Baker M, Pogribny I, Kovalchuk O. 2006. Radiation-induced molecular changes in rat mammary tissue: possible implications for radiation-induced carcinogenesis. *Int J Radiat Biol*. 82(11):805-815

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. 2006. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. Oct 7

Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liau LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhi R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS. 2005. Molecular determinants of the response of glioblastomas of EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*. 353(19):2012-2024

Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang BH. 2006. Role of PI3K and Akt specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. *Cell Signal*. 18(12):2262-2271

Milas M, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z. 2000. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res*. 6:701-708

Mischel PS, Cloughesy TF. 2003. Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol*. 13(1):52-61

Mizoguchi M, Betensky RA, Barchelor TT, Bernay DC, Louis DN, Nutt CL. 2006. Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65(12):1181-1188

Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schwenker M. 2002. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*. 277(34):31099-31106

Mornex F, Nayel H, Tailladier L. 1993. Radiation therapy for malignant astrocytomas in adults. *Radiother Oncol*. 27:181-192

Muacevic A, Kreth FW, Horstmann GA, Schmid-Elsässer R, Wowra B, Steiger HJ, Reulen HJ. 1999. Surgery and radiotherapy compared with gamma knife radiosurgery in the treatment of solitary cerebral metastases of small diameter. *J Neurosurg*. 91:35-43

Nakamura JL, Karlsson A, Arvold ND, Gottschalk AR, Pieper RO, Stokoe D, Haas-Kogan DA. 2005. PKB/Akt mediates radiosensitization by the signalling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas. *J Neurooncol*. 71(3):215-222

Neshat MS, Mellinghoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, Frost P, Gibbons JJ, Wu H, Sawyers CL. 2001. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:10314-9

Newton HB. 2003. Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 1: Growth factor and Ras signalling pathways. *Expert Rev Anticancer Ther.* 3(5):595-614

Newton HB. 2004. Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 2: PI3K/Akt/PTEN, mTOR, SHH/PTCH and angiogenesis. *Expert Rev Anticancer Ther.* 4(1):105-128

Nowell PC. 1986. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 46(5):2203-2207

Oian LW, Mizumoto K, Urashima T, Nagai E, Maehara N, Sato N, Nakajima M, Tanaka M. 2002. Radiation-induced increase in invasive potential of human pancreatic cancer cells and its blockade by a matrix metalloproteinase inhibitor. *8(4):1223-1227*

Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, Kim MS, Lee SH, Park IC, Rhee CH, Hong SI. 2006. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signalling pathway. *Cancer Res.* 66(17):8511-8519

Pedersen P, Marienhagen K, Mork S, Bjerkvig R. 1993. Migratory pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in the adult rat brain. *Cancer Res.* 53:5158-5165

Pinsker MO, Goetz C, Walther EU, Dudel C, Grosu AL, Reich P, Schalhorn A, Elbel GK. 2004. *MANUAL Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks.* 2. Auflage. Zuckschwerdt Verlag München Wien New York. pp 77-88

Quan AL, Barnett GH, Lee SY, Vogelbaum MA, Toms SA, Staugaitis SM, Prayson RA, Peereboom DM, Stevens GH, Cohen BH, Suh JH. 2005. Epidermal growth factor receptor amplification does not have prognostic significance in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 63(3):695-703

Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. 1995. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 14:263-277

Reardon DB, Contessa JN, Mikkelsen RB, Valerie K, Amir C, Dent P, Schmidt-Ullrich RK. 1999. Dominant negative EGFR-CD533 and inhibition of MAPK modify JNK1 activation and enhance radiation toxicity of human mammary carcinoma cells. *Oncogene.* 18:4756-4766

Reusch HP, Zimmermann S, Schaefer M, Paul M, Moelling K. 2001. Regulation of Raf by Akt controls growth and differentiation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 276(36):33630-33637

Rosenzweig KE, Youmell MB, Palayoor ST, Price BD. 1997. Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2-M delay. *Clin Cancer Res.* 3:1149-1156

Saito T, Hama S, Kajiwara Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Arifin MT, Arita K, Kurisu K. 2006. Prognosis of cerebellar glioblastomas: correlation between prognosis and immunoreactivity for epidermal growth factor receptor compared with supratentorial glioblastomas. *Anticancer Res.* 26(2B):1351-1357

Sartor CI. 2004. Mechanisms of disease: radiosensitization by epidermal growth factor receptor inhibitors. *Nat Clin Pract Oncol.* 1(2):80-87

Schlegel J, Budde B, Neff F, Piontek G, Kraus A. 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.* 158:103-108

Schlegel J, Merdes A, Stumm G, Albert FK, Forsting M, Hynes NE, Kiessling M. 1994. Amplification of the epidermal growth factor receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma. *Int J Cancer.* 56:72-77

Schlegel J, Piontek G, Mennel HD. 2002. Activation of the anti-apoptotic Akt/protein kinase B pathway in human malignant gliomas in vivo. *Anticancer Res.* 22(5):2837-2840

Schlegel J, Scherthan H, Arens N, Stumm G, Kiessling M. 1996. Detection of complex genetic alterations in human glioblastoma multiforme using comparative genomic hybridization (CGH). *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:81-87

Schlegel J, Trenkle T, Stumm G, Kiessling M. 1997. Growth inhibition by dominant-negative mutations of the *neu* encoded oncoprotein. *Int J Cancer.* 70:78-83

Schlegel J., Peraud A., Merms J. 2004. MANUAL Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks. 2. Auflage. Zuckschwerdt Verlag München Wien New York. pp 3-21

Shi YQ, Blattmann H, Crompton NE. 2001. Wortmannin selectively enhances radiation-induced apoptosis in proliferative but not quiescent cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 49:421-425

Siefert A, Grosu AL, Kreth FW, Kneschaurek P, Krimmel K. 2004. MANUAL Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks. 2. Auflage. Zuckschwerdt Verlag München Wien New York. pp 51-54

Steiger HJ, Gumprecht H. 2004. MANUAL Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks. 2. Auflage. Zuckschwerdt Verlag München Wien New York. pp 42-47

Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ. 2000. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg.* 93:1003-1013

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsone R, Yamada KM. 1998. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*. 280:1614-7

Tanaka S, Kobayashi I, Oka H. 2001. Drug-resistance gene expression and progression of astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol*. 18(2):131-137

Testa JR, Bellicosa A. 2001. Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:10983-5

Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, Fortin SP, Winkles JA, Symons M, Nakada M, Cunliffe HE, Hostetter G, Hoelzinger DB, Rennert JL, Michaelson JS, Burkly LC, Lipinski CA, Loftus JC, Mariani L, Berens ME. 2006. Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor- κ B and correlate with poor patient outcome. *Cancer Res*. 66(19):9535-9542

Vogel R, Müller-Esterl W. 1986. Optimierungsstrategien beim Westernblotting und Immunoprinting. In: Radola (ed.) *Elektrophorese Forum* 86. Bode, pp 81-88

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 319(9):525-532

Wick W, Furnari FB, Naumann U, Cavenee WK, Weller M. 1999. PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis. *18(27):3936-3943*

Wick W, Wick A, Schulz JB, Dichgans J, Rodemann HP, Weller M. 2002. Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by Temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. *Cancer Res*. 62:1915-1919

Wilde-Bode C, Weller M, Rimmer A, Dichgans J, Wick W. 2001. Sublethal Irradiation Promotes Migration and Invasiveness of Glioma Cells: Implications for Radiotherapy of Human Glioblastoma. *Cancer Res*. 61:2744-2750

Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. 2004. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *Int J Oncol*. 24(4):893-900

Yano S, Yamaguchi M, Dong RP. 2003. EGFR tyrosine kinase inhibitor "gefitinib (Iressa)" for cancer therapy. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 122(6):491-497

Zheng ZZ, Liu ZX. 2007. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates CD151-induced endothelial cell proliferation and cell migration. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(2):340-348

Zimmermann S, Moelling K. 1999. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*. 286(5445):1741-1744

VII. Abkürzungsverzeichnis

EGFR	Epidermal growth factor receptor
erbB2/HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mTOR/FRAP	Mammalian target of rapamycin
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PKB / Akt	Proteinkinase B
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
ERK	extracellular signal-regulated kinase
MEK	mitogen signal-regulated kinase

Dankvermerk

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Höfler, der mir als Leiter des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München den Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hat.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. J. Schlegel, für die Überlassung des Themas, sein Engagement bei der Planung, Ausführung und kritischen Betrachtung meiner Ergebnisse bedanken. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und verstand es, durch aufmunternde Worte mein Engagement zu fördern.

Weiterhin gilt mein Dank allen anderen Mitarbeitern des Instituts, besonders aber Herrn G. Piontek, Frau Dr. med. F. Neff und Frau S. Rauser, die stets offen für meine Fragen waren und auf deren Unterstützung ich immer bauen konnte.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Molls, dem Leiter der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, für die Möglichkeit der Benützung des Linearbeschleunigers bedanken. In diesem Zusammenhang sage ich auch Frau Dr. med. A.-L. Grosu und allen beteiligten MTAs, die mir bei der experimentellen Bestrahlung mit Rat und Tat zur Seite standen, meinen Dank.