

**Aus der Fachabteilung für Neuropathologie**  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel)  
**des**  
**Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie**  
(Geschäftsführender Ärztl. Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Höfler)

**Blockade des anti-apoptotischen Phospholipid-Signalweges  
als möglicher adjuvanter Therapieansatz bei malignen Gliomen**

Gudrun Durchschlag

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. J. Schlegel
2. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 05.10.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.01.2007 angenommen.

---

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	5
<b>2. EINLEITUNG</b>	8
<b>2.1 <i>Problemstellung</i></b>	8
<b>2.2 <i>Subklassifizierung des Glioblastoms</i></b>	9
2.2.1 Die WHO-Klassifizierung astrozytärer Tumoren	9
2.2.2 Klinische Untergruppen des Glioblastoms	10
2.2.3 Genetische Untergruppen des Glioblastoms	10
<b>2.3 <i>Signalwege</i></b>	11
2.3.1 Der Proteinkinase B/Akt-Signalweg	12
2.3.2 Die Caspasen	15
2.3.3 Der p70 S6Kinase-Signalweg	16
2.3.4 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen-Kaskaden	18
2.3.5 Der p53-Signalweg	19
<b>2.4 <i>Zellzyklus-Regulation</i></b>	22
2.4.1 Zellzyklus-Kontrollpunkte	22
<b>3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	25
<b>4. MATERIAL UND METHODIK</b>	26
<b>4.1 <i>Material</i></b>	26
4.1.1 Chemikalien und Geräte	26
4.1.2 Zelllinien	27
4.1.3 Puffer und Lösungen	28
4.1.4 Antikörper	29

---

<b>4.2</b>	<b><i>Methoden</i></b>	29
4.2.1	Zellkultur	29
4.2.2	Behandlung mit Inhibitoren	30
4.2.3	Bestrahlung	30
4.2.4	Proteinextraktion	31
4.2.5	Bradford-Assay	31
4.2.6	SDS-PAGE	31
4.2.7	Westernblot	32
4.2.8	Behandlung der Membranen zur Expressionskontrollen-Analyse	32
4.2.9	Klonogenes Wachstum	32
4.2.10	Zellzyklus-Bestimmung	33
4.2.11	Proliferationsmessung	33
4.2.12	Statistik	34
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	35
<b>5.1</b>	<b><i>Etablierungsversuche</i></b>	35
5.1.1	Zellkultur	35
5.1.2	Dosisfindung für Bestrahlungsversuche	35
<b>5.2</b>	<b><i>Bestrahlungseffekt auf Koloniebildung</i></b>	37
5.2.1	Zelllinie G139	37
5.2.2	Zelllinie LN229	38
5.2.3	Zelllinie LN18	38
5.2.4	Zelllinie G109	39
<b>5.3</b>	<b><i>Bestrahlungseffekt auf Zellzyklus-Kontrollpunkte</i></b>	40
5.3.1	Kontrolle	40
5.3.2	Behandlung mit Rapamycin	41
5.3.3	Behandlung mit LY 294002	41
5.3.4	Bestrahlung	42
5.3.5	Bestrahlung und Behandlung mit Rapamycin	43
5.3.6	Bestrahlung und Behandlung mit LY 294002	44

---

<b>5.4</b>	<b><i>Bestrahlungseffekt auf Signalwege</i></b>	45
5.4.1	Phosphorylierung von Akt	45
5.4.2	Phosphorylierung von p70 S6K	47
5.4.3	Phosphorylierung von MAPK	48
5.4.4	Phosphorylierung von SAPK/JNK	50
5.4.5	Nachweis von cleaved-PARP und PARP	52
5.4.6	Zusammenfassende Darstellung	54
<b>5.5</b>	<b><i>Quantitative Zellschädigung</i></b>	56
5.5.1	Zelllinie G139	56
5.5.2	Zelllinie LN229	57
5.5.3	Zelllinie LN18	58
5.5.4	Zelllinie G109	59
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION</b>	61
<b>6.1</b>	<b><i>Untersuchte Signalwege</i></b>	62
<b>6.2</b>	<b><i>Eingesetzte Methoden</i></b>	64
<b>6.3</b>	<b><i>Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Einzelnen</i></b>	66
<b>6.4</b>	<b><i>Signalwegstatus in Abhängigkeit von der Bestrahlung</i></b>	68
<b>6.5</b>	<b><i>Bedeutung für die Klinik</i></b>	71
<b>6.6</b>	<b><i>Schlussfolgerung</i></b>	72
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	73
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	75
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	82

---

## 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alle Einheiten wurden nach dem internationalen Standard abgekürzt (SI-Einheiten).

4E-BP1	eIF4E-binding protein
A	Ampere
A.	Astrozytom
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Produkt des c-Akt-Onkogens, benannt nach dem viralen Äquivalent des Retrovirus Akt8
AS	Aminosäure
ATM	Ataxia telangiectasia mutiertes Gen
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	alpha-thalassemia (thal)/mental retardation
BAD	Bcl-2/BCL-XL-associated death promoter
BAX	Bcl2 associated X-protein
Bcl	B-cell-lymphoma-gen
ca.	circa
Caspase	cytosolic aspartate-specific cysteine protease
cdk	Cyclin-abhängige Kinase
cm	Zentimeter
d	Tag
D	Domäne
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent proteinkinase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N`N`-tetraessigsäure
ERK	extracellular-signal-regulated kinase

---

et al.	und andere
FACS	fluorescence activated cell sorting
FKBP	FK506-binding protein
FRAP	FKBP12 and rapamycin-binding proteinkinases
FCS	fötales Kälberserum
GBM	Glioblastom
Gy	Gray
h	Stunde
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
IGF-BP3	insulin-like growth factor-binding protein 3
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
Lsg.	Lösung
LY	LY 294002
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMAC1	mutated in multiple advanced cancers
MDM2	murine double minute 2
min	Minute
ml	Milliliter
M	molar
mTOR	mammilian target of rapamycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	poly ADP-ribose polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Diphosphat
PIP3	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PKC	Proteinkinase C

---

PMSF	Phenylmethylnsulphonylfluorid
PTEN	Phosphatase- und TENSin-Homologie
PVDF	Polyvinylidon-Difluorid
Ra oder Rapa	Rapamycin
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
S.	Seite
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEP1	TGFbeta-regulated and epithelial-cell enriched phosphatase
Thr	Threonin
TP53	Tumorsuppressor p53
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTBS	Triton-X-100-TBS
U	Unit / Einheit
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 *Problemstellung*

Das GBM (Glioblastom) ist der häufigste und bösartigste Tumor des zentralen Nervensystems. Er manifestiert sich bevorzugt in der 5. und 6. Lebensdekade und macht 15-20 % aller Hirntumoren aus (Ohgaki und Kleihues 2005). Trotz intensiver Bemühungen die Therapie zu verbessern, konnte die Prognose der Patienten mit GBM in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert werden. Die durchschnittliche Überlebensdauer beträgt weniger als ein Jahr (Kunwar et al. 2001). Neben chirurgischen Maßnahmen stellt die adjuvante Radiotherapie die einzige Behandlungsmöglichkeit dar, die beweisend zu einer Verlängerung der Überlebenszeit bei Patienten mit GBM führt. Sie kann die Überlebenszeit jedoch nur auf 14 Monate verlängern (Grossman und Batarra 2004). Die begrenzte Effektivität der Radiotherapie wird auf die geringe apoptotische Antwort der Tumorzellen auf Bestrahlung zurückgeführt (Kerr et al. 1994).

Die funktionellen Konsequenzen genetischer Veränderungen in Tumorzellen sind zunehmend Ziel neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze geworden. Die Aktivierung der PKB (anti-apoptotischen Proteinkinase B, auch Akt genannt) in einem Teil maligner Gliome scheint für die Entwicklung der erheblichen Therapieresistenz dieser Tumoren mitverantwortlich zu sein (Ohgaki 2005). Daher könnte ihre strahlenbiologische Untersuchung sowohl von prädiktivem Wert für Therapieentscheidungen sein als auch neue Ziele für eine adjuvante Therapie zur Verbesserung der Strahlentherapie charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die funktionelle Regulation intrazellulärer Signaltransduktionswege glialer Tumorzellen bei experimenteller Bestrahlung zu untersuchen, um die Möglichkeiten der Blockade des anti-apoptotischen Akt-Signalweges als neuen Ansatz für eine supportive Therapie zu analysieren.

## 2.2 Subklassifizierung des Glioblastoms

### 2.2.1 Die WHO-Klassifizierung astrozytärer Tumoren

Das GBM ist ein hochmaligner, glialer Tumor astrozytären Ursprungs, der sich bevorzugt in der 5.-6. Lebensdekade manifestiert (Ohgaki und Kleihues 2005). Astrozytome machen etwa 45 % der hirneigenen bzw. intraaxialen Tumoren aus. Sie treten bevorzugt in den Großhirnhemisphären und seltener in den Basalganglien, im Hirnstamm oder im Spinalkanal auf (Kleihues und Cavenee 2000).

Man kann niedriggradige und hochgradige Astrozytome unterscheiden. Entsprechend ihrer Histologie wurden die Astrozytome von der WHO (World Health Organisation) in vier Grade eingeteilt.

WHO-Grad	Tumor	Klinik
Grad I WHO	Pilozytisches Astrozytom Subependymales Riesenzell-Astrozytom	umschrieben wachsend
Grad II WHO	Pleomorphes Xanthoastrozytom	wachsend
Grad II – IV WHO	Diffuses Astrozytom Anaplastisches Astrozytom Glioblastom	niedrigmaligne hochmaligne

Tab. 1: Die WHO-Klassifikation der Astrozytome (Kleihues und Cavenee 2000)

Die WHO Grad I Astrozytome, zu denen auch das pilozytische Astrozytom gezählt wird, sind meist gut umschrieben und treten vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen auf. Sie werden zu den gutartigen Tumoren gezählt (Kleihues und Cavenee 2000).

Die bösartigen Astrozytome, die durch ihr diffus infiltrierendes Wachstum charakterisiert sind, werden in WHO Grad II-IV unterteilt, wobei Zellzahl sowie zelluläre Atypien von Grad II bis IV zunehmen. Dem Grad IV entspricht das GBM, welches durch vaskuläre Proliferationen und Nekrosen charakterisiert ist (Kleihues und Cavenee 2000).

Die Überlebenszeit reicht von ca. 5 Jahren bei Patienten mit Grad II Astrozytomen, ca. 2-5 Jahren bei Patienten mit anaplastischen Astrozytomen bis hin zu ungefähr einem Jahr bei Patienten mit GBM (Kleihues und Cavenee 2000).

### **2.2.2 Klinische Untergruppen des Glioblastoms**

Klinisch treten GBM in zwei Varianten auf. Dabei sind die Patienten, deren Tumoren im Rahmen einer Tumorprogression als Rezidivtumoren niedriggradiger Gliome (sog. sekundäres GBM) auftreten, jünger und haben eine insgesamt etwas bessere Prognose. Die überwiegende Mehrheit (ca. 65-75 %) der GBM entwickelt sich aber *de novo* (sog. primäres GBM). Diese Patienten sind höheren Alters und haben eine besonders schlechte Prognose (Ohgaki und Kleihues 2005). Histologisch können primäres und sekundäres GBM nicht unterschieden werden (Kleihues und Cavenee 2000); beide weisen Nekrosen, Gefäßendothelproliferationen sowie zelluläre Atypien auf.

### **2.2.3 Genetische Untergruppen des Glioblastoms**

Die Ätiologie der GBM ist unbekannt. In zahlreichen Untersuchungen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass ein sehr hoher Prozentsatz dieser Tumoren molekulargenetische Veränderungen aufweist. Kleihues und Ohgaki (1999) zeigten, dass eine Assoziation zwischen den klinischen Varianten und den genetischen Veränderungen, die in den Tumoren auftreten, besteht.

Mutationen im *TP53*-Tumorsuppressorgen können fast ausschließlich in sekundären GBM nachgewiesen werden. Dagegen weisen primäre GBM, die klinisch *de novo* auftreten, Verluste von chromosomalem Material des Chromosom 10 und Genamplifikationen des EGFR (Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor) sowie von MDM2 (murine double minute 2), aber keine *TP53*-Veränderungen auf (von Deimling et al. 1993). Weiterhin konnte ein Zielgen des Chromosom 10-Verlustes in GBM identifiziert und kloniert werden. Es handelt sich um das das sog. *PTEN*-Gen (Phosphatase- und TENSin-Homologie), das auch als *MMAC1* (mutated in multiple advanced cancers) oder *TEP1* (TGFbeta-regulated and epithelial-cell enriched phosphatase) bezeichnet wird (Besson et al. 1999).

Das *TP53*-Genprodukt p53 stellt das zentrale Element in der zellulären Überwachung der genomischen Integrität dar. Das p53-abhängige Kontrollsystem ist daher unmittelbar an der

Regulation genotoxischen Stresses beteiligt, z.B. im Rahmen einer strahlen- oder chemotherapeutischen Behandlung. Dabei scheint p53 zwei wesentliche Reaktionen zu regulieren: auf der einen Seite wird durch eine Blockade des Zellzyklus DNA-Reparatur ermöglicht (Kastan et al. 1991), auf der anderen Seite kann über p53 die zelluläre Apoptose eingeleitet werden (Lowe et al. 1993). Es ist daher verständlich, dass genetische Veränderungen in diesem System unmittelbare Auswirkungen auf therapeutische Ansätze haben. Dagegen haben die wesentlichen genetischen Veränderungen, die in den primären GBM nachweisbar sind, also Amplifikation des *EGFR*-Gens und Deletion des *PTEN*-Gens, erhebliche funktionelle Auswirkungen auf die zelluläre Signaltransduktion. Der EGF-Rezeptor ist als transmembrane Rezeptortyrosinkinase an der Wachstumsfaktor-vermittelten Aktivierung intrazellulärer Signalwege beteiligt (Kao et al. 2001). Dabei scheint sowohl die Aktivierung des Proliferations-assoziierten MAPK-Signalweges (Mitogen-aktivierten Proteinkinase) als auch des anti-apoptotischen PI3K-Signalweges (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase) von großer Bedeutung zu sein.

Es konnte gezeigt werden, dass PTEN in der D3-Position dephosphoryliert und damit der direkte Gegenspieler der PI3K ist (Vazquez und Sellers 2000). *PTEN*-Knockout-Mäuse zeigten eine konstitutive Aktivierung des PI3K-abhängigen Akt-Signalweges. Die homozygote Deletion war embryonal letal und die Gewebe zeigten eine deutlich gesteigerte Proliferation. Die heterozygoten Tiere wiesen eine erhöhte Tumorrates auf und Fibroblasten der Knockout-Mäuse waren deutlich resistent gegen zytotoxische Behandlung (Vazquez und Sellers 2000). Diese Daten deuten auf eine Rolle des PI3K/Akt-Signalweges für die Überwindung des Zelltodes auch in Tumorzellen hin. Inzwischen konnte durch mehrere Arbeiten gezeigt werden, dass die konstitutive Aktivierung dieses Signalweges in malignen Gliomen durch *PTEN*-Deletionen/Mutationen mit einer erhöhten Resistenz gegenüber induziertem Zelltod (z.B. durch Strahlenbehandlung) einhergeht (Hopkin 1998).

### **2.3 *Signalwege***

Die verschiedensten intrazellulären Effekte können durch extrazelluläre Stimuli ausgelöst werden. Diese Effekte werden im Allgemeinen durch intrazelluläre Signalwege vermittelt. Im Folgenden sollen einige dieser Signalwege erklärt werden. Aufgrund der fast täglich neu

entdeckten Wege und Komponenten wird hier nur ein Überblick über einige dieser Signalwege gegeben, ohne jedoch Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben.

### 2.3.1 Der Proteinkinase B/Akt-Signalweg

Ob eine Zelle überlebt oder in die Apoptose übergeht, hängt von verschiedensten äußeren Faktoren wie z.B. der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin) ab. Akt, eine Serin-/Threoninkinase, konnte als eine wichtige Komponente im anti-apoptotischen Signalweg identifiziert werden (Khwaja 1999). Akt reguliert eine breite Anzahl verschiedenster Funktionen, wie Apoptose, Proliferation und Differenzierung. Die Aktivierung von Akt erfolgt am häufigsten über die PI3K-abhängige Phosphorylierung und scheint von der Anwesenheit verschiedener Wachstumsfaktoren abhängig zu sein.

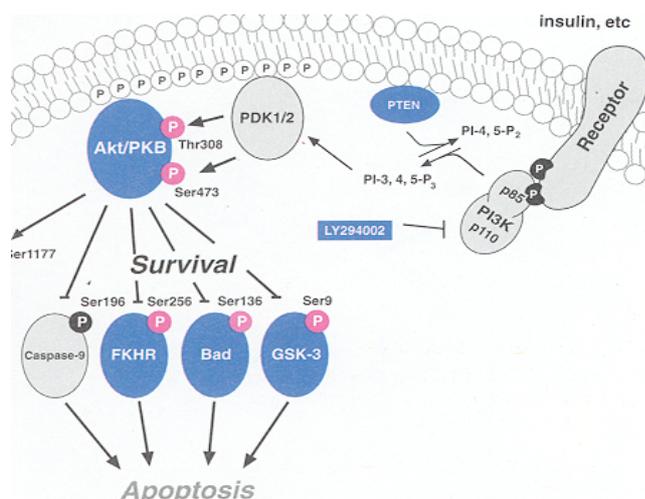


Abb. 1: Der Akt-Signalweg (modifiziert nach Cell Signaling Technology Catalog 2000-2001)

Die PI3K aktiviert Akt. Diese Aktivierung erfolgt u.a. über PIP<sub>3</sub> (Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphat). Nach Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren an Rezeptoren der Zellmembran kommt es über die Aktivierung der PI3K zur Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub> (Phosphatidyl-Inositol-4,5-Diphosphat) zu PIP<sub>3</sub>, welches u.a. Akt aktiviert. Akt wiederum phosphoryliert eine breite Anzahl an Zielmolekülen, die die Funktion des Überlebens der Zelle innehaben, u.a. auch MDM2, den wichtigsten Regulator von p53. Akt verstärkt die Inhibierung und Destabilisierung von p53 durch MDM2. Interessanterweise wirkt die Stress induzierte Aktivierung von p53 diesen inhibitorischen Effekten durch verschiedene

---

Mechanismen entgegen. p53 unterstützt die Caspasen-vermittelte Spaltung und Herabsetzung von Akt. Außerdem induziert p53 die Expression von *PTEN*, einem Tumorsuppressorgen und Gegenspieler des Akt (Haupt et al. 2003).

Die Aktivierung von Akt (siehe oben) erfolgt an 2 Phosphorylierungsstellen Thr308 und Ser473 durch PDK I bzw. PDK II (phosphoinositide-dependent kinase). PDK wird von PIP3 direkt aktiviert. Akt kann das pro-apoptotische BAD (Bcl-2/BCL-XL-associated death promoter), ein Mitglied der Bcl-2 Gruppe, an Ser136 phosphorylieren und dadurch dessen pro-apoptotische Funktion blockieren. BAD wiederum ist Angriffspunkt von drei anti-apoptotischen Proteinkinasen, ERK (extracellular-signal-regulated kinase), PKA (Proteinkinase A) und Akt. Akt kann weiterhin die Apoptose inhibieren, indem es die Aktivität der Caspasen reguliert (Cross et al. 2000) (siehe auch Punkt 2.3.2).

Eine Inaktivierung der PI3K kann durch den hoch selektiven Inhibitor LY 294002 erreicht werden. Es kommt zu einer Inhibierung von Akt und allen weiteren in dieser Kaskade folgenden Komponenten u.a. auch des p70 S6K-Signalweges.

Weiterhin führt LY 294002 zu einer Inhibition der Zellzyklus-Progression durch Induktion eines G1-Arrests, welcher wiederum zu einer Inhibition der Zellproliferation führt. Einige Arbeitsgruppen konnten bereits in Tiermodellen zeigen, dass die Behandlung mit LY 294002 zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums und des Tumorumfanges führen kann (Hu et al. 2000; Semba et al. 2002). Brognard et al. konnte zeigen, dass die Aktivierung von Akt möglicherweise die Therapieresistenz beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom erklärt und, dass die Behandlung mit LY 294002 zu einer Zunahme der Chemotherapie induzierten Apoptose führt, v. a. in Tumorzellen mit konstitutiv aktiviertem Akt (2001). Das toxische Profil von LY 294002 spricht jedoch noch gegen den Einsatz bei klinischen Versuchen. Es ist bis dato noch unklar, ob die Toxizität dieses Inhibitors auf seinem Wirkungsmechanismus basiert oder durch seine Eigenschaften als solche hervorgerufen wird (Gupta et al. 2003).

Ein wesentlicher funktioneller Gegenspieler der PI3K ist die Lipid- und Proteinphosphatase PTEN, welche die PI3K-abhängige Aktivierung von Akt inhibiert, indem es PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert (Hopkin 1998). Eine Deletion oder Inaktivierung von *PTEN* führt nun zu einer konstitutiven Aktivierung von Akt (Cantley und Neel 1999), während normalerweise die Aktivität von Akt in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren niedrig ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die „Restauration“ von *PTEN* in *PTEN*-mutierten GBM-Zellen eine Suppression des Zellwachstums bewirkt (Furnari et al. 1997).

PTEN schützt die Zellzyklus-regulatorische Funktion von p53, indem es die Fähigkeit von MDM2, die Induktion von p21 zu beeinträchtigen, blockiert. Weiterhin ist PTEN für die Induktion von IGF-BP3 (insulin-like growth factor-binding protein 3) durch p53 zuständig. Dieses Protein inhibiert die Kapazität von IGF-1, welches von vielen Tumoren produziert wird, zelluläres Akt zu aktivieren (Mayo et al. 2001). Eine direktere Verbindung zwischen p53 und PI3K/Akt folgt aus der Beobachtung, dass die konstitutive Aktivierung von PI3K/Akt den Beginn der Apoptose in Zellkulturen, in denen dieses Ereignis abhängig von p53 ist, verzögert. PTEN erhöht die Aktivität und Expression von p53 und induziert Zellzyklus-Arrest (Mayo et al. 2001).

Dadurch kommt es bei einem Verlust des Tumorsuppressorgens *PTEN* auf Chromosom 10 häufig zu Malignomen. Dieser Verlust wurde z.B. bei Gliomen (von Deimling et al. 1993), Mamma- und Prostata-Karzinomen (Hopkin 1998) sowie beim Cowden-Syndrom (Herold 2001) nachgewiesen.

Tohma et al. konnte zeigen, dass nach einer Überexpression bzw. Amplifikation des EGF-Rezeptors, der Verlust von *PTEN* die häufigste Alteration in primären GBM darstellt, wohingegen sekundäre GBM sehr selten eine Mutation im *PTEN*-Gen, jedoch häufig eine *p53*-Mutation, aufweisen (1998).

## 2.3.2 Die Caspasen

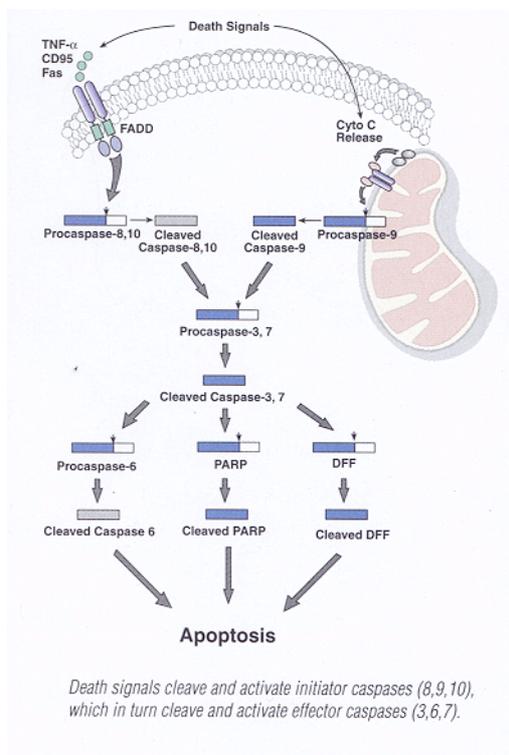


Abb. 2: Die Signalwege der Caspasen (modifiziert nach Cell Signaling Technology Catalog 2000-2001)

Die Caspasen gehören zu einer Familie von Cystein-Proteasen, die nach Asparaginsäure-Resten spalten (Budihardjo et al. 1999). Die biochemische Aktivierung dieser Schlüsselkomponenten im „Zelltodprogramm“ ist für morphologische Veränderungen verantwortlich, die während der Apoptose beobachtet werden, wie mitochondriale Schäden, Zellmembranuntergang, DNA-Fragmentation, Chromatinkondensation und die Formation apoptotischer Körperchen (Budihardjo et al. 1999). Alle apoptotischen Caspasen liegen normalerweise in Zellen in inaktiver Form vor. Wenn Zellen nun Apoptose begehen, werden diese Caspasen durch einen oder zwei aufeinander folgende proteolytische Schritte aktiviert, in denen der Einzelpeptidvorläufer in ein großes und kleines Fragment gespalten wird, die das aktive Enzym darstellen (Thornberry und Lazebnik 1998).

Es gibt sog. „Initiator“-Caspasen (z.B. Caspase 8, 9, 10 und 12), die an pro-apoptotische Signale gekoppelt sind. Wenn diese aktiviert werden, spalten und aktivieren sie nachfolgende Caspasen (z.B. 3, 6 und 7). Caspase-3 stellt ein Schlüsselenzym der Apoptose dar, indem sie

verantwortlich für die partielle oder komplette proteolytische Spaltung von weiteren Enzymen ist, z.B. von PARP (sog. poly ADP-ribose polymerase) (Chang und Yang 2000).

### 2.3.3 Der p70 S6Kinase-Signalweg

Der p70 S6K-Signalweg stellt einen weiteren wichtigen Schritt in der Signaltransduktion, insbesondere der Regulation der Proteintranslation in Zellen, dar. Die p70 S6K, die auch zu den Serin-/Threoninkinasen gehört, liegt im mitogen aktivierten Signalweg „downstream“ der PI3K und mTOR (mammilian target of rapamycin) (Law 2005).

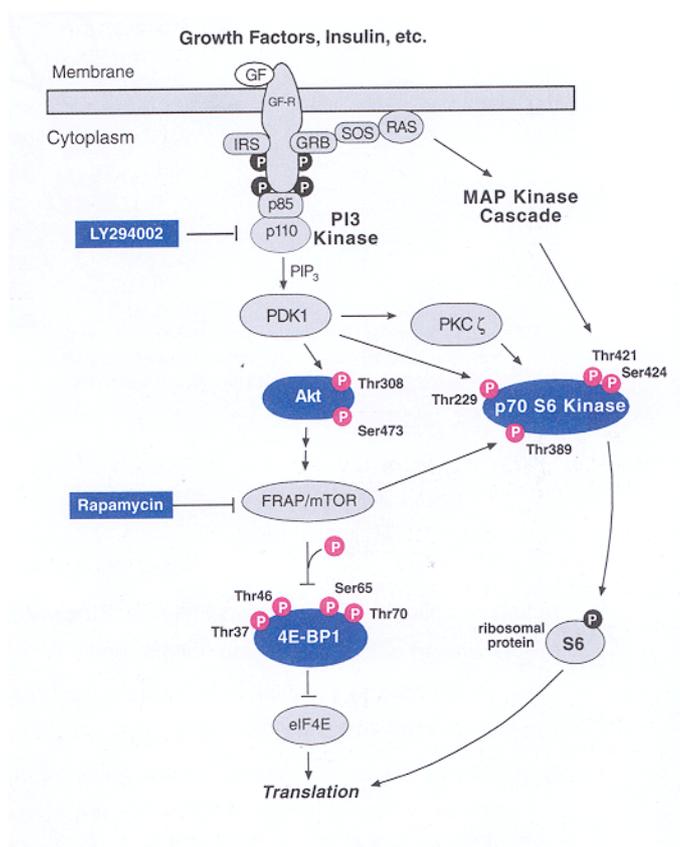


Abb. 3: Der p70 S6K-Signalweg (modifiziert nach Cell Signaling Technology Catalog 2000-2001)

Die p70 S6K kann an verschiedenen Stellen phosphoryliert und somit aktiviert werden. An ihrer Threonin-229-Domäne kann sie durch die PI3K-abhängige Proteinkinase, die sog. PDK1, phosphoryliert werden. Diese Kinase kann jedoch auch über eine Aktivierung von Akt

---

mTOR aktivieren und somit indirekt die p70 S6K aktivieren, da mTOR die p70 S6K an ihrer Threonin-389-Domäne phosphorylieren kann (Bjornsti and Houghton 2004).

Weiterhin wird ihr eine entscheidende Rolle im Zellwachstum sowie in der G1-Zellzyklus-Progression nachgesagt (Law 2005). Ihr Hauptsubstrat ist das S6 Protein der 40S ribosomalen Untereinheit, welches eine große Rolle in der Proteinsynthese spielt.

Eine Inaktivierung der p70 S6K kann nun durch den Inhibitor Rapamycin erreicht werden. Rapamycin gehört zu der Familie der Makrolid-Antibiotika und zeigte in unterschiedlichen Untersuchungen potente immunsuppressive Eigenschaften. Der Wirkung von Rapamycin liegen zwei verschiedene Mechanismen zugrunde. Erstens führt es zur Inhibierung der p70 S6K (Dumont und Su 1996). Zweitens konnte in Zellzyklus-Analysen gezeigt werden, dass Rapamycin zu einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase führt, jedoch keinen vollständigen Stopp bezüglich des Übergangs zwischen G1- und S-Phase verursacht (Dumont und Su 1996).

Es stellte sich heraus, dass der Angriffspunkt von Rapamycin die Proteinkinase FRAP/mTOR (auch RAFT oder RAPT genannt) ist. Rapamycin bindet an das zytoplasmatische Immunophilin FKBP-12 (FK506-binding protein-12), welches spezifisch an mTOR bindet und dessen Fähigkeit z.B. die S6Kinase und 4E-BP1/PHAS-1 (eIF4E-binding protein) zu phosphorylieren, inhibiert (Neshat 2001). Durch diese Inhibition kommt es zu einer Verminderung der Aktivierung und Phosphorylierung der S6Kinase, der Translation von ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren sowie zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität des Cyclin-abhängigen Kinase cdk2-cyclin E Komplexes, was wiederum zu einem mittelspäten G1-Zellzyklus-Arrest führt (Georger et al. 2001).

Aufgrund von Stabilitäts- und Löslichkeitsproblemen bei Rapamycin wurde nach Analoga für den klinischen Gebrauch gesucht. U.a. fand man den Zellzyklus-Inhibitor CCI-779, ein Esterderivat des Rapamycins. Einige Gruppen konnten zeigen, dass Tumoren mit *PTEN*-Mutationen besonders vulnerabel gegenüber der Behandlung mit CCI-779 sind (Garber 2001). CCI-779 kann ebenfalls die Funktion von mTOR inhibieren, zeigte aber bessere pharmakologische Eigenschaften als Rapamycin (Mills et al. 2001) und wurde für den i.v. Gebrauch entwickelt. Beide Stoffe weisen lipophile Eigenschaften auf und können somit gut die Blut-Hirnschranke überschreiten, um dort in ausreichender Konzentration vorzuliegen (Sehgal et al. 1975). Weitere Analoga wie RAD001 und AP23573 wurden synthetisiert und befinden sich in klinischer Erprobung. CCI-779 befindet sich mittlerweile in Phase 3

klinischer Studien bei Tumoren wie Nierenzellkarzinom, Prostata- und Brustkrebs sowie zahlreichen anderen Tumoren (Bjornsti and Houghton 2004). Insgesamt weisen die vorklinischen Studien auf eine vielversprechende Antitumor-Aktivität bei gleichzeitig relativ niedriger Toxizität des Rapamycins und seiner Analoga hin.

#### **2.3.4 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen-Kaskaden**

Die MAPK (Mitogen-aktivierten Proteinkinasen) stellen eine große Familie der Serin/Threoninproteinkinasen dar, die eine wichtige Rolle im Bereich der Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie der Bewegung von Zellen und dem Zelltod spielen.

*Abb. 4: Die MAPK-Kaskaden (modifiziert nach Cell Signaling Technology Catalog 2000-2001)*

Die MAPK-Signalkaskaden sind hierarchisch in dreireihige Module organisiert: MAPK werden phosphoryliert und aktiviert durch MAPKK, die wiederum phosphoryliert und aktiviert werden durch MAPKKK (siehe Abb. 4). Es wurden zahlreiche unterschiedliche MAPK in den letzten Jahren identifiziert. Darunter befinden sich unter anderem die p42/p44 Kinase, die durch extrazelluläre Signale reguliert wird, die JNK (c-Jun N-terminale Proteinkinase) / SAPK (durch Stress aktivierte Proteinkinase) und die p38-MAPK. Diese

---

Kinasen stellen das jeweilige terminale Ende ihrer Signalkaskade dar, die durch Bindung am Wachstumsfaktor- oder „Todes“-Rezeptor initiiert werden. Die Aktivierung von JNK/SAPK und p38 MAPK fördert im Großen und Ganzen die Apoptose, wohingegen die Aktivierung der p42/p44 ERK mit einer Inhibierung der Apoptose assoziiert ist (Cross et al. 2000).

Die JNK- und die p38-Gruppe der MAPK werden hauptsächlich durch proinflammatorische Zytokine und „Umweltstress“ aktiviert. Im Gegensatz dazu reagiert die ERK-Gruppe der MAPK leicht auf mitogene und Differenzierungs-Stimuli. Zum Beispiel wird das kleine G-Protein Ras durch viele Wachstumsfaktoren aktiviert, und in Folge aktiviert es die Raf-MEK-ERK Kaskade (Kuboki et al. 2000).

### 2.3.5 Der p53-Signalweg

Aufgrund der zentralen Stellung von p53 im Rahmen der Signaltransduktion soll hier auch auf diesen Signalweg eingegangen werden.

p53 wurde 1979 erstmalig identifiziert (Smolinski und Meltzer 2000). Seitdem gab es zahlreiche Untersuchungen, in denen seine Schlüsselrolle beim Schutz der Integrität des zellulären Genoms gezeigt werden konnte. 50 % aller Tumoren beim Menschen weisen Mutationen des p53-Proteins auf; Zellen, denen kein intaktes p53 zur Verfügung steht, zeigen genetische Instabilitäten sowie Defekte in der Kontrolle des Zellzyklus (Smolinski und Meltzer 2000). p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression verschiedenster Gene induziert (z.B. *p21*, *MDM2*, *BAX*, *IGF-BP3*) (Allan und Fried 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das „Einbringen“ von p53 in Zellen, die ihr endogenes p53 verloren haben, zu Wachstumsstillstand oder Apoptose führen kann (Lowe et al. 1993).

Die Struktur von p53 kann funktionell in 4 Domänen aufgeteilt werden. Das amino-terminale Ende interagiert mit dem „Transkriptionsapparat“. Daran schließt sich eine Sequenz-spezifisch DNA-bindende sowie eine „oligomerisierende“ Domäne an. Das C-terminale Ende ist reich an basischen Aminosäuren, die mit begrenzter Spezifität an DNA binden. Sie binden auch an schon beschädigte DNA und RNA und übermitteln strukturelle Veränderungen, die die sequenz-spezifische DNA-bindende Domäne aktivieren.

Nativ liegt p53 als Tetramer vor, dessen Struktur mittels Interaktionen betreffend die oligomerisierende Domäne stabilisiert wird (Smolinski und Meltzer 2000).

-NH <sub>2</sub>	Transaktivations	DNA-bindende Domäne	Oligomerisation	-COOH
------------------	------------------	---------------------	-----------------	-------

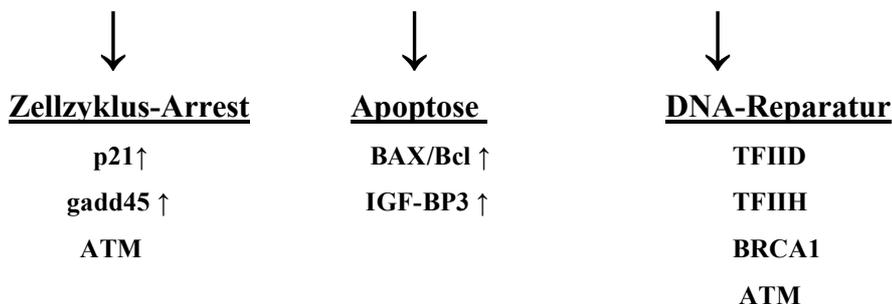


Abb. 5: Struktur und biologische Effekte von p53 (modifiziert nach Smolinski und Meltzer 2000)

Die Aktivierung von p53 kann sowohl zu Zellzyklus-Arrest als auch zu DNA-Reparatur oder Apoptose führen. Diese Aktivierung kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. DNA-Schäden werden u.a. durch UV- oder  $\gamma$ -Strahlen sowie verschiedenste Chemikalien verursacht. Sie führen zu einem Anstieg des Tumorsuppressorproteins.

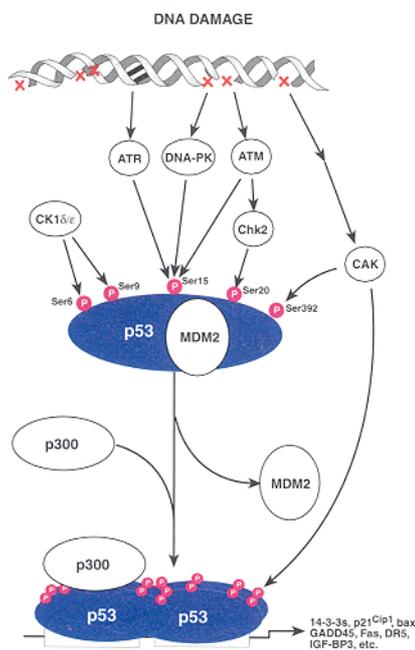


Abb. 6: Aktivierung von p53 (modifiziert nach Cell Signaling Technology Catalog 2000-2001)

Schäden an der DNA induzieren eine Phosphorylierung von p53 an Ser15 und Ser20. Dies führt zu einer reduzierten Interaktion von p53 mit dem Onkogen MDM2. MDM2 stellt über

---

einen autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus unter normalen Bedingungen einen negativen zellulären Regulator des p53 dar. Es bindet an die N-terminale Domäne und inhibiert die transkriptionale Aktivität. MDM2 verhindert die Akkumulation von p53. p53 kann weiterhin durch ATM (Ataxia telangiectasia mutiertes Gen), ATR (alpha-thalassemia (thal)/mental retardation) und DNA-PK (DNA-dependent proteinkinase) an Ser15 phosphoryliert werden; diese Phosphorylierung schwächt die Fähigkeit von MDM2 an p53 zu binden, was aber die Akkumulation und die funktionelle Aktivierung von p53 als Antwort auf DNA-Schädigung fördert.

Zahlreiche Genmutationen, die mit onkogenetischer Transformation assoziiert sind, „eliminieren“ den G1-/S-Checkpoint, erlauben also den Zellen ungehindert den Prozess der DNA-Replikation zu erreichen, ohne vorher die Phase einer „DNA-Prüfung“ bzw. „-Reparatur“ zu durchlaufen. Die stete Akkumulation genetischer Alterationen resultiert oft in der Progression der Tumormalignität (Owa et al. 2001).

Es konnte nachgewiesen werden, dass GBM-Zellen, denen die Wildtyp p53-Funktion fehlt, nach Bestrahlung keinen G1-Arrest zeigen, im Gegensatz zu Zellen mit funktionsfähigem p53 (Haas-Kogan 1996). In weiteren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das Einbringen von p53 in Zellen, denen die Funktion des *p53*-Gens fehlt, einen reversiblen Wachstumsstopp induziert, der in die G1-Phase fällt (Smolinski und Meltzer 2000) (siehe auch Abb. 7).

p53 kontrolliert die G1- und G2/M-Zellzyklus-Kontrollpunkte, die den Wachstumsarrest vermitteln. MDM2 bindet an die N-terminale Domäne von p53 und reguliert negativ die transkriptionellen Funktionen von p53, u.a. seine Fähigkeit Zellzyklus-Arrest zu induzieren (Mayo et al. 2001).

Es werden ständig neue spezifische molekulare „*targets*“ entdeckt, die als mögliche Angriffspunkte neuer antitumoröser Medikamente fungieren können. So dass die Möglichkeit besteht, dass man durch Eingreifen in die Regulation des G1-Checkpoints womöglich einen Angriffspunkt findet, der gerade bei therapierefraktären Tumoren eine Verbesserung der Behandlung darstellen könnte.

Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen führt zu einer Akkumulation von p53.

Gupta et al. konnte zeigen, dass Gliomzellen, die die Wildtyp p53-Funktion besitzen, einen konstanten G1-Arrest nach Bestrahlung aufweisen, der direkt mit der Strahlendosis

zusammenhängt. Dieser p53-abhängige G1-Arrest ist verantwortlich für den Anstieg der apoptotischen Zellen nach Bestrahlung (1996).

## 2.4 Zellzyklus-Regulation

### 2.4.1 Zellzyklus-Kontrollpunkte

Unter dem Zellzyklus versteht man die Vorgänge zwischen zwei Zellteilungen. Der Zellzyklus wird in 4 Schritte eingeteilt, wobei die M-(Mitose)-Phase und die Interphase (unterteilt in G1-, S-, G2-Phase) unterschieden werden.

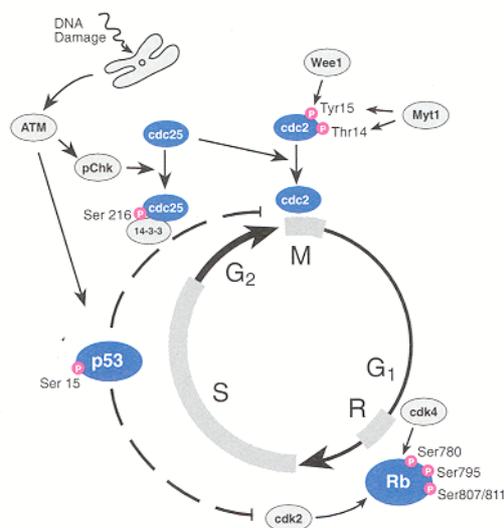


Abb. 7: Der Zellzyklus (modifiziert nach Cell Signaling Technology Catalog 2000-2001)

Die Mitosephase gliedert sich in Pro-, Meta-, Ana-, und Telophase, mit dem Ergebnis zweier identischer Tochterzellen. Nach der Mitose folgt die G1-Phase (erste Gap-Phase; engl. gap = Lücke), in der die Zellen ihre spezifischen Funktionen erfüllen. Aus dieser Phase kann die Zelle nun entweder in die G0-Phase (eine Art Ruhe-Phase) oder in die S-Phase übergehen. In der S-Phase kommt es zu einer Verdoppelung der DNA. Es folgt die G2-Phase (zweite Gap-Phase), nach der die Zellen wieder in die Mitose eintreten können (Campbell 2000).

An verschiedenen Phasenübergängen existieren Kontrollpunkte, an denen die Zelle kontrolliert wird, bevor sie die nächste Phase durchlaufen kann. Diese Kontrollpunkte sind

---

von entscheidender Bedeutung, da Mutationen auftreten können, die sonst unkontrolliert und unrepariert an die Tochterzellen weitergegeben werden. Am Ende der G1-Phase, kurz bevor die Zelle in die S-Phase übergeht und mit der DNA-Synthese beginnt, befindet sich einer dieser Kontrollpunkte, der sog. G1-Kontrollpunkt. An diesem Punkt wird eine „Alles-oder-Nichts-Entscheidung“ gefällt. War die Kontrolle erfolgreich, beginnt die Zelle mit der Verdopplung der DNA und teilt sich anschließend. Sonst geht die Zelle, ohne sich zu teilen, in die G0-Phase über, in der sich die meisten Zellen, des menschlichen Organismus befinden (Campbell 2000).

Für diese Kontrollsysteme sind bestimmte Gene zuständig, die verschiedene Proteine produzieren, die diese Regulationen übernehmen. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Proteine (z.B. Cycline, Cdk (Cyclin-abhängige Kinasen), Phosphatasen, Kinasen) haben in den letzten Jahren weitere Einblicke in die Regulation des Zellzyklus erlaubt. Eine weitere Proteinfamilie, die eine zentrale Rolle in der Zellzyklus-Regulation übernimmt, stellen die Cdk-Inhibitoren dar. Sie können an verschiedenen Stellen des Zellzyklus negativ auf die Aktivität der Cdk wirken. Der erste Cdk-Inhibitor, der identifiziert wurde, ist p21. Die p21-Expression ist niedrig in der G1-Phase, steigt jedoch mit zunehmendem Fortschreiten des Zellzyklus an. Man vermutet, dass dieser Inhibitor verantwortlich für die Vermittlung des Zellzyklus-Arrests als Antwort auf DNA-Schäden ist (Smolinski und Meltzer 2000). p21 wird von p53 induziert und dies führt wiederum zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase. Es zeigte sich, dass diese Inhibitoren in vielen Tumoren (z.B. in Lymphomen, Leukämien, Brust- und Blasenkrebs) ihre Funktion aufgrund von Mutationen verändert haben (Buolamwini 2000). Weiterhin wurde von onkogenetischen Amplifikationen und Überexpression der cdk in verschiedenen Tumoren wie z.B. in Gliomen oder Weichteilsarkomen berichtet.

Ionisierende Strahlung führt zu einer Akkumulation von Zellen gehäuft in der G1- und G2-Phase. Jedoch kommt es auch zu einer Inhibierung der Replikation und Elongation, was in einem transienten Arrest in der S-Phase führt. Weiterhin ist es von entscheidender Bedeutung für die Radiosensitivität einer Zelle, in welcher Phase des Zellzyklus sie sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung befindet. Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Zellen in der M-Phase am empfindlichsten gegenüber ionisierender Strahlung reagieren. Zellen, die sich am Übergang zwischen G1- und S-Phase befinden, weisen ebenfalls eine auffallende Sensitivität gegenüber Bestrahlung auf, die jedoch nicht so ausgeprägt wie in der M-Phase ist (Kiefer

1981). Nach einer Bestrahlung überleben hauptsächlich die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in einer „resistenten“ Phase befinden. Nach dem Einwirken ionisierender Strahlen schreiten diese Zellen in Phasen des Zellzyklus, in denen sie sensitiver auf die Radiatio reagieren.

Es tritt jedoch in allen Phasen des Zellzyklus nach Bestrahlung eine Verzögerung des Fortschreitens in die nächste Phase auf. Die Dauer der Verzögerung ist von verschiedenen Faktoren abhängig: der Zelllinie, der Strahlendosis und dem Alter der Zelle zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Am längsten ist die Verzögerung für Zellen in der G2-Phase, so dass es zu einem rapiden Abfall des mitotischen Index kommt. Nach einer gewissen Zeit, die wiederum abhängig von Zelllinie und Strahlendosis ist, beginnen die Zellen wieder durch den Zellzyklus fortzuschreiten und der Mitoseindex normalisiert sich. Bestrahlung führt also zu einer partiellen Synchronisation der Zellen (Wang 2000).

### **3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT**

Glioblastome sind hochmaligne Hirntumoren, die sich als besonders resistent gegenüber einer Behandlung erweisen. Es ist daher dringend notwendig, neue therapeutische Strategien zu entwickeln. Um ein besseres Verständnis für die funktionellen Aspekte der Apoptosekontrolle sowie der Regulation des Zellzyklus in Gliomen zu erhalten, war es Ziel dieser Arbeit, die molekularen Veränderungen als Reaktion auf Behandlung mit Inhibitoren verschiedener apoptotischer Signalwege als auch in Kombination mit ionisierender Strahlung zu untersuchen.

Es scheint, dass die Aktivierung der anti-apoptotischen Proteinkinase Akt in einem Teil maligner Gliome für die Entwicklung der erheblichen Therapieresistenz dieser Tumoren mitverantwortlich ist (Hopkin 1998). Ein weiterer wichtiger Angriffspunkt stellt der p70 S6K-Signalweg dar, der in der Signalkaskade dem PI3K-Weg nachfolgt, so dass es nahe lag, die Konsequenzen einer Blockade dieser Signalwege alleine sowie in Kombination mit Bestrahlung genauer zu betrachten.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die funktionelle Regulation intrazellulärer Signaltransduktionswege glialer Tumorzellen bei experimenteller Bestrahlung zu untersuchen, um die Möglichkeiten der Blockade anti-apoptotischer Signalwege als neuen Ansatz für eine adjuvante Therapie bei Patienten mit GBM zu analysieren.

Im Einzelnen sollte bei vier verschiedenen GBM-Zelllinien mit unterschiedlichen p53- und PTEN-Status der Effekt von Bestrahlung in Kombination mit Signalwegsinhibitoren untersucht werden. Dabei sollte insbesondere das zelluläre Überleben, die Zellproliferation, der Zellzyklus sowie die biochemischen Effekte auf die Signalwege beobachtet werden.

## 4. MATERIAL UND METHODIK

### 4.1 *Material*

#### 4.1.1 Chemikalien und Geräte

Alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden – soweit nicht gesondert in der unten angegebenen Tabelle erwähnt – von Boehringer Ingelheim Bioprodukte, Ingelheim, Deutschland, bezogen.

<i>Chemikalien</i>	<i>Firma</i>
Zellkultur-Medien	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Zellkultur-Seren	
Trypsin/EDTA	
Streptomycin, Glutamin, Penicillin	
Proteinassay nach Bradford (1976)	BioRad, München, Deutschland
Rapamycin	Biomol Research Laboratories, Hamburg, Deutschland
LY 294002	
Diff Quick	Dade Behring, Schwalbach, Deutschland
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

*Tab. 2: Verwendete Chemikalien*

Die sterile Plastikware für die Zellkultur wurde bei Falcon, New Jersey, USA, bezogen. Röntgenfilme Kodak X-OMAT MA und Kodak Biomax light wurden bei Eastman Kodak, Rochester, USA bestellt. Polyvinylidon-Difluorid (PVDF) Immobilion-Membranen für Westernblots wurden von Millipore, Bedford, MA, USA, bezogen.

Folgende Geräte kamen in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz:

<i>Geräte</i>	<i>Firma</i>
Sterikult 200 Inkubator: Heraeus cytoperm 2 incubator	Kendro, Hanau, Deutschland
Protein-Gelelektrophoresekammer: Mini-Protean II cell chamber	BioRad, Hercules, CA, USA
Blotkammer: Semi-Dry Transfer Cell	
Spannungsquelle: Power Pac 300	
Photometer für Bradford-Assay: Spektralfotometer DU530	Beckman, Fullerton, CA, USA
Photometer für Zellproliferations-Assay: Digiscan	Mikrotech, Hohenlinden, Deutschland
FACS Calibur	BD Biosciences, San Diego, CA, USA

*Tab. 3: Verwendete Geräte*

#### **4.1.2 Zelllinien**

Die humanen GBM-Zelllinien LN18 und LN229 wurden uns von Dr. E. Van Meir, Lausanne, Schweiz, überlassen (Ishii et al. 1999). Die Primärkulturen G109 und G139 stammten aus einem Kollektiv von insgesamt 21 humanen glialen Tumoren und normalen Fibroblasten, die von K. Münkler und Dr. B. Eifert vom Institut für Neurochirurgie der Universität Heidelberg, Deutschland, etabliert und unserem Labor zur Verfügung gestellt wurden (Kraus et al. 2000).

---

### 4.1.3 Puffer und Lösungen

Folgende Standardpuffer (modifiziert nach Sambrook et al.1989) wurden verwendet:

TBS Puffer:	20 mM Tris, 138 mM NaCl, pH 7,6
TTBS Puffer:	20 mM Tris, 138 mM NaCl, 0,1 % Tween 20
SDS Ladepuffer:	62,5 mM Tris-Cl (pH 6,8), 2 % SDS, 10 % Glycerol, 50 mM DTT, 0,1 % Bromphenol Blau
Zellyse Puffer:	20 mM Tris-Cl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 2,5 mM Natrium Pyrophosphat, 1 mM $\beta$ - Glycerolphosphat, 1 mM $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 mM PMSF
PBS Puffer:	138 mM NaCl, 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,4 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4
SDS Laufpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Bradford-Reagenz:	0,01 % Coomassie Brilliant Blau G-250, 4,7 % Ethanol, 8,5 % Phosphorsäure, $\text{H}_2\text{O}$ ad 1 Liter

#### 4.1.4 Antikörper

Zum Proteinnachweis wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Antikörper	Antigen	Molekulare Masse [kDa]	Verdünnung in TTBS	Quelle
Phospho-Akt	AS Ser473	60	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Gesamt-Akt	Humanes AKT	60	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Phospho-MAPK	AS Thr202/Thr204	42/44	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Gesamt-MAPK	Humanes MAPK	42/44	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Phospho-SAPK/JNK	AS Thr183/Tyr185	46/54	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Gesamt-SAPK/JNK	Humanes SAPK/JNK	46/54	1:1000	Polyklonales Kaninchen-IgG
Phospho-p70 S6K	AS Thr389	70/85	1:500	Polyklonales Kaninchen-IgG
Gesamt-p70 S6K	Humanes p70 S6K	70	1:500	Polyklonales Kaninchen-IgG
Cleaved-PARP	Humanes cleaved-PARP	89	1:2000	Polyklonales Kaninchen-IgG
PARP	Humanes PARP <sup>1)</sup>	89/116	1:2000	Polyklonales Kaninchen-IgG
HRP-konj.-Anti-Rabbit	Zweit-Antikörper		1:2000	Polyklonales Ziegen-IgG

1) volle Länge

*Tab. 4: Verwendete Antikörper*

Alle oben aufgeführten Antikörper wurden bei Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA, bestellt.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien G109 und G139 wurden als Monolayer-Kulturen in 10 cm Petrischalen mit RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin supplementiert war.

Die Zelllinien LN229 und LN18 wurden ebenfalls als Monolayer-Kulturen in 10 cm Petrischalen in DMEM Medium (Dulbecco's Minimal Essential Medium) kultiviert. Das DMEM Medium war ebenfalls mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100

---

U/ml Streptomycin versetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> und 92 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert, alle 2-3 d passagiert und bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % für die Versuche ausgesät.

#### **4.2.2 Behandlung mit Inhibitoren**

Da durch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren unerwünschte Nebeneffekte entstehen können, wurden die Zellen 24 h vor einem Versuch in serumfreien Medium gehalten.

Als spezifischer PI3K-Inhibitor wurde LY 294002 für 24 h bei einer Konzentration von 20 µM Medium eingesetzt.

Weiterhin wurden die Zellen mit dem Makrolid-Antibiotikum Rapamycin für 24 h bei einer Konzentration von 100 nM Medium behandelt.

Außerdem wurden bei jedem Versuch unbehandelte Zellen, die ebenfalls 24 h serumfrei gehalten wurden, als Kontrolle mitgeführt. Nach der Behandlung mit den entsprechenden Inhibitoren wurden die Zellen zur Beendigung der Inhibition mit eiskaltem PBS gewaschen und danach auf Eis, wie unten beschrieben, lysiert.

#### **4.2.3 Bestrahlung**

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte im Institut für Strahlentherapie der Technischen Universität München (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. M. Molls).

Um auch die hier die unerwünschten Nebenwirkungen durch die im Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren zu umgehen, wurden die Zellen ebenfalls 24 h vor Bestrahlung in serumfreiem Medium gehalten. Die proliferierenden Zellen wurden in 24-well-Platten (10<sup>4</sup> Zellen pro Vertiefung), in 6-well-Platten oder 10 cm Petrischalen (beide mit 80 %iger Konfluenz der Zellen) mit Gamma-Strahlung von einer Kobalt-Quelle (6 MeV) mit einer Dosisleistung von 6 Gy/min bestrahlt.

Zu Beginn der Experimente wurden die Zellen mit 2, 4, 6, 8 und 10 Gy bestrahlt, um die geeignete Strahlendosis für die weiteren Untersuchungen zu ermitteln. Aufgrund der Ergebnisse wurde eine Strahlendosis von 6 Gy gewählt.

Die Proteinisolierung und der „Colony Assay“ wurden 2 h nach Bestrahlung durchgeführt. Für die Zellzyklus-Bestimmung wurden die Zellen 24 h nach Bestrahlung in 70 % Methanol fixiert.

#### **4.2.4 Proteinextraktion**

Nach einmaliger Spülung mit eiskaltem PBS wurden die Zellen durch Inkubation mit Triton X-100-Lysis-Puffer für 10 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde mittels eines Zellschabers abgekratzt und in Eppendorf-Tubes überführt. Der Zelldebris wurde abzentrifugiert (10.000 U/min, 10 min, 4 °C) und der Überstand bei –20 °C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford 1976) ermittelt.

#### **4.2.5 Bradford-Assay**

Die Proben wurden zunächst mit PBS und mit PBS mit 0,01 % Triton X-100 1:250 bzw. 1:500 verdünnt und danach mit dem Bradford-Reagenz (s. 4.1.3) versetzt. Danach wurden die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert aus 0,01 % Triton X-100 in PBS und Bradford-Reagenz gemessen. Da sich die Absorption bei Messung mit entsprechender Wellenlänge proportional zu der vorhandenen Proteinmenge verhält (Bradford 1976), konnten aus den gemessenen Absorptionswerten und mit Hilfe der Absorptionen eines bekannten Proteinstandards die Konzentrationen berechnet werden.

#### **4.2.6 SDS-PAGE**

10 µg Gesamtprotein wurden in 5-fach konzentriertem SDS-Laufpuffer aufgenommen und für 5 min bei 100 °C denaturiert. Danach wurden die Proben kurz abzentrifugiert und auf 10-%ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele geladen. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Mini-Protein-Gelkammer von Biorad bei 120 V für 1,5 h in SDS-Laufpuffer.

#### 4.2.7 Westernblot

Die SDS-Gele wurden nach Sambrook (Sambrook et al. 1989) in einem halbtrockenen („semi-dry“) System aus 3 Puffern (Anodenpuffer I: 0,3 M Tris, 20 % Methanol; Anodenpuffer II: 25 mM Tris, 20 % Methanol; Kathodenpuffer: 25 mM Tris, 40 mM  $\epsilon$ -Amino-n-capronsäure, 20 % Methanol) auf PVDF-Membranen „geblottet“ (225 mA, 1 h). Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran 1 h in TTBS + 5 % fettfreiem Magermilchpulver geblockt, einmal mit TTBS gespült und anschließend über Nacht mit dem Primär-Antikörper bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x 5 min mit TTBS gespült und 1 h mit dem Sekundär-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte die Immunreaktion durch verstärkte Chemielumineszenz-Reaktion mit ECL Western blotting detection reagents. Die Reaktion basiert auf einem Umsetzen des in dem Reagenz enthaltenen Substrats in einen fluoreszierenden Farbstoff durch die Meerrettich-Peroxidase des Sekundär-Antikörpers. Die Visualisierung dieser Fluoreszenzreaktion erfolgte mittels Exposition von hochsensiblen Röntgenfilmen wie Kodak BioMax light für 60 s oder X-OMAT MA für 5, 10 oder 15 min.

#### 4.2.8 Behandlung der Membranen zur Expressionskontrollen-Analyse

Zum Nachweis der Gesamtexpression einiger Proteine wurden die Membranen in 0,1 M Glycin (pH 2,5) 30 min „gestrippt“, 3 x 20 min mit TTBS gespült und wieder 1 h in TTBS + 5 % fettfreiem Magermilchpulver geblockt. Mit diesen Membranen wurde dann wie beim Westernblot (wie unter 4.2.7 beschrieben) weiterverfahren; es wurden nur die Gesamt-Antikörper bei den weiteren Schritten verwendet.

#### 4.2.9 Klonogenes Wachstum

Zur Bestimmung des klonogenen Wachstums wurden sog. „Colony Assays“ durchgeführt. 24 h vor Behandlung oder Bestrahlung wurden  $10^4$  Zellen auf 6-well-Platten ausplattiert. 2 h nach Bestrahlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und „abtrypsinisiert“. Die Zellsuspension wurde in jeweils 20 ml Medium aufgenommen und auf eine 15 cm Petrischale ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank für 10 d unter

---

Standardbedingungen kultiviert, danach mit Methanol fixiert und mittels Vitalfärbung (Diff-Quik von Dade Behring) angefärbt.

Anschließend wurden digitale Aufnahmen der gefärbten Platten gefertigt, die mittels der NIH image v. 1.5 Software analysiert wurden. Kolonien unterschiedlicher Größenordnung wurden ausgezählt: Klasse 1 mit einem minimalen Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$ , Klasse 2 mit mehr als 500  $\mu\text{m}$  und Klasse 3 mit mehr als 1 mm. Statistische Analysen der Unterschiedlichkeit der Koloniegrößenverteilung unter unterschiedlicher Behandlung wurden mit dem chi-square Test durchgeführt.

#### **4.2.10 Zellzyklus-Bestimmung**

24 h nach Bestrahlung wurden bestrahlte und nicht bestrahlte Zellen als Kontrolle in eiskalten 70 % Methanol fixiert. Die Zelldichte lag bei etwa  $10^6$  Zellen pro ml. Die Zellzyklus-Bestimmungen wurden im Institut für Pathologie der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. med. F. Hofstädter) durchgeführt. Hierzu wurden die fixierten Zellen mit 50  $\mu\text{l}$  RNase (Konzentration 1 mg/ml) bei 37 °C für 20 min inkubiert und danach mit 0,05 mg/ml Propidiumjodid angefärbt. Die Messungen wurden mittels des Durchflusszytometers FACS Calibur durchgeführt. Das Gerät enthält einen Argon Laser, dessen Emissionswellenlänge 488 nm beträgt. Diese Wellenlänge eignet sich zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid, mit dem die Zellen markiert wurden. Mittels eines Photomultipliers können die jeweiligen Lichtsignale aufgenommen und in elektrische Signale moduliert und verstärkt werden. Diese Signale wurden durch einen Analog-Digital-Wandler, der mit dem Durchflusszytometer verbunden ist, in digitale Werte konvertiert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Histogrammen, bei denen die Fluoreszenzintensität gegen die relative Anzahl registrierter „Ereignisse“ aufgetragen wurde.

#### **4.2.11 Proliferationsmessung**

Um die quantitative Zellschädigung zu ermitteln, wurde ein Zellproliferations-Assay nach Versteeg (Versteeg et al. 2000) 24 h nach Bestrahlung sowohl mit bestrahlten als auch mit nicht bestrahlten Zellen durchgeführt. Für diesen Versuch wurden jeweils  $10^4$  Zellen pro Vertiefung auf 24-well-Platten ausplattiert und weitere 24 h unter normalen Bedingungen

kultiviert. Danach wurden die Zellen für weitere 24 h mit FCS-freiem Medium und den verschiedenen Inhibitoren inkubiert und anschließend nach Mediumwechsel mit 6 Gy bestrahlt. Nach wiederum 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 4 % Formaldehyd in PBS für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS und anschließend 2 x mit aqua dest. gewaschen. Die Platten wurden 5 min luftgetrocknet und je 500  $\mu$ l 0,04 %ige Kresylviolettlösung zu den Zellen überführt. Nach 30 min wurden die Zellen 2 x mit aqua dest. gewaschen und mit 500  $\mu$ l 1-%iger SDS-Lösung lysiert. Die Zellen wurden nun eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler lysiert und anschließend auf 96-well-Platten überführt. Die Absorptionsmessung fand bei 595 nm statt.

Für die Auswertung wurden die Extinktionen in Prozentzahlen umgerechnet und in Excel-Tabellen graphisch dargestellt, wobei die Kontrolle (Konzentration 0  $\mu$ M) mit 100 Prozent gleich gesetzt wurde.

#### **4.2.12 Statistik**

Die in dieser Arbeit verwendeten statistischen Auswertungen werden im jeweiligen Absatz aufgeführt.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Etablierungsversuche

#### 5.1.1 Zellkultur

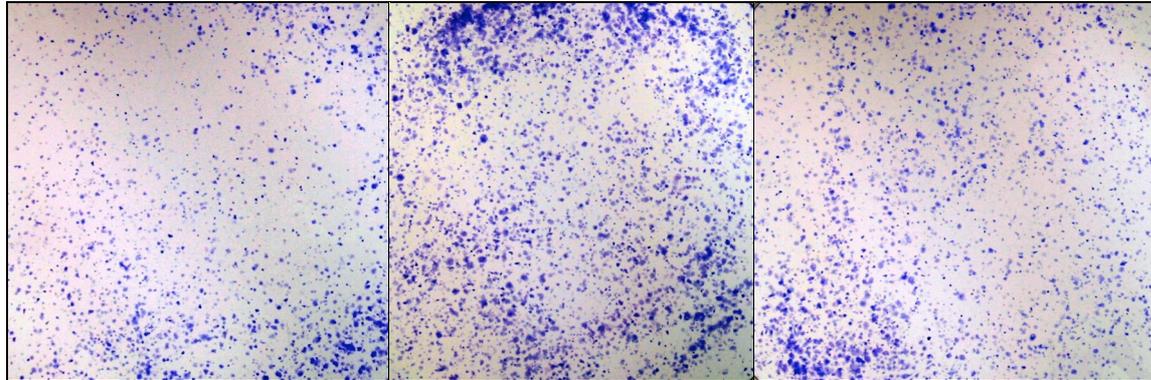
In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgemeinschaft wurden die in dieser Arbeit verwendeten humanen Gliomzelllinien hinsichtlich ihres funktionellen p53-, Akt- und PTEN-Status charakterisiert, so dass diese Daten vor Beginn dieser Arbeit bereits vorlagen (Schlegel et al. 2000) (Kraus et al. 2000).

	<b>LN18</b>	<b>LN229</b>	<b>G109</b>	<b>G139</b>
<b>p53</b>	mutiert	wt	mutiert	wt
<b>Akt</b>	konst. aktiviert	nicht aktiviert	konst. aktiviert	konst. aktiviert
<b>PTEN</b>	wt	wt	mutiert	mutiert

Tab. 5: p53-, Akt-, PTEN-Status der humanen Gliomzelllinien LN18, LN229, G109, G139

#### 5.1.2 Dosisfindung für Bestrahlungsversuche

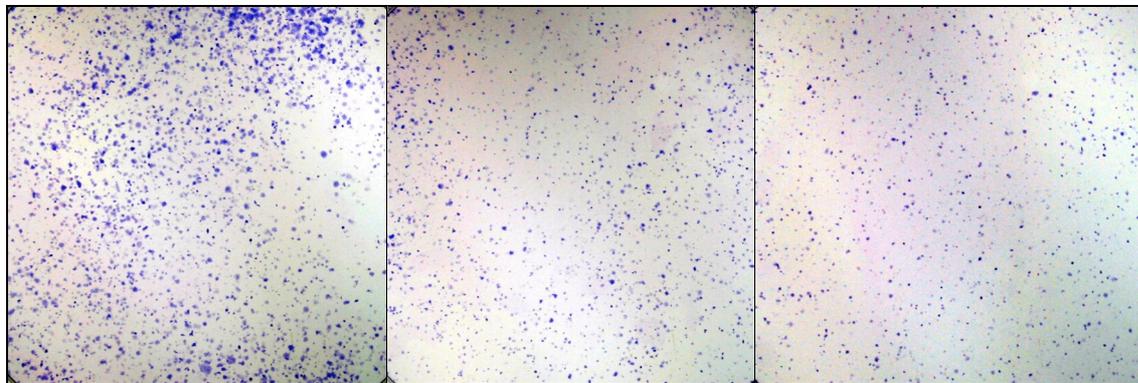
Um die geeignete Dosis für die Bestrahlungsversuche herauszufinden, wurden alle vier Zelllinien mit unterschiedlichen Dosen (2, 4, 6, 8, 10 Gy) bestrahlt und anschließend der Effekt auf das Koloniebildungsverhalten untersucht. Es zeigte sich, dass bei allen Zelllinien der größte Effekt zwischen 4 und 8 Gy auftrat, so dass als geeignete Dosis 6 Gy ausgewählt wurde (siehe Abb. 8 und 9; die Zelllinien G109 und LN229 bilden nur relativ kleine Kolonien und wurden deshalb hier nicht gesondert dargestellt).

**Zelllinie G139**

Kontrolle

2 Gy

4 Gy

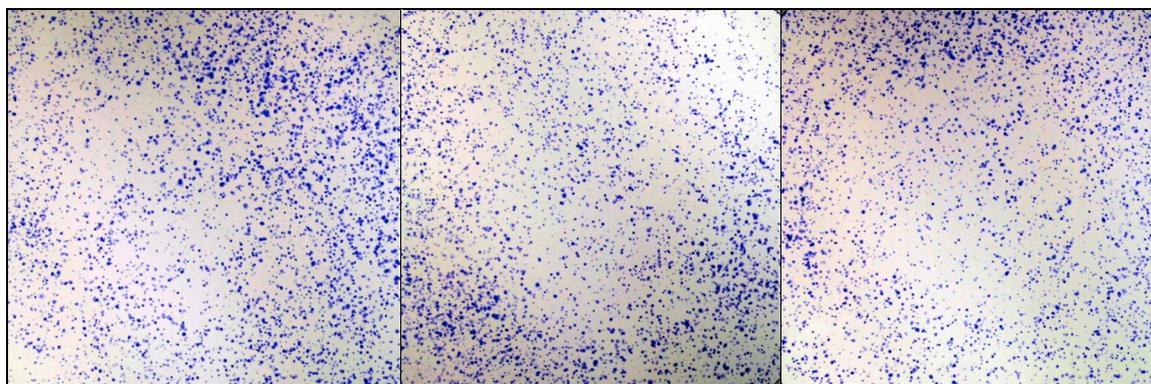


6 Gy

8 Gy

10 Gy

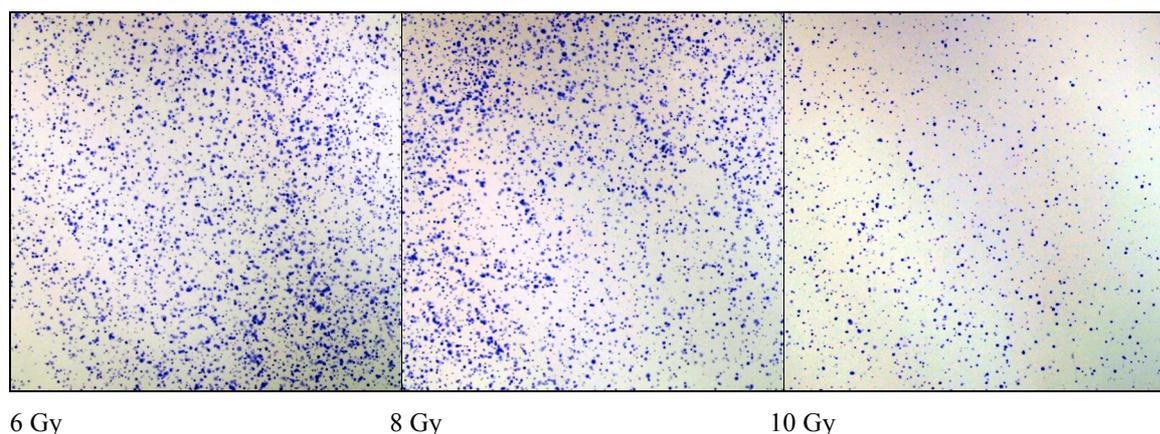
*Abb. 8: Koloniebildungsverhalten der Zelllinie G139 nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlendosen*

**Zelllinie LN18**

Kontrolle

2 Gy

4 Gy



*Abb. 9: Koloniebildungsverhalten der Zelllinie LN18 nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlendosen*

## **5.2 Bestrahlungseffekt auf Koloniebildung**

Zur Bestimmung der qualitativen sowie quantitativen Zellschädigung wurde ein „Colony-Assay“ (siehe 4.2.9) durchgeführt. Die glialen Zelllinien wurden wie unter 4.2.2/4.2.3 beschrieben vorbehandelt und bestrahlt. Als Kontrolle wurden nichtbestrahlte unbehandelte und nichtbestrahlte behandelte Zellen mitgeführt.

Anschließend wurden digitale Aufnahmen der gefärbten Platten gefertigt, die mittels der NIH image v. 1.5 Software analysiert wurden. Kolonien unterschiedlicher Größenordnung wurden ausgezählt: Klasse 1 mit einem minimalen Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$ , Klasse 2 mit mehr als 500  $\mu\text{m}$  und Klasse 3 mit mehr als 1 mm. Statistische Analysen der Unterschiedlichkeit der Koloniegrößenverteilung unter unterschiedlicher Behandlung wurden mit dem chi-square Test durchgeführt.

### **5.2.1 Zelllinie G139**

Bei den G139-Zellen führte alleinige Bestrahlung mit 6 Gy zu Abnahme der Kolonienanzahl um 53 %. Bei zusätzlicher Behandlung mit den Inhibitoren LY 294002 und Rapamycin konnten keine Kolonien mehr nachgewiesen werden.

Alleinige Behandlung mit den Inhibitoren führte zu einer Reduktion der Anzahl der Kolonien um 58 bzw. 78 %.

G139	Ohne Bestrahlung		6 Gy	
	Anzahl der Kolonien	Anzahl der Kolonien in %	Anzahl der Kolonien	Anzahl der Kolonien in %
Kontrolle	36	100	17	47
LY 294009	15	42	0	0
Rapamycin	8	22	0	0

Tab. 6: „Colony-Assay“-Ergebnisse der Zelllinie G139

### 5.2.2 Zelllinie LN229

Es zeigte sich eine starke Reduktion der Anzahl der Kolonien um 83 % nach Bestrahlung mit 6 Gy. Zusätzliche Behandlung mit LY 294002 führte zu einer Verminderung der Kolonienzahl um 92 %. Die zusätzliche Behandlung mit Rapamycin zeigte eher einen leicht proliferativen Effekt, da es hier nur zu einer Reduktion um 75 % kam.

Alleinige Behandlung mit den Inhibitoren führte auch zu einer Verminderung der Anzahl der Kolonien (bei LY 294002 um 92 %; bei Rapamycin um 8 %).

LN229	Ohne Bestrahlung		6 Gy	
	Anzahl der Kolonien	Anzahl der Kolonien in %	Anzahl der Kolonien	Anzahl der Kolonien in %
Kontrolle	12	100	2	17
LY 294009	1	8	1	8
Rapamycin	11	92	3	25

Tab. 7: „Colony-Assay“-Ergebnisse der Zelllinie LN229

### 5.2.3 Zelllinie LN18

Alleinige Bestrahlung mit 6 Gy führte bei dieser Zelllinie zu einer Verminderung der Kolonienanzahl um 100 %. Zusätzliche Behandlung mit LY 294002 oder Rapamycin führt ebenfalls zu einer Verminderung der Kolonienanzahl auf 0 %.

Alleinige Behandlung mit LY 294002 bzw. Rapamycin führte zu einer Reduktion der Kolonienzahl um 95 bzw. 55 %.

LN18	Ohne Bestrahlung		6 Gy	
	Anzahl der Kolonien	Anzahl der Kolonien in %	Anzahl der Kolonien	Anzahl der Kolonien in %
Kontrolle	20	100	0	0
LY 294009	1	5	0	0
Rapamycin	9	45	0	0

Tab. 8: "Colony-Assay"-Ergebnisse der Zelllinie LN18

#### 5.2.4 Zelllinie G109

Da diese Zelllinie nur sehr kleine Kolonien bildet, ließen sich hier mittels der ausgewählten Durchmesser für die Koloniegröße nach Bestrahlung mit 6 Gy mit und ohne Behandlung mit Inhibitoren keine auswertbaren Kolonien mehr nachweisen.

G109	Ohne Bestrahlung		6 Gy	
	Anzahl der Kolonien	Anzahl der Kolonien in %	Anzahl der Kolonien	Anzahl der Kolonien in %
Kontrolle	0	100	0	0
LY 294009	0	0	0	0
Rapamycin	0	0	0	0

Tab. 9: "Colony-Assay"-Ergebnisse der Zelllinie G109

### 5.3 Bestrahlungseffekt auf Zellzyklus-Kontrollpunkte

Der Bestrahlungseffekt auf die Zellzyklus-Kontrollpunkte wurde mittels FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) an in Methanol fixierten Zellen der oben genannten 4 glialen Zelllinien analysiert (siehe 4.2.10). Die Zelllinien wurden wie unter 4.2.2/4.2.3 beschrieben mit den Inhibitoren behandelt und mit 6 Gy bestrahlt. Als Kontrolle wurden nichtbestrahlte unbehandelte und nichtbestrahlte behandelte Zellen mitgeführt.

Im Folgenden sind die gewonnenen Ergebnisse beschrieben und mittels Histogrammen wiedergegeben. Zusätzlich sind die Resultate prozentual in den jeweiligen Tabellen aufgelistet.

#### 5.3.1 Kontrolle

Bei der Zelllinie G139 befanden sich die meisten der unbehandelten Zellen in der G2/M-Phase, die wenigsten in der S-Phase.

Die weiteren drei Zelllinien zeigten sehr ähnliche Ergebnisse in der Kontrolle: Die überwiegende Anzahl der Zellen befanden sich hier in der G0/G1-Phase und die wenigsten in der G2/M-Phase.

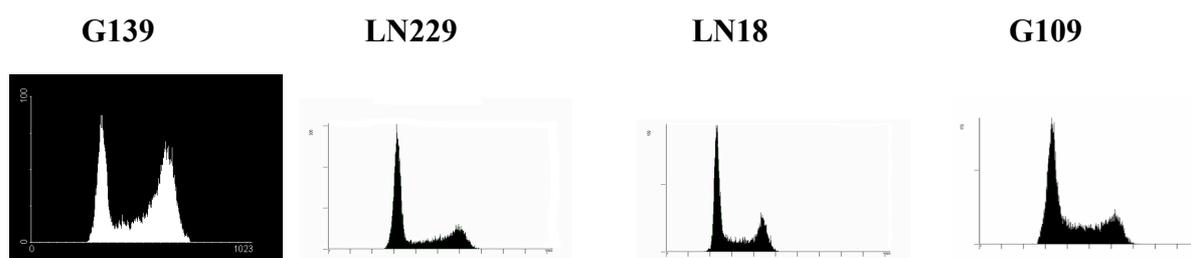


Abb. 10: FACS-Analyse der unbehandelten und nichtbestrahlten glialen Zelllinien

Probennummer	G0/G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2/M-Phase [%]
G139, Kontrolle	29,90	26,00	44,00
LN229, Kontrolle	54,70	27,20	18,10
LN18, Kontrolle	48,70	32,20	19,10
G109, Kontrolle	47,60	41,60	10,80

Tab. 10: Prozentuale Darstellung der in der FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse

### 5.3.2 Behandlung mit Rapamycin

Nach Behandlung mit Rapamycin zeigt sich bei der Zelllinie G139 ein deutlicher Anstieg des Anteils der Zellen in der G0/G1-Phase als Zeichen einer G1-Arretierung. Bei der LN229-Zelllinie findet sich ebenfalls ein Anstieg der in der G0/G1-Phase befindlichen Zellen, jedoch sehr gering ausgeprägt. Bei der Zelllinie LN18 kommt es nach Behandlung mit Rapamycin zu einer Reduktion der Zellen in der G0/G1-Phase und der G2/M-Phase; die größte Anzahl der Zellen befindet sich hier in der S-Phase. Bei der G109-Zelllinie zeigt sich als Zeichen des G1-Arrests auch eine geringe Zunahme des Anteils der Zellen in der G0/G1-Phase.

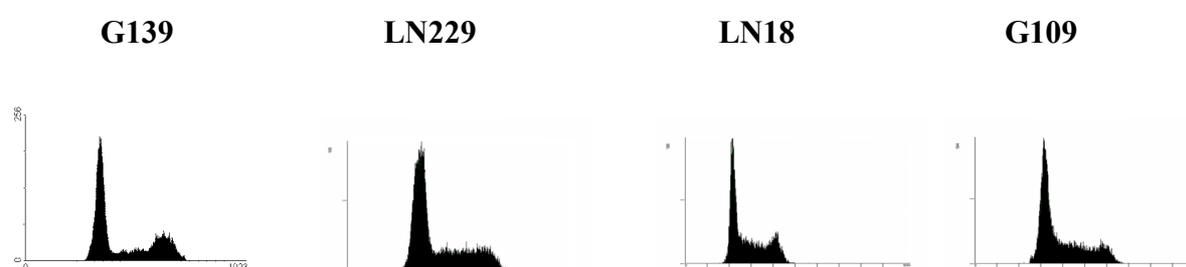


Abb. 11: FACS-Analyse der glialen Zelllinien nach Rapamycin-Behandlung

Probennummer	G0/G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2/M-Phase [%]
G139, Rapamycin	55,20	22,90	21,90
LN229, Rapamycin	56,10	37,80	6,10
LN18, Rapamycin	41,30	49,90	8,80
G109, Rapamycin	52,20	47,80	0,00

Tab. 11: Prozentuale Darstellung der in der FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse

### 5.3.3 Behandlung mit LY 294002

Die G139-Zelllinie zeigte eine G2/M-Arretierung. Bei LN229-Zellen zeigte sich ein geringer Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase als Zeichen eines G1-Arrests. Die Zelllinie LN18 wies einen deutlichen Anstieg der Zellen in der S-Phase auf, bei gleichzeitiger Reduktion der Gesamtzahl der Zellen in der G0/G1- und G2/M-Phase.

Die G109-Linie wurde durch die Behandlung mit LY 294002 so geschädigt, dass eine Auswertung mittels FACS-Analyse nicht möglich war.

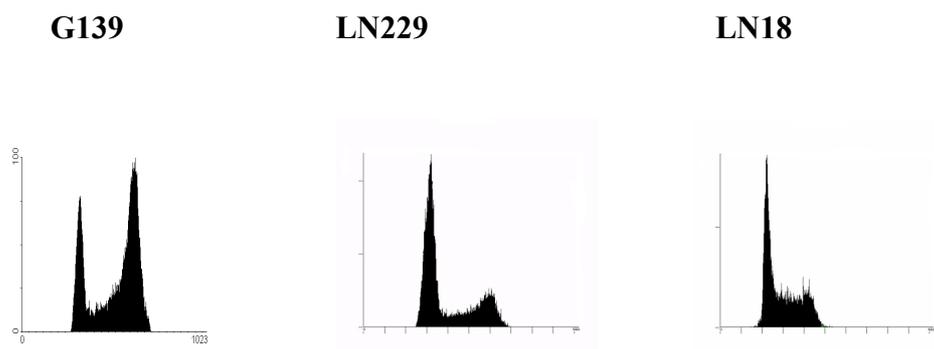


Abb. 12: FACS-Analyse der glialen Zelllinien nach Behandlung mit LY 294002

Probennummer	G0/G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2/M-Phase [%]
G139, LY	20,60	26,60	52,80
LN229, LY	59,60	23,30	17,00
LN18, LY	38,80	53,90	7,40
G109, LY	nicht auswertbar		

Tab. 12: Prozentuale Darstellung der in der FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse

### 5.3.4 Bestrahlung

Nach Bestrahlung zeigten alle Zelllinien außer den LN229-Zellen einen Anstieg des Anteils der Zellen in der G2/M-Phase als Zeichen eines G2/M-Arrests. Am deutlichsten ausgeprägt zeigte sich dies bei der Zelllinie G139, am wenigsten bei den Zellen LN18.

Bei den LN229-Zellen zeigte sich keine wesentliche Veränderung der prozentualen Anteile der Zellen nach Bestrahlung.

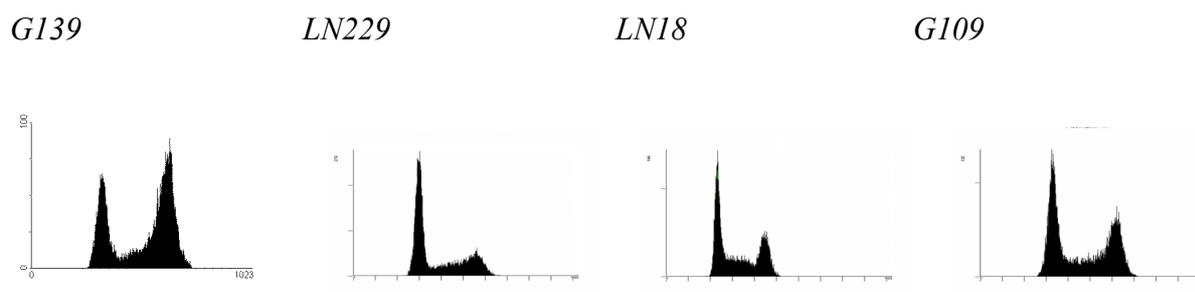


Abb. 13: FACS-Analyse der glialen Zelllinien nach Bestrahlung (6 Gy)

Probennummer	G0/G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2/M-Phase [%]
G139, 6Gy	6,20	20,20	53,40
LN229, 6Gy	54,70	28,80	16,50
LN18, 6Gy	38,50	42,00	19,60
G109, 6Gy	39,80	33,50	27,00

Tab. 13: Prozentuale Darstellung der in der FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse

### 5.3.5 Bestrahlung und Behandlung mit Rapamycin

Die Zelllinien G139 und LN229 wiesen nach Bestrahlung und zusätzlicher Rapamycin-Behandlung eine G1-Arretierung auf, die bei den LN229-Zellen deutlicher ausgeprägt war. Bei den Zelllinien LN18 und G109 kam es zu einem Anstieg des Anteils der Zellen in der G2/M-Phase als Zeichen eines G2/M-Arrests.

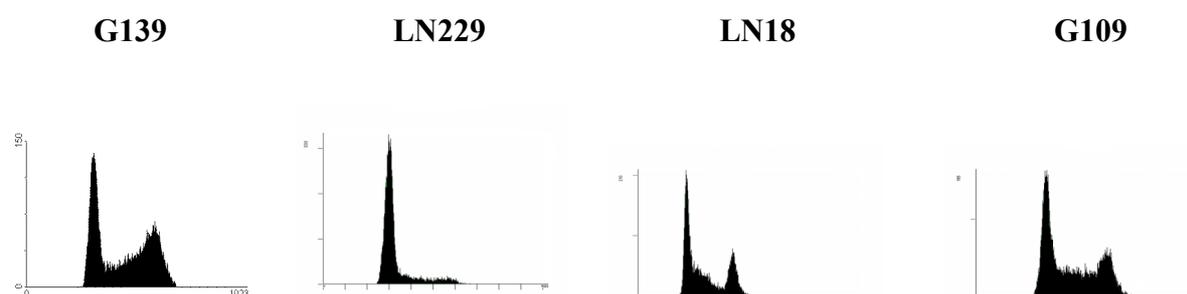


Abb. 14: FACS-Analyse der glialen Zelllinien nach Bestrahlung (6 Gy) und Rapamycin-Behandlung

Probennummer	G0/G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2/M-Phase [%]
G139, 6Gy + Rapamycin	35,00	35,40	29,60
LN229, 6Gy + Rapamycin	81,60	18,40	0,00
LN18, 6Gy + Rapamycin	44,40	36,00	19,60
G109, 6Gy + Rapamycin	38,30	47,40	14,60

Tab. 14: Prozentuale Darstellung der in der FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse

### 5.3.6 Bestrahlung und Behandlung mit LY 294002

Bei den G139- und LN18-Zellen kam es zu einer Reduktion der Gesamtzahl der Zellen in der G0/G1-Phase und S-Phase mit einer Erhöhung des G2/M-Anteils als Zeichen eines G2/M-Arrests. Bei der LN229-Zelllinie kam es zu einer deutlichen Zunahme des G0/G1-Anteils, während die anderen beiden Phasen an Anteil verloren. Es kam hier also zu einer G1-Arretierung nach Bestrahlung und zusätzlicher Behandlung mit LY 294002.

Die G109-Linie wurde durch die Behandlung mit LY 294002 so geschädigt, dass eine Auswertung mittels FACS-Analyse nicht möglich war.

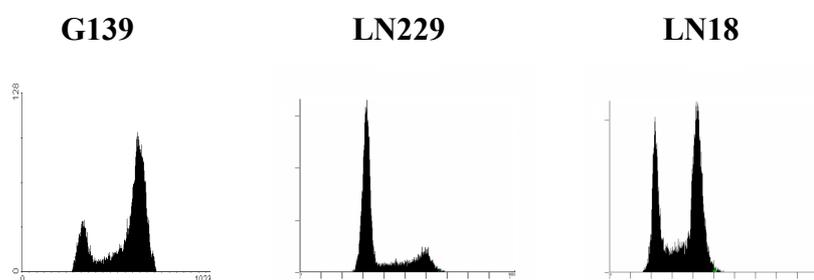


Abb. 15: FACS-Analyse der glialen Zelllinien nach Bestrahlung (6 Gy) und LY-Behandlung

Probennummer	G0/G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2/M-Phase [%]
G139, 6Gy + LY	13,10	20,90	66,00
LN229, 6Gy + LY	67,90	20,40	11,70
LN18, 6Gy + LY	25,80	25,60	48,60
G109, 6Gy + LY	nicht auswertbar		

Tab. 15: Prozentuale Darstellung der in der FACS-Analyse gewonnenen Ergebnisse

## **5.4 Bestrahlungseffekt auf Signalwege**

Der Bestrahlungseffekt auf die Signalwege wurde mittels Westernblot-Analyse an Proteinextrakten der oben genannten 4 humanen GBM-Zelllinien durchgeführt. Die Zelllinien wurden wie unter 4.2.2/4.2.3 beschrieben mit LY 294002 oder Rapamycin vorbehandelt und mit 6 Gy bestrahlt. Als Kontrollen wurden Proteinextrakte von nichtbestrahlten unbehandelten und nichtbestrahlten behandelten Zellen mitgeführt.

### **5.4.1 Phosphorylierung von Akt**

Zur Detektion des phosphorylierten Akt sowie des Gesamt-Akt wurden die unter 4.1.4 genannten Antikörper benutzt. Diese Antikörper reagieren mit Akt als eine 60 kDa Bande in der Westernblot-Analyse.

Für die verschiedenen Zelllinien zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse.

Bei der G139-Zelllinie zeigte sich, dass die Behandlung mit Rapamycin mit und ohne Bestrahlung sowie die Behandlung mit LY 294002 zu einer Abnahme der Intensität der immunreaktiven Bande führte. Bei Behandlung mit LY 294002 und Bestrahlung zeigte sich diese Abnahme noch deutlicher. Hingegen wiesen die Kontrolle und die nur bestrahlten Zellen eine starke Intensität auf.

Bei der LN229-Zelllinie zeigte sich, dass Bestrahlung sowie Bestrahlung und Rapamycin-Behandlung zu einer deutlichen Intensitätszunahme der immunreaktiven Bande führten.

Bei der Kontrolle und den weiteren Behandlungen konnte keine Intensität der Bande nachgewiesen werden.

Bei der LN18-Zelllinie führte Bestrahlung sowie Behandlung mit LY 294002 zu einer deutlichen Zunahme der Intensität. Die Kontrolle und alle anders behandelten Zellen wiesen eine geringe Intensität auf.

Bei der G109-Zelllinie zeigte sich unter Berücksichtigung der ungleichmäßigen Expression des Gesamtproteins eine Zunahme der Intensität der immunreaktiven Bande bei Bestrahlung.

Die Kontrolle sowie alle anders behandelten Zellen zeigten eine geringe Intensität.

Behandlung mit Rapamycin:

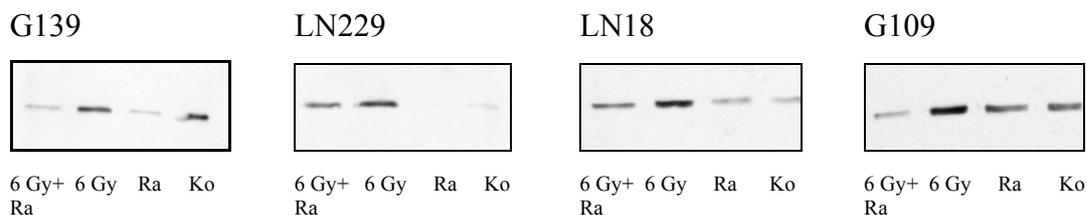


Abb. 16: Nachweis von phosphoryliertem Akt nach Stimulation mit Rapamycin und Bestrahlung.

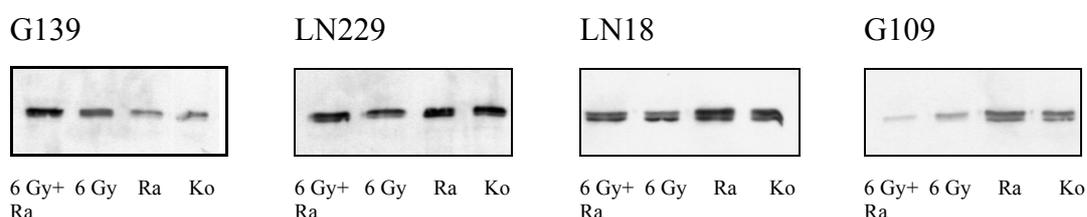


Abb. 17: Expressionskontrolle von unphosphoryliertem Akt (Gesamt-Akt) bei demselben Blot wie Abbildung oben. Hier zeigt sich, dass in den Spuren von Rapamycin-Behandlung mit Bestrahlung und Bestrahlung allein bei der Zelllinie G109 etwas weniger Akt exprimiert wird als in den restlich; ansonsten zeigt sich eine gleichmäßige Expression des Proteins.

Behandlung mit LY 294002:

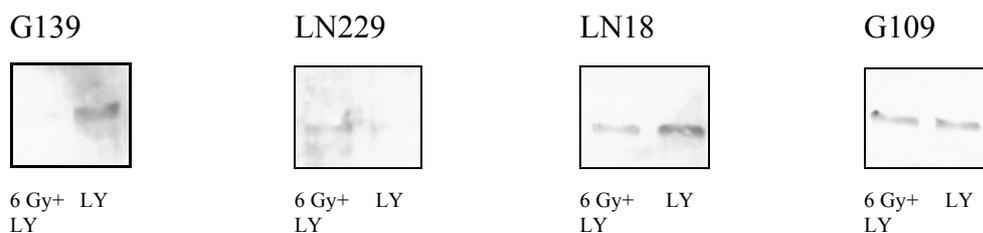


Abb. 18: Nachweis von phosphoryliertem Akt nach Stimulation mit LY 294002 und Bestrahlung.

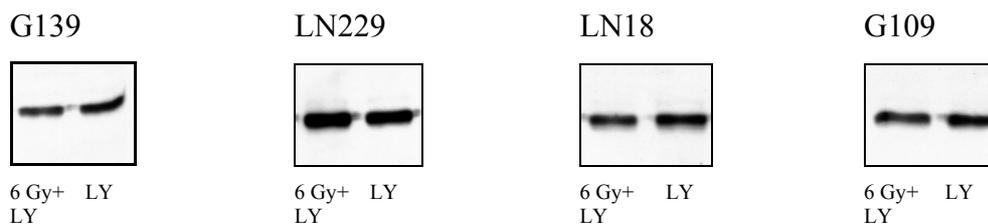


Abb. 19: Expressionskontrolle von unphosphoryliertem Akt (Gesamt-Akt) bei demselben Blot wie Abbildung oben. Hier zeigt sich eine gleichmäßige Expression des Proteins.

### 5.4.2 Phosphorylierung von p70 S6K

Zur Detektion der phosphorylierten p70 S6K sowie der Gesamt-p70 S6K wurden die unter 4.1.4 genannten Antikörper verwendet. Diese Antikörper reagieren mit p70 S6K als eine 70 kDa Bande. Die phosphorylierte p70 S6K reagiert zusätzlich als eine 85 kDa Bande im Westernblot.

Bei der G139-Zelllinie zeigte die Kontrolle sowie die mit Rapamycin und Bestrahlung behandelten Zellen eine schwache Intensität der immunreaktiven Bande. Bei Behandlung mit Rapamycin oder Bestrahlung konnte keine immunreaktive Bande nachgewiesen werden. Mit LY 294002 mit und ohne Bestrahlung behandelten Zellen zeigte sich eine starke Intensität.

Bei der LN229-Zelllinie konnte bei der Kontrolle und bei Rapamycinbehandlung mit und ohne Bestrahlung keine immunreaktive Bande nachgewiesen werden. Alle anders behandelten Zellen zeigten eine geringe Intensität.

Bei der LN18-Zelllinie zeigte die Kontrolle sowie die mit Rapamycin mit und ohne Bestrahlung vorbehandelten Zellen keine immunreaktive Bande. Hingegen bei Bestrahlung und Behandlung mit LY 294002 sowie bei Bestrahlung allein konnte eine starke Intensität nachgewiesen werden. Behandlung mit LY 294002 allein führte zu einer gering ausgeprägten immunreaktiven Bande.

Bei der G109-Zelllinie zeigte sich eine Zunahme der Intensität der immunreaktiven Bande durch Bestrahlung. Bei der Kontrolle sowie bei Behandlung mit LY mit und ohne Bestrahlung konnte eine schwache Intensität nachgewiesen werden. Behandlung mit Rapamycin mit und ohne Bestrahlung zeigten keinen Nachweis einer Intensität.

#### Behandlung mit Rapamycin:

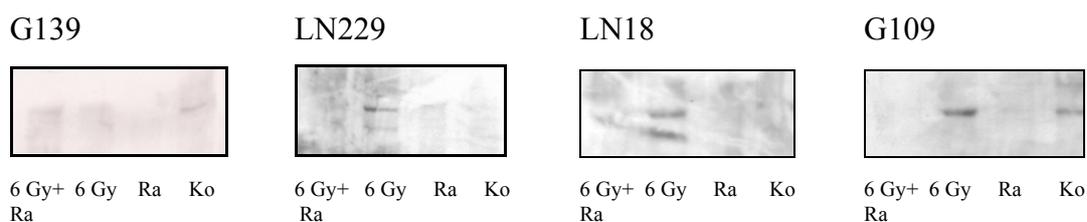


Abb. 20: Nachweis von phosphorylierter p70 S6K nach Stimulation mit Rapamycin und Bestrahlung.

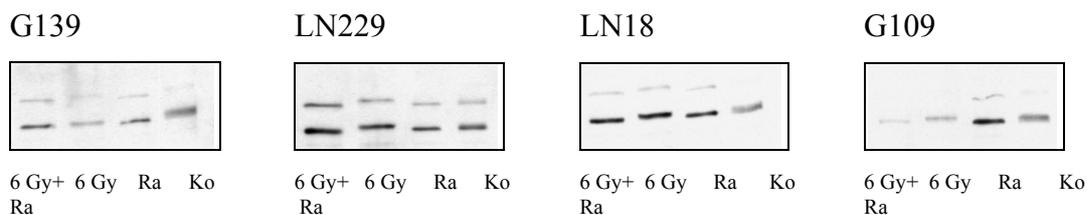


Abb. 21: Expressionskontrolle von unphosphorylierter p70 S6K (Gesamt-p70 S6K) bei demselben Blot wie Abbildung oben. Hier zeigt sich, dass in den Spuren von Rapamycin-Behandlung mit Bestrahlung und Bestrahlung allein bei der Zelllinie G109 etwas weniger Gesamt-p70 S6K exprimiert wird als in den restlichen; ansonsten zeigt sich eine gleichmäßige Expression des Proteins.

#### Behandlung mit LY 294002:

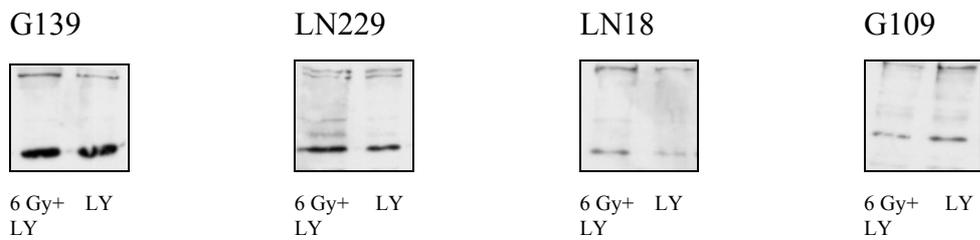


Abb. 22: Nachweis von phosphorylierter p70 S6K nach Stimulation mit LY 294002 und Bestrahlung.

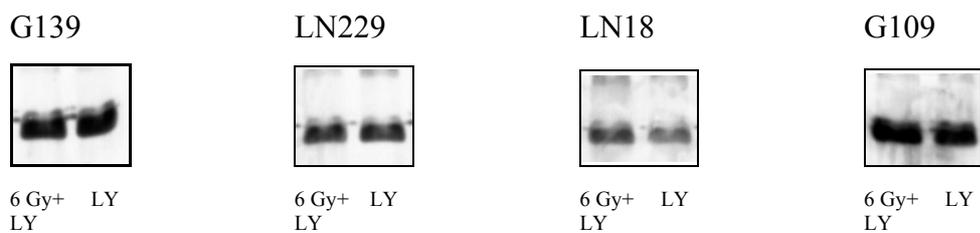


Abb. 23: Expressionskontrolle von unphosphorylierter p70 S6K (Gesamt-p70 S6K) bei demselben Blot wie Abbildung oben. Hier zeigt sich eine gleichmäßige Expression des Proteins.

### 5.4.3 Phosphorylierung von MAPK

Mit Hilfe des Phospho-p44/p42 MAPK Antikörpers und des p44/42 MAPK Antikörpers wurden die phosphorylierte und unphosphorylierte MAPK in Proteinextrakten der 4 humanen

GBM-Zelllinien nachgewiesen. Der Antikörper erkennt sowohl die 42 kDa als auch die 44 kDa Isoformen der MAPK, die dann als Doppelbande erscheinen.

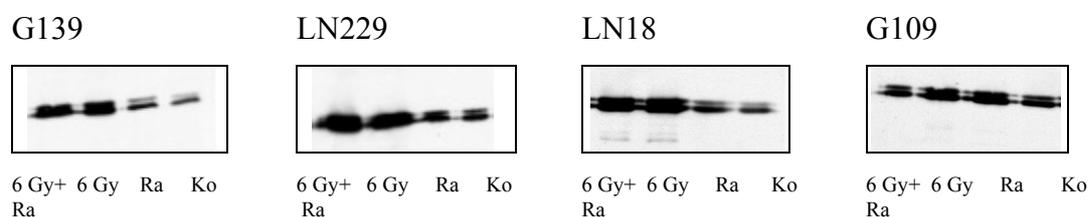
Bei der G139-Zelllinie zeigte sich eine starke Intensität bei allen Proteinextrakten außer bei Kontrolle und Rapamycin-Behandlung, die eine schwache Intensität aufwiesen. Die Expression der unphosphorylierten MAPK war jedoch auch bei diesen beiden Banden geringer ausgeprägt.

Bei der LN229-Zelllinie zeigte sich dasselbe Ergebnis wie bei der G139-Linie.

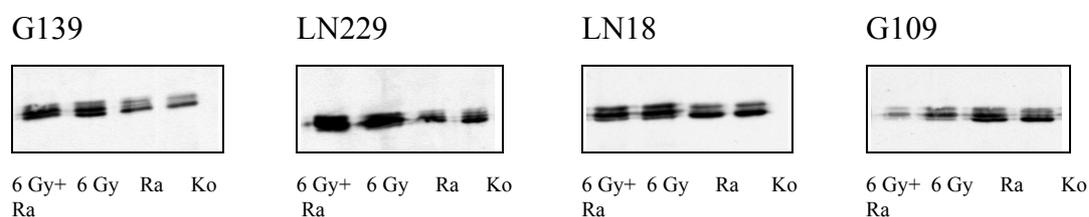
Bei der LN18-Zelllinie konnte bei der Kontrolle und Rapamycin-Behandlung eine geringe Intensität der immunreaktiven Bande nachgewiesen werden, alle anders behandelten Zellen wiesen eine starke Intensität auf, bei gleichmäßiger Expression des Gesamt-Proteins.

Bei der G109-Zelllinie zeigten alle Proteinextrakte eine starke Intensität der immunreaktiven Bande. Bei allen vier Zelllinien zeigt nach Behandlung mit LY 294002 alleine oder in Kombination mit Bestrahlung eine starke Intensität der Bande.

#### Behandlung mit Rapamycin:



*Abb. 24: Nachweis von phosphorylierter MAPK nach Stimulation mit Rapamycin und Bestrahlung.*



*Abb. 25: Expressionskontrolle von unphosphoryliertem MAPK. Hier zeigt sich, dass in der Spur von Rapamycin-Behandlung verbunden mit Bestrahlung bei der Zelllinie G109 etwas weniger MAPK exprimiert wird als in den restlichen, ansonsten zeigt sich eine gleichmäßige Expression des Proteins.*

Behandlung mit LY 294002:

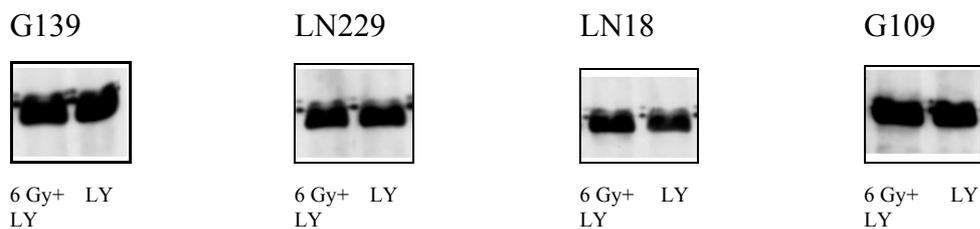


Abb. 26: Nachweis von phosphorylierter MAPK nach Stimulation mit LY 294002 und Bestrahlung.

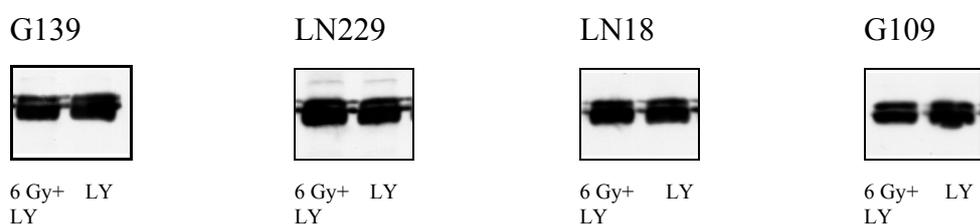


Abb. 27: Expressionskontrolle von unphosphoryliertem MAPK. Es zeigt sich eine gleichmäßige Kontrolle des Proteins.

#### 5.4.4 Phosphorylierung von SAPK/JNK

Zur Detektion der phosphorylierten SAPK/JNK sowie der Gesamt-SAPK/JNK wurden die unter 4.1.4 genannten Antikörper verwendet. Der Antikörper erkennt sowohl die 46 kDa als auch die 54 kDa Isoformen der SAPK/JNK, die dann als Doppelbande erscheinen.

Bei der G139-Zelllinie führte LY 294002-Behandlung zu einer ausgeprägten, zusätzliche Bestrahlung zu einer geringen Intensität der immunreaktiven Bande. Bei der Kontrolle und allen anders behandelten Zellen konnten keine Bande nachgewiesen werden.

Bei der LN229-Zelllinie führte Bestrahlung allein sowie zusätzliche Rapamycin- oder LY-Behandlung zu einer schwach ausgeprägten Intensität. Bei der Kontrolle und den anders behandelten Zellen zeigte sich keine immunreaktive Bande im Westernblot.

Bei der LN18-Zelllinie konnte keine immunreaktive Bande nachgewiesen werden, lediglich bei Bestrahlung zeigte sich eine geringe Intensität.

Bei der G109-Zelllinie führte Behandlung mit LY 294002 mit und ohne Bestrahlung zu einer starken Intensität, alle weiteren behandelten Zellen sowie die Kontrolle führten zu keiner nachweisbaren immunreaktiven Bande.

Behandlung mit Rapamycin:

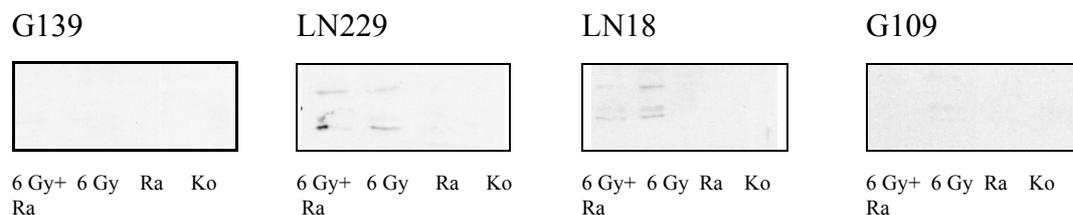


Abb. 28: Nachweis von phosphorylierter SAPK/JNK nach Stimulation mit Rapamycin und Bestrahlung.

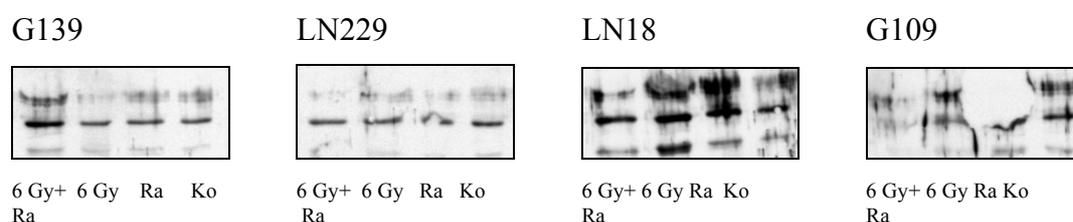


Abb. 29: Expressionskontrolle von unphosphoryliertem SAPK/JNK. Es zeigt sich eine gleichmäßige Expression des Proteins.

Behandlung mit LY 294002:

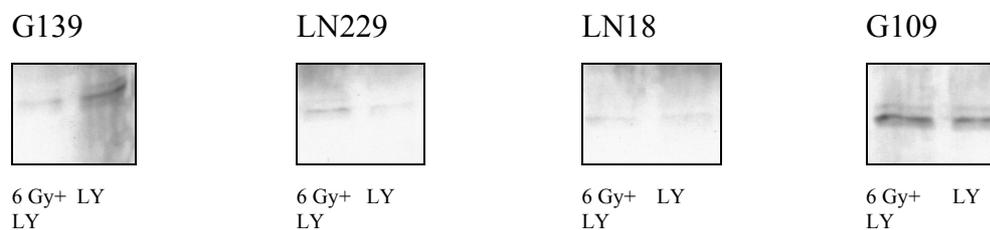


Abb. 30: Nachweis von phosphorylierter SAPK/JNK nach Stimulation mit LY 294002 und Bestrahlung.

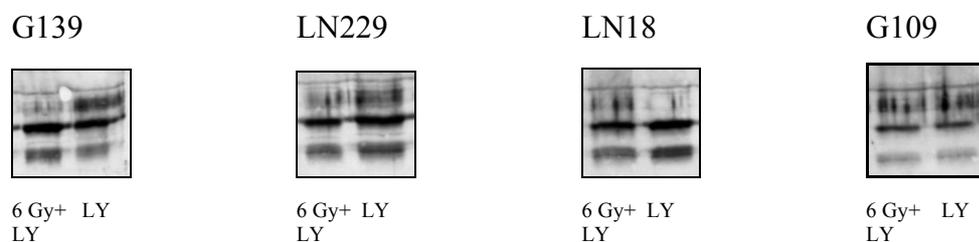


Abb. 31: Expressionskontrolle von unphosphoryliertem SAPK/JNK. Es zeigt sich eine gleichmäßige Expression des Proteins.

### 5.4.5 Nachweis von cleaved-PARP und PARP

Zur Detektion von cleaved-PARP sowie PARP wurden die unter 4.1.4 aufgeführten Antikörper verwendet. Diese Antikörper reagieren mit cleaved-PARP als eine 89 kDa Bande. PARP reagiert zusätzlich als eine 116 kDa Bande im Westernblot.

Bei der G139-Zelllinie zeigte die Kontrolle sowie alle behandelten Zellen (außer alleinige Behandlung mit LY 294002) eine schwache Intensität der immunreaktiven Bande cleaved-PARP. Behandlung mit LY 294002 führte zu einer Zunahme der Intensität.

Der Nachweis von PARP zeigte bei allen Proteinextrakten eine gleichmäßige schwache Expression der immunreaktiven Bande.

Bei der LN229-Zelllinie konnte bei der Kontrolle, bei den bestrahlten Zellen sowie bei Behandlung mit Rapamycin mit und ohne Bestrahlung eine schwache Bande cleaved-PARP nachgewiesen werden. Behandlung mit LY 294002 mit und ohne Bestrahlung führte zu einer Intensitätszunahme. Der Nachweis von PARP zeigte bei Kontrolle und Behandlung mit Rapamycin eine schwache Intensität der immunreaktiven Bande und ein starke bei allen anderen Proteinextrakten.

Bei der LN18-Zelllinie konnte bei der Kontrolle keine Bande cleaved-PARP nachgewiesen werden. Bestrahlung sowie Behandlung mit Rapamycin mit und ohne Bestrahlung führte zu einer mäßigen Zunahme der Intensität der immunreaktiven Bande. Behandlung mit LY 294002 mit und ohne Bestrahlung führte zu einer starken Expression der Bande.

Der Nachweis von PARP zeigte bei Kontrolle und Behandlung mit Rapamycin mit und ohne Bestrahlung eine schwache Expression des Proteins, Bestrahlung sowie Behandlung mit LY 294002 mit und ohne Bestrahlung eine starke Expression.

Bei der G109-Zelllinie zeigte sowohl der Nachweis von cleaved-PARP als auch von PARP bei allen Proteinextrakten eine schwache Expression der immunreaktiven Bande.

#### Behandlung mit Rapamycin:

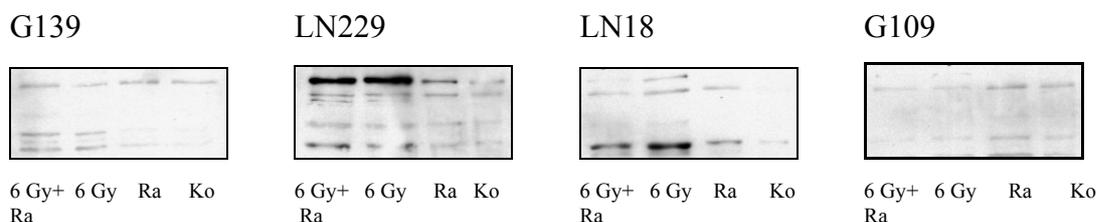
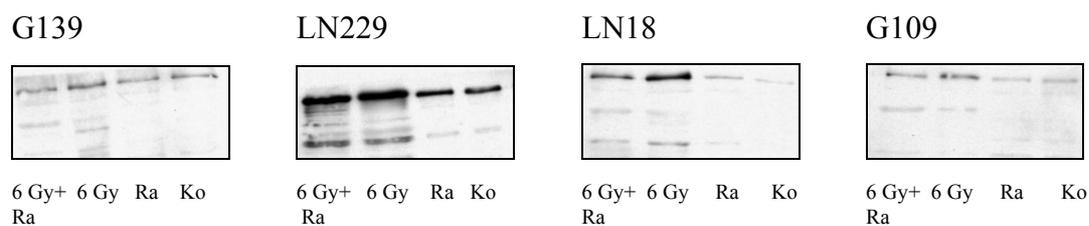
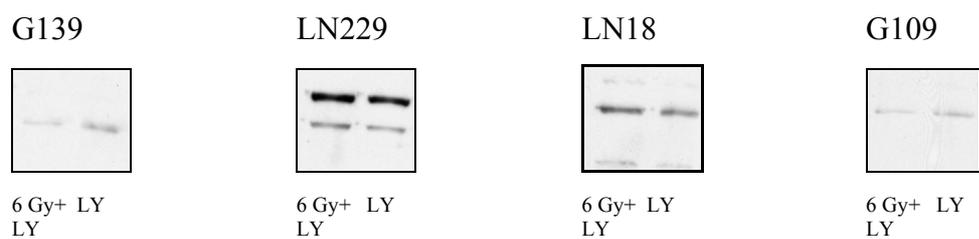


Abb. 32: Nachweis von cleaved-PARP nach Stimulation mit Rapamycin und Bestrahlung.

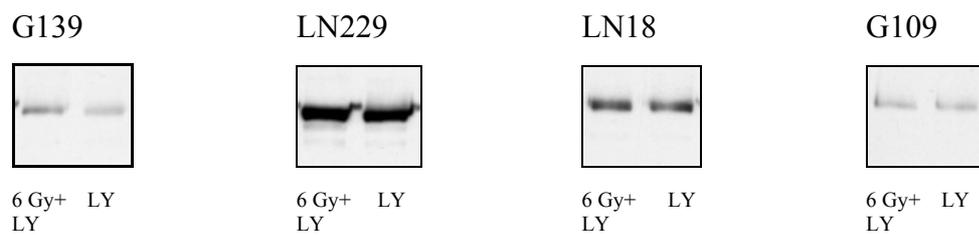


*Abb. 33: Expressionskontrolle von PARP.*

Behandlung mit LY 294002:



*Abb. 34: Nachweis von cleaved-PARP nach Stimulation mit LY 294002 und Bestrahlung.*



*Abb. 35: Expressionskontrolle von PARP.*

### 5.4.6 Zusammenfassende Darstellung

Zur übersichtlicheren Darstellung der in den Westernblot-Analysen gewonnenen Ergebnisse wurden alle Intensitäten der verschiedenen Antikörper nachfolgend in Tabellenform noch einmal gesondert für jede Zelllinie aufgeführt.

Die verschiedenen Intensitäten wurden in 3 Abstufungen dargestellt ( ++ : starke, + : schwache, - : keine Intensität):

<b>G139</b>	Kontrolle	Ra	LY	6 Gy	Ra + 6Gy	LY + 6Gy
Phospho-Akt	++	+	+	++	+	-
Akt	++	++	++	++	++	++
Phospho-p70 S6K	+	-	++	-	+	++
p70 S6K	++	++	++	++	++	++
Phospho-MAPK	+	+	++	++	++	++
MAPK	+	+	++	++	++	++
Phospho-SAPK/JNK	-	-	++	-	-	+
SAPK/JNK	++	++	++	++	++	++
Cleaved-PARP	+	+	++	+	+	+
PARP	+	+	+	+	+	+

<b>LN229</b>	Kontrolle	Ra	LY	6 Gy	Ra + 6Gy	LY + 6Gy
Phospho-Akt	-	-	-	++	++	-
Akt	++	++	++	++	++	++
Phospho-p70 S6K	-	-	+	+	-	+
p70 S6K	++	++	++	++	++	++
Phospho-MAPK	+	+	++	++	++	++
MAPK	+	+	++	++	++	++
Phospho-SAPK/JNK	-	-	-	+	+	+
SAPK/JNK	++	++	++	++	++	++
Cleaved-PARP	+	+	++	+	+	++
PARP	+	+	++	++	++	++

<b>LN18</b>	Kontrolle	Ra	LY	6 Gy	Ra + 6Gy	LY + 6Gy
Phospho-Akt	+	+	++	++	+	+
Akt	++	++	++	++	++	++
Phospho-p70 S6K	-	-	+	++	-	++
p70 S6K	++	++	++	++	++	++
Phospho-MAPK	+	+	++	++	++	++
MAPK	++	++	++	++	++	++
Phospho-SAPK/JNK	-	-	-	+	-	-
SAPK/JNK	++	++	++	++	++	++
Cleaved-PARP	-	+	++	+	+	++
PARP	+	+	++	++	+	++

<b>G109</b>	Kontrolle	Ra	LY	6 Gy	Ra + 6Gy	LY + 6Gy
Phospho-Akt	+	+	+	++	+	+
Akt	++	++	++	+	+	++
Phospho-p70 S6K	+	-	+	++	-	+
p70 S6K	++	++	++	+	+	++
Phospho-MAPK	++	++	++	++	++	++
MAPK	++	++	++	++	+	++
Phospho-SAPK/JNK	-	-	++	-	-	++
SAPK/JNK	++	++	++	++	++	++
Cleaved-PARP	+	+	+	+	+	+
PARP	+	+	+	+	+	+

Tab. 16: Zusammenfassende Darstellung der Westernblot-Ergebnisse

## 5.5 *Quantitative Zellschädigung*

Zur Bestimmung der quantitativen Zellschädigung wurde ein Zellproliferations-Assay nach Versteeg (Versteeg et al. 2000) durchgeführt (siehe 4.2.11). Die glialen Zelllinien wurden wie unter 4.2.2/4.2.3 beschrieben vorbehandelt und bestrahlt. Als Kontrolle wurden nichtbestrahlte unbehandelte und nichtbestrahlte behandelte Zellen mitgeführt.

### 5.5.1 *Zelllinie G139*

Hier zeigte sich eine Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen 24 h nach Bestrahlung um 13 %. Zusätzliche Behandlung mit LY 294002 bzw. Rapamycin führte zu einer Reduktion um jeweils 24 %.

Alleinige Behandlung mit den Inhibitoren führte jedoch auch zu einer Zellschädigung (18 % bei LY-Behandlung; 19 % bei Rapamycin-Behandlung).

<b>G139</b>	Ohne Bestrahlung		6 Gy	
	Absorption	Überlebende Zellen in %	Absorption	Überlebende Zellen in %
Kontrolle	0,241	100	0,210	87
LY 294002	0,198	82	0,183	76
Rapamycin	0,195	81	0,182	76

*Tab. 17: Zellschädigung nach Bestrahlung sowie Behandlung mit Inhibitoren bei der glialen Zelllinie G139*

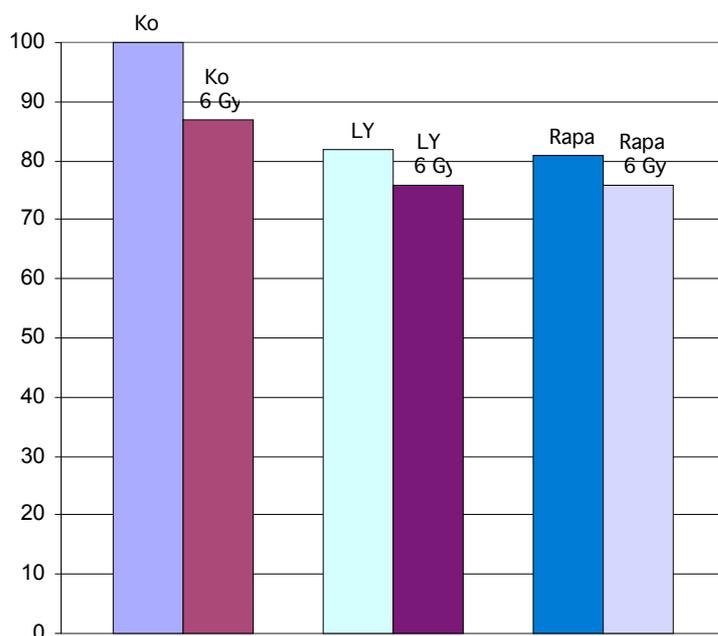


Abb. 36: Graphische Darstellung der im Zellproliferationsassay gewonnenen Ergebnisse (überlebende Zellen in Prozent)

### 5.5.2 Zelllinie LN229

Nach Bestrahlung konnte bei dieser Zelllinie eine Reduktion der Lebensfähigkeit um 6 % nachgewiesen werden. Zusätzliche Behandlung mit LY 294002 führte zu einer Verminderung um 14 %, bei Behandlung mit Rapamycin um 22 %. Alleinige Behandlung mit den Inhibitoren führte auch bei diesen Zellen zu einer Zellschädigung um 11 %.

LN229	Ohne Bestrahlung		6 Gy	
	Absorption	Überlebende Zellen in %	Absorption	Überlebende Zellen in %
Kontrolle	0,253	100	0,238	94
LY 294002	0,226	89	0,217	86
Rapamycin	0,225	89	0,198	78

Tab. 18: Zellschädigung nach Bestrahlung sowie Behandlung mit Inhibitoren bei der glialen Zelllinie LN229

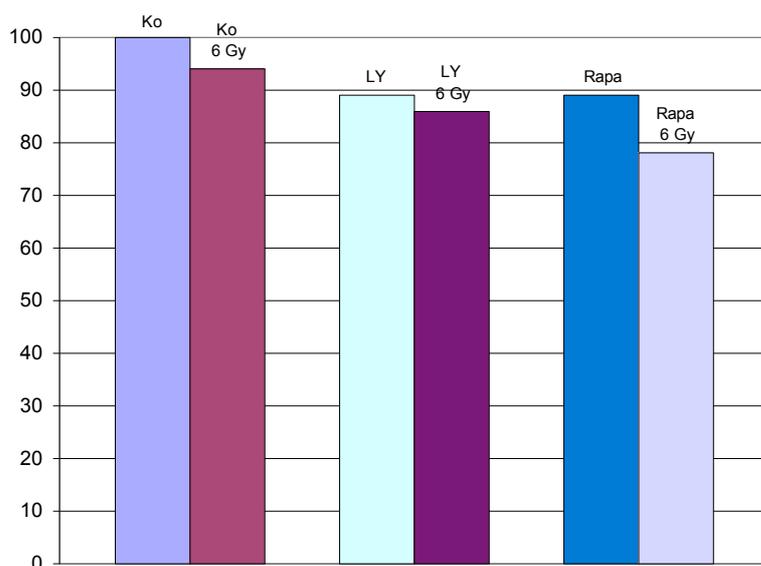


Abb. 37: Graphische Darstellung der im Zellproliferationsassay gewonnenen Ergebnisse

### 5.5.3 Zelllinie LN18

Bestrahlung führte bei LN18-Zellen zu einer Reduktion der Zellebensfähigkeit um 11 %. Gleichzeitige Behandlung mit LY 294002 oder Rapamycin führte zu einer Reduktion um 34 % bzw. 20 %.

Wurden die Zellen nur mit den Inhibitoren behandelt, zeigte sich ebenfalls eine Zellschädigung (23 % bei LY-Behandlung; 15 % nach Behandlung mit Rapamycin).

LN18	Ohne Bestrahlung		6 Gy	
	Absorption	Überlebende Zellen in %	Absorption	Überlebende Zellen in %
Kontrolle	0,228	100	0,203	89
LY 294002	0,175	77	0,151	66
Rapamycin	0,194	85	0,182	80

Tab. 19: Zellschädigung nach Bestrahlung sowie Behandlung mit Inhibitoren bei der glialen Zelllinie LN18

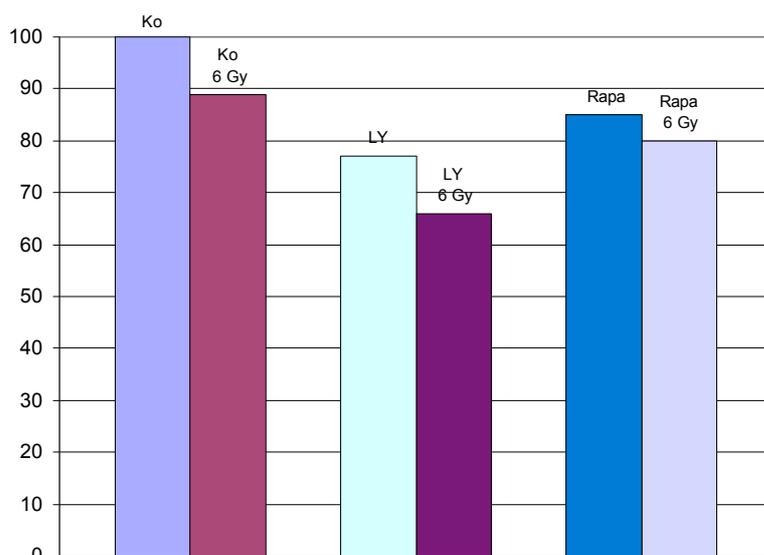


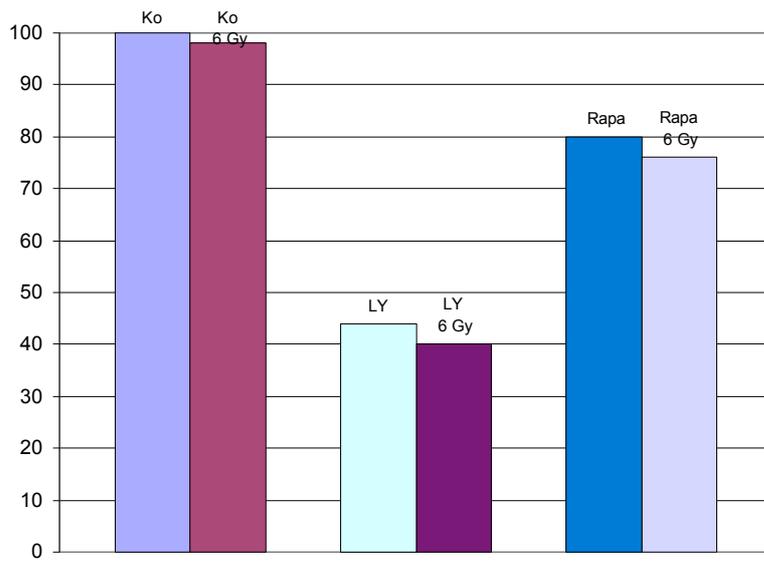
Abb. 38: Graphische Darstellung der im Zellproliferationsassay gewonnenen Ergebnisse

#### 5.5.4 Zelllinie G109

Hier zeigte sich eine Reduktion der Lebensfähigkeit der G109-Zellen 24 h nach Bestrahlung um 2 %. Zusätzliche Behandlung mit LY 294002 führte zu einer starken Verminderung der Lebensfähigkeit um 60 %. Alleinige LY-Behandlung zeigte eine Reduktion um 56 %. Dieser Effekt zeigte sich auch bei Rapamycin-Behandlung (20 %) und zusätzlicher Bestrahlung (24 %).

G109	Ohne Bestrahlung		6 Gy	
	Absorption	Überlebende Zellen in %	Absorption	Überlebende Zellen in %
Kontrolle	0,236	100	0,231	98
LY 294002	0,104	44	0,095	40
Rapamycin	0,189	80	0,178	76

Tab. 20: Zellschädigung nach Bestrahlung sowie Behandlung mit Inhibitoren bei der glialen Zelllinie G109



*Abb. 39: Graphische Darstellung der im Zellproliferationsassay gewonnenen Ergebnisse*

## 6. DISKUSSION

GBM (Glioblastome) sind die häufigsten und bösartigsten Tumoren unter den glialen Tumoren. Die Prognose ist nach wie vor schlecht. Die Überlebensdauer der Patienten erreicht nach Diagnosestellung kaum mehr als 12 Monate. Das GBM wächst infiltrierend in das benachbarte Hirngewebe ein, so dass eine kurative chirurgische Resektion meist nicht möglich ist. Folglich sind adjuvante Regime wie Bestrahlung und Chemotherapie wichtige therapeutische Optionen. Viele klinische Studien konnten zeigen, dass Radiotherapie bei den meisten Patienten mit GBM zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führt. Sie kann die Überlebenszeit jedoch nur auf 14 Monate verlängern (Grossman und Batarra 2004).

Eine neue Therapiemöglichkeit, die Überlebensdauer der Patienten mit GBM zu verlängern, wäre nun eine Kombination mit Chemotherapeutika, die die Effektivität der Bestrahlung verbessern, indem sie entweder die Tumorzellen radiosensitiver machen und/oder in entscheidende zelluläre Signalwege eingreifen.

Man konnte beobachten, dass verschiedene zelluläre Kontrollmechanismen Ziel genetischer Alterationen während der Entstehung des malignen Phänotyps der GBM-Zellen sind (Ohgaki und Kleihues 2005). Unter anderem zählen Veränderungen im p53-System sowie die Amplifikation des *EGFR*-Gens und die Deletion des *PTEN*-Gens, die erhebliche funktionelle Auswirkungen auf die zelluläre Signaltransduktion nach sich ziehen, hinzu. Das p53-System spielt eine wichtige Rolle bei der genomischen Integrität von Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass p53 eine zentrale Stelle in der Zellantwort auf ionisierende Strahlung einnimmt. Der EGF-Rezeptor ist als transmembrane Rezeptortyrosinkinase an der Wachstumsfaktor-vermittelten Aktivierung intrazellulärer Signalwege beteiligt (Kao et al. 2001, Buolamwini 2000). Ein wichtiger Signalweg, der durch die EGF-Überexpression aktiviert wird, ist der PI3K-Signalweg. PTEN kann die PI3K in der D3-Position dephosphorylieren und ist damit der direkte Gegenspieler der PI3K (Vazquez und Sellers 2000). Folglich führt eine *PTEN*-Deletion zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalweges. Diese Daten deuten auf eine Rolle des PI3K/Akt-Signalweges für die Überwindung des Zelltodes auch in Tumorzellen hin.

Natürlich werden auch andere Signalwege als Reaktion auf die Aktivierung des PI3K-Weges aktiviert. Jedoch hat gerade Akt aufgrund seiner Schlüsselrolle im Bereich des zellulären

Überlebens, der Apoptose und eventuell auch bei der Antwort auf Bestrahlung unsere Aufmerksamkeit auf sich gezogen.

Es konnten mittlerweile viele Zielmoleküle von Akt identifiziert werden, wie z.B. BAD und Caspase 3. Weiterhin ist Akt als Regulator an der Initiierung der Proteintranslation beteiligt, und es konnte gezeigt werden, dass die ribosomale S6Kinase in einem Akt-abhängigem Schritt phosphoryliert wird. Dieser Signalweg wird durch mTOR kontrolliert, welches wiederum ein indirekter Angriffspunkt der Akt ist. Der Inhibitor Rapamycin bindet spezifisch an mTOR und blockiert somit die Proteintranslation und die Zellproliferation. Einige Forschergruppen konnten zeigen, dass Tumoren mit *PTEN*-Mutationen besonders vulnerabel gegenüber der Behandlung mit Rapamycin sind (Garber 2001). *PTEN*-Mutationen sind bei malignen Gliomen relativ häufig nachweisbar, so dass eine Kombination der Behandlung mit Rapamycin und Bestrahlung eine neue Therapiemöglichkeit bei malignen Gliomen sein könnte.

Diese Art der Tumorthherapie, bei der die Chemotherapie zielgerichtet an einzelnen Molekülen ansetzt, wird als sog. „*targeted therapy*“ bezeichnet. Sie ist den letzten Jahren immer mehr in das Blickfeld der Tumorforschung gerückt.

Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, den Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Effektivität einer kombinierten Behandlung (Inhibitorenbehandlung (LY 294002 bzw. Rapamycin) und Bestrahlung) bei unterschiedlichen humanen GBM-Zelllinien zu untersuchen.

## **6.1    *Untersuchte Signalwege***

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass die dort aufgeführten Signalwege nur einen kleinen Ausschnitt der gesamten Signaltransduktion widerspiegeln (siehe 2.3). In dieser Arbeit wurde versucht, durch Blockade anti-apoptotischer Signalwege die Radiotherapie bei malignen Gliomen zu optimieren; daher wurden speziell anti-apoptotische Signalkaskaden, die bereits in der Literatur bekannt waren, miteinbezogen.

Bereits 1993 konnten von Deimling et al. zeigen, dass verschiedene genetische Veränderungen gehäuft in glialen Tumoren auftreten, z.B. *EGFR*-Amplifikation, *p53*-

Mutationen, Mutationen im *PTEN*-Gen (1993). Weiterhin konnten Kleihues und Ohgaki (Kleihues und Ohgaki 1999, 2005) zeigen, dass eine Assoziation zwischen den klinischen Varianten und den genetischen Veränderungen, die in den Tumoren auftreten, besteht.

Es lag daher nahe, humane Gliomzellen zu untersuchen, die o.g. Mutationen aufweisen, und deren Verhalten gegenüber Bestrahlung bzw. Behandlung mit Inhibitoren mit humanen Gliomzellen zu vergleichen, die diese genetischen Veränderungen gerade nicht zeigen.

Die vier verwendeten Zelllinien stellen ein gut etabliertes Modell für GBM-Zellen in der Zellkultur dar. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Schlegel et al. 2000; Kraus et al. 2000) wurden die Zelllinien bereits hinsichtlich ihres p53-, PTEN- und Akt-Status charakterisiert (vgl. Tab. 5). Ausgewählt wurden gerade diese vier Linien, da sie sich im Bezug auf ihren p53- und PTEN-Status alle voneinander unterscheiden:

	LN18	LN229	G109	G139
p53	mutiert	wt	mutiert	wt
PTEN	wt	wt	mutiert	mutiert

Tab. 21: Charakterisierung der verwendeten humanen GBM-Zelllinien

Der PI3K-Signalweg gehört mittlerweile zu den am besten untersuchten anti-apoptotischen Signalwegen, so dass es naheliegend war, gerade eine Blockade dieses Signalweges zu betrachten. Er spielt in der Regulation von Transkription, Translation, Proliferation, Zellwachstum und –überleben eine wichtige Rolle. Die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren resultieren meist aus einer Imbalance zwischen Zellproliferation und Apoptose. Der PI3K-Signalweg ist nun mit beiden dieser Ereignisse verknüpft und in einer Vielzahl von Tumoren dysreguliert (Khawaja 1999).

Akt als Hauptsubstrat der PI3K vermittelt nach Aktivierung eine Vielzahl von anti-apoptotischen Signalwegen, u.a. die Inhibierung der Apoptose-induzierenden Caspasen.

Weiterhin konnten verschiedene Arbeitsgruppen einen engen Zusammenhang zwischen Akt und FRAP/mTOR bzw. der p70 S6K aufzeigen (Brunn et al. 1996; Neshat et al. 2001). Die PDK1 kann die p70 S6K direkt oder indirekt über mTOR durch Aktivierung von Akt

---

aktivieren. Rapamycin, ein Makrolid-Antibiotikum mit potenten antimikrobiellen, immunsuppressiven und zytostatischen Eigenschaften, stellt einen spezifischen Inhibitor von mTOR dar. Seine antitumorösen Eigenschaften wurden bereits in der Mitte der siebziger Jahre entdeckt. Die p70 S6K kontrolliert durch ihre Aktivität Translationsvorgänge und den Zellzyklus. Die Inhibierung von mTOR blockiert die Signale zu zwei separaten nachfolgenden Signalwegen, die die Translation einer mRNA kontrollieren, die verantwortlich für den Übergang aus der G1- in die S-Phase im Zellzyklus ist (Hidalgo und Rowinsky 2000).

Auch die Zellzyklus-Regulation in der G1-Phase stellt ein vielversprechendes Target in der Behandlung von Tumoren dar. Es konnte gezeigt werden, dass Gene, die mit der G1-Regulation assoziiert sind, eine Schlüsselrolle im Rahmen der Proliferation, Differenzierung und onkogenetischen Transformation sowie im Bereich der Apoptose darstellen (Owa et al. 2001). Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit die Kombination aus Bestrahlung und der Behandlung mit Inhibitoren auf den Zellzyklus bei unterschiedlichen Zelllinien (siehe oben).

## **6.2 *Eingesetzte Methoden***

Durch Behandlung mit Inhibitoren (Rapamycin und LY 294002) wurden gezielt bestimmte Schlüsselenzyme in den untersuchten Signalkaskaden blockiert und deren Auswirkungen untersucht. Die eingesetzten Inhibitoren zählen zu Standardsubstanzen im Bereich der Signaltransduktion. Sie zeichnen sich in den hier verwendeten Konzentrationen durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. Der PI3K-Inhibitor LY 294002 inhibiert sowohl die Phosphorylierung von PI3K als auch teilweise der p70 S6K, jedoch nicht von p38 oder MAPK (Gupta et al. 2001). Rapamycin bindet an mTOR und verhindert auf diese Weise die Phosphorylierung der p70 S6K durch mTOR (Dumont und Su 1996).

Der Inhibitor LY 294002 blockiert in der Signalkaskade weiter oben und wurde u.a. deshalb ausgewählt. Rapamycin blockiert die Signalkaskade einige Schritte unterhalb der PI3K, es wirkt nicht direkt auf Akt (siehe auch Abb. 3).

Die eingesetzten Konzentrationen von LY 294002 (20  $\mu$ M) und Rapamycin (100 nM) sowie die Behandlungsdauer der Zellkulturen über 24 h wurden aufgrund der signifikanten Effekte in Etablierungsversuchen ausgewählt, die auch in der Literatur beschrieben werden (Semba et al. 2002; Hu et al. 2000; Zhang et al. 2001).

Als Dosis für die in dieser Arbeit durchgeführten Bestrahlungsversuche wurde 6 Gy ausgewählt. In zuvor durchgeführten Bestrahlungsreihen (2, 4, 6, 8, 10 Gy) zeigte sich bei allen vier Zelllinien im Bereich von 4-8 Gy ein im „Colony Assay“ sichtbarer Effekt auf das Koloniebildungsverhalten (vgl. Abb. 8 und 9). Die Dosis von 6 Gy wurde gewählt, da man bei dieser Dosis zwar eine Verminderung der Koloniegröße und -zahl feststellt, jedoch weiterhin ein Koloniewachstum sichtbar ist, so dass man den Effekt einer zusätzlichen Inhibitorenbehandlung, falls vorhanden, beobachten kann.

Im klinischen Alltag werden jedoch weitaus niedrigere Dosen verwendet (z.B. 1,8 Gy/d), diese aber an aufeinander folgenden Tagen über einen Zeitraum von mehreren Wochen. Aufgrund zeitlicher und technischer Umstände ließ sich dies bei den Experimenten dieser Arbeit nicht durchführen.

Zur Untersuchung des biologischen Effekts der Behandlung bzw. Bestrahlung wurden sowohl der Proliferationsassay (Versteeg et al. 2000) sowie der „Colony Formation Assay“ durchgeführt. Durch Kombination der beiden Untersuchungsmethoden kann man den biologischen Effekt der Behandlung zu zwei verschiedenen Zeitpunkten beobachten. Der Proliferationsassay wurde 24 h nach Behandlung durchgeführt und vermittelt einen Eindruck über die akute quantitative Zellschädigung. Die Auswertung des „Colony Assays“ hingegen erfolgte erst 10 d nach Behandlung und dient somit der Beobachtung des langfristigen Effekts einer Behandlung bzw. Bestrahlung. Beide Möglichkeiten sind gut etablierte Methoden und werden bei Untersuchungen der Zellschädigung standardmäßig eingesetzt.

Parallel wurden mittels Westernblot o.g. Signalwege auf ihre Aktivierung untersucht. Die Westernblot-Analysen stellen ein gutes Monitoring für den Nachweis einer Aktivierung verschiedener Kinasen dar. Zusätzlich untersuchten wir mittels FACS-Analyse die Auswirkungen der Bestrahlung und/oder Inhibitorenbehandlung auf den Zellzyklus. Die FACS-Analysen wurden an 24 h nach Behandlung fixierten Zellen durchgeführt. In bereits vorher durchgeführten Etablierungsversuchen der Arbeitsgruppe Schlegel (Kraus et al. 2000) sowie in der Literatur (z.B. Gupta et al. 1996) zeigte sich dieser zeitliche Abstand als signifikant.

### 6.3 *Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Einzelnen*

Humane Gliomzellen sind hoch resistent gegenüber experimenteller Radiotherapie. Dies zeigte sich auch in den zunächst durchgeführten Bestrahlungsreihen und anschließenden „Colony Assays“. Selbst bei einer Strahlendosis von 10 Gy war nach 10 d bei allen vier Zelllinien ein Koloniewachstum nachweisbar.

In den durchgeführten „Colony Assays“, mit denen man sowohl das zelluläre Überleben als auch die Proliferation der überlebenden Fraktion gut beurteilen kann, zeigte sich, dass sich die Zelllinien LN18 und G139 sehr resistent gegenüber Bestrahlung verhalten, wohingegen die beiden Zelllinien LN229 und G109 eine signifikante Reduktion der großen Kolonipopulation aufweisen. Dies lässt sich nur teilweise aus den Ergebnissen in Punkt 5.2 erkennen, da bei der Auswertung nur Kolonien einer bestimmten Größe berücksichtigt werden konnten. Jedoch bei visuell semiquantitativer Auswertung waren o.g. Ergebnisse signifikant.

Die Behandlung mit Rapamycin allein war am effektivsten in den Zelllinien G109 und G139, die einen funktionellen Verlust von PTEN aufweisen (siehe Tab. 6 und 9). LN229 und LN18 hingegen zeigen auch eine Reduktion der großen Kolonien, jedoch insgesamt in geringerem Ausmaß (vgl. Tab. 7 und 8). Vergleicht man letztere beiden Zelllinien untereinander, so fällt eine stärkere Reduktion bei den LN18-Zellen auf.

Die Kombination experimenteller Bestrahlung und Behandlung mit Rapamycin zeigte in allen Zelllinien eine deutliche Reduktion der Koloniebildung, jedoch am ausgeprägtesten in der Zelllinie G139, die bei intaktem p53-Status eine PTEN-Mutation aufweist.

Auch bei Betrachtung der kurzfristigen Effekte im Proliferationsassay konnten diese Ergebnisse teilweise nachgewiesen werden. Hier zeigte sich, dass die Zelllinien LN229 und G109 kurzfristig resistenter gegenüber alleiniger Bestrahlung reagieren (siehe Abb. 37 und 39). Bei Behandlung mit Rapamycin alleine sowie mit der Kombination Rapamycin und Bestrahlung decken sich die Daten mit dem langfristigen Ergebnissen der „Colony Assays“: am effektivsten in den Zelllinien G109 und G139 (vgl. Abb. 36-39).

Betrachtet man die Ergebnisse nach Behandlung mit dem Inhibitor LY 294002 alleine sowie in Kombination mit Bestrahlung, so zeigt sich, dass diese Behandlung sowohl im kurzfristigen Proliferationsassay als auch im langfristigen „Colony Assay“ in allen Zelllinien effektiver als die Behandlung mit Rapamycin ist (vgl. 5.2 und 5.5), außer in der LN229-Zelllinie.

Bei allen Zelllinien war die alleinige Behandlung mit LY 294002 effektiver als Rapamycin, außer in der Zelllinie G139 (vgl. Tab. 6 und Abb. 36).

Es wurden weiterhin Westernblot-Analysen durchgeführt, die ein gutes Monitoring des Aktivitätslevels der verschiedenen Kinasen darstellen.

In allen vier Zelllinien lässt sich nach Bestrahlung eine Aktivierung von Akt nachweisen (vgl. Abb. 16). Diese Aktivierung lässt sich durch Behandlung mit LY 294002 reduzieren bzw. gänzlich blockieren (siehe Abb. 18).

In den Zelllinien G109, LN18 und LN229 lässt sich bei Bestrahlung eine Aktivierung der p70 S6K nachweisen, die durch eine zusätzliche Behandlung mit Rapamycin blockiert werden kann. Im Gegensatz dazu zeigte die Zelllinie G139, die bei intakten p53-Status kein funktionierendes PTEN besitzt, keine Aktivierung der p70 S6K nach Bestrahlung (vgl. Abb. 20).

Bei der Untersuchung der MAPK-Gruppe im Westernblot ließen sich keine signifikanten Ergebnisse erzielen. Lediglich in den Zelllinien LN18 und LN299 konnte nach Bestrahlung eine Aktivierung der JNK/SAPK nachgewiesen werden (vgl. Abb. 28).

Wir untersuchten den Effekt experimenteller Bestrahlung und Behandlung mit Rapamycin bzw. LY 294002, alleine oder in Kombination, auf die Zellzyklus-Kontrolle in humanen Gliomzelllinien. Bestrahlung und Rapamycin zeigten unterschiedliche Effekte auf den Zellzyklus. Alleinige Behandlung mit Rapamycin führt in den Zelllinien G139 und LN229 zu einem G1-Arrest, wohingegen die Zelllinien LN18 und G109 eine Zunahme der Zellen in der S-Phase zeigen (siehe Tab. 11 und Abb. 11).

Alleinige Bestrahlung mit 6 Gy führte zu einem G2/M-Arrest (siehe Tab. 13 und Abb. 13). Wie in Abbildung 14 zu sehen, führte die Kombination beider Behandlungen auch zu einer Arretierung in G1. Jedoch zeigte sich auch in den Zelllinien LN18 und G109 ein signifikanter Anstieg der Zellen in der frühen S-Phase.

Die Behandlung mit LY 294002 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Fortschreiten des Zellzyklus (vgl. Abb. 12 und 15).

#### **6.4 Signalwegstatus in Abhängigkeit von der Bestrahlung**

In den zunächst durchgeführten „Colony Formation Assays“ konnten wir zeigen, dass sich die verwendeten humanen GBM-Zelllinien hoch resistent gegenüber experimenteller Radiotherapie verhalten. Dieses Ergebnis deckt sich sehr gut mit den klinischen Erfahrungen in der Behandlung von Patienten mit GBM, bei denen die Strahlentherapie die mittlere Überlebenszeit meist nur auf 14 Monate verlängern kann (Grossman und Batarra 2004). Jedoch scheint das schlechte klinische Ansprechen des GBM auf therapeutische Behandlungen nicht nur durch die Resistenz gegenüber Strahlentherapie erklärbar zu sein. So konnte Taghian et al. 1992 in der Untersuchung von 21 GBM-Zelllinien (1992) zeigen, dass es auch Zelllinien gibt, die radiosensitiv sind.

Die Zelllinien LN18, LN229 und G109, von denen zwei Linien einen mutierten p53-Status aufweisen, zeigten sich besonders resistent gegenüber experimenteller Bestrahlung. Alleinige Behandlung mit Rapamycin hingegen war am effektivsten in den Zelllinien, die kein intaktes PTEN besitzen (G109 und G139). Die Kombination von Bestrahlung und Rapamycinbehandlung zeigte in allen vier Zelllinien eine deutliche Reduktion der Koloniebildung, jedoch am ausgeprägtesten in der Zelllinie G139 (p53 wt, PTEN mutiert). Auch die Gruppe von deGraffenried konnte zeigen, dass Tumoren, die aufgrund ihrer konstitutiven Akt-Aktivierung besonders resistent gegenüber Behandlung sind, nach Rapamycinbehandlung deutlich besser auf eine chemotherapeutische Behandlung reagieren (2004). Feng et al. konnte kürzlich zeigen, daß die Aktivierung von p53 mTOR inhibiert und auch weitere nachfolgende Signalwege beeinträchtigt. Weiterhin führt die Aktivierung von p53 zu einer ansteigenden Expression von PTEN, und hohe Level von PTEN wiederum blockieren die Aktivität von mTOR (2005).

Dieser Regelmechanismus scheint jedoch durch weitere genetische Veränderungen der Zelllinie G139 nicht anzuspriegen.

Die Behandlung mit dem Inhibitor LY 294002 war effektiver als mit Rapamycin. Am ehesten lässt sich dies darauf zurückführen, dass mit LY 294002 in der Signalkaskade eine Blockade weiter oben (Blockade der PI3K) durchgeführt wird als mit Rapamycin (Blockade der p70 S6K), so dass wohl auch die nachfolgenden Signalwege bei Blockade der PI3K gehemmt werden. Bei allen Zelllinien war die alleinige Behandlung mit LY 294002 effektiver als Rapamycin, außer in der Zelllinie G139.

---

Dies lässt sich anhand unserer Überlegungen nicht ganz nachvollziehen, da diese Zelllinie aufgrund ihres PTEN-Status stärker auf die Blockade der PI3K reagieren müsste. Eventuell gibt es jedoch noch weitere genetische Veränderungen der Zelllinie G139, die wir nicht in unsere Untersuchungen miteinbezogen haben. Möglicherweise spielt auch eine weitere Serin-/Threoninkinase eine entscheidende Rolle, die sog. DNA-PK (DNA-Proteinkinase). Sie wird u.a. durch Doppelstrangbrüche der DNA aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass die durch DNA-Schäden induzierte Apoptose in Zellen, denen eine intakte DNA-PK fehlt, nicht auftritt. Außerdem scheint die Phosphorylierung von p53 an Ser15 eine entscheidende Rolle in der DNA-PK abhängigen Apoptose zu spielen. Der Inhibitor LY 294002 scheint nun nicht nur die PI3K zu inhibieren, sondern er kann in hohen Konzentrationen auch einen Einfluss auf andere Proteinkinasen nehmen, u.a. auf die DNA-PK (Izzard et al. 1999, Dhanalakshmi et al. 2004), so dass die Ergebnisse nach Behandlung mit LY 294002 wahrscheinlich nicht nur auf seine Blockade der PI3K zurückzuführen sind.

Wie oben bereits erwähnt, konnten wir zeigen, dass die Behandlung mit Rapamycin (sowohl alleine als auch mit Bestrahlung) effektiver in den Zelllinien war, die kein intaktes PTEN aufweisen (G109, G139). Weiterhin konnte in den Westernblotanalysen eine Aktivierung der p70 S6K in diesen Zelllinien nachgewiesen werden, die durch Rapamycinbehandlung inhibiert werden kann (vgl. Abb. 20, Tab. 16). Dies konnte unterdessen von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden (z.B. Neshat et al. 2001, Chan 2004).

Ein weiterer Signalweg, der in enger Verbindung zu der PI3K steht, sind die MAPK-Kaskaden. Sie stellen eine große Familie aus Serin/Threoninkinasen dar. Es konnten bisher drei große Subfamilien beschrieben werden: MAPK, SAPK/JNK und p38. Die letzteren beiden werden in den meisten Zellen als Reaktion auf zellulären Stress aktiviert, z.B. durch Bestrahlung oder Behandlung mit genotoxischen Substanzen. Sie sind besonders wichtig für die Übertragung von Signalen der Zellmembran zu Transkriptionsfaktoren, die die Transkription aktivieren können.

Diese beiden stress-abhängigen Kinasewege sind strukturell dem MAPK-Signalweg sehr ähnlich, jedoch funktionell verschieden. Die MAPK werden jedoch durch Wachstumsfaktoren und weitere Stimuli, die in Zellproliferation und Differenzierungsprozesse involviert sind, aktiviert (Alonso et al. 2000).

Da die JNK/SAPK hauptsächlich durch „Umweltstress“ (z.B. Strahlung) aktiviert wird, würde man nach Bestrahlung eine Phosphorylierung erwarten. Dies ließ sich jedoch nur bei zwei der

---

vier untersuchten Zelllinien nachweisen, ob sich dies nun durch den unterschiedlichen PTEN-Status (G109 und G139 PTEN mutiert) oder die geringe Strahlensensibilität der humanen Gliomzellen erklären lässt, ist nicht geklärt.

Bei der Untersuchung des MAPK-Signalweges ließen sich in hier verwendeten Zelllinien keine signifikanten Ergebnisse beobachten. Dies deckt sich gut mit den Resultaten der Arbeitsgruppe um Hara, die in Versuchen an humanen Schilddrüsenzellen zeigen konnte, dass sich im MAPK-Signalweg nach Bestrahlung (2-10 Gy) kein „dose-response“-Effekt auf die Aktivität der MAPK nachweisen lässt (vgl. Abb. 24-27) (1998).

In den Zellzyklus-Untersuchungen konnten wir zeigen, dass alleinige Behandlung mit Rapamycin einen G1-Arrest in den Zelllinien hervorruft, die ein intaktes p53 besitzen (G139, LN229). In den Linien LN18 und G109 konnten wir keinen eindeutigen G1-Arrest nachweisen, jedoch stieg der Anteil der Zellen in der S-Phase an (vgl. Abb. 11 und Tab. 11). Dies deckt sich gut mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Huang: Vor kurzem konnte diese zeigen, dass Rapamycin in den Zellen Apoptose hervorruft, die einen Defekt in der p53-abhängigen Zellzyklus-Kontrolle haben. In diesen Zellen ist der durch Rapamycin induzierte G1-Arrest nur temporär und die Zellen, die die frühe S-Phase erreichen, neigen zur Apoptose (2001). In diesem Zusammenhang scheint auch p21 eine wichtige Rolle zu spielen. Der p53-abhängige Zellzyklus-Arrest ist zum Teil eine Konsequenz aus dem Anstieg von p21. p21 inhibiert die G1 Cyclin-abhängige Kinase, was wiederum zu einem G0-G1-Arrest des Zellzyklus führt. Es konnte gezeigt werden, dass Rapamycin auch in den Zelllinien die Apoptoserate erhöht, die einen Defekt des p21 aufweisen (Huang et al. 2001). Inwieweit p21 bei den hier verwendeten humanen Gliomzelllinien eine Rolle spielt, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Heimberger et al. konnte kürzlich zeigen, dass in Gliomzelllinien ohne funktionierendes PTEN Rapamycin zu einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase sowie einer Abnahme der Zellzahl, die die frühe S-Phase durchlaufen, führt. Weiterhin führte die Behandlung mit Rapamycin in allen Zelllinien zu einer Abnahme der Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) (2005). In einigen Tumoren (z.B. in GBM und Melanomen) lässt sich eine gesteigerte Produktion dieses Wachstumsfaktors nachweisen und wird u.a. für eine Resistenz gegenüber Behandlung verantwortlich gemacht (Geng et al. 2001). Dies deckt sich nur bedingt mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da sich auch in der Zelllinie LN229 nach

---

Behandlung mit Rapamycin ein G1-Arrest nachweisen lässt, diese Zelllinie jedoch ein intaktes PTEN aufweist.

### **6.5 Bedeutung für die Klinik**

Die Rolle des PI3K-/Akt-Signalweges im Bereich des Zellüberlebens und der Zellproliferation hat sich in den letzten Jahren durch immer neuere Erkenntnisse rapide vergrößert. Das Auffinden von neuen Substraten von Akt hat weitere Funktionen und die Wichtigkeit dieses Signalwegs in den Vordergrund treten lassen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zusätzlich Behandlung mit einem Inhibitor des PI3K/Akt-Signalweges die Effektivität der Bestrahlung verbessern kann. Dies konnte mittlerweile nach Abschluß der Arbeit von weiteren Gruppen bestätigt werden (z.B. Osaki et al. 2004, Hu et al. 2000). Akt hat nun eine herausragende Rolle im Bereich der Tumorprogression und ist mit zahlreichen anderen Signalwegen assoziiert (MAPK-, Caspasen-Signalweg), die die Zellproliferation und das zelluläre Überleben kontrollieren. Er stellt gerade deshalb einen guten therapeutischen Angriffspunkt für eine kombinierte Behandlung maligner Tumoren dar. Die Pharmaindustrie ist derzeit auf der Suche nach weiteren PI3K/Akt-Inhibitoren, die klinisch eingesetzt werden können (Osaki et al. 2004). Der hoch spezifische Akt-Inhibitor KP372-1 zeigte bei Versuchen mit Zellen von Schilddrüsenkarzinomen bessere Ergebnisse als LY 294002. Möglicherweise lässt sich dies durch die zusätzliche Blockade anderer Signalwege wie PKC, S6K, ERK1 durch KP372-1 erklären. Bisher ist kein Akt-Inhibitor im klinischen Einsatz (Mandal et al. 2005). Die Problematik hinsichtlich der potentiellen Nebenwirkungen, der mäßigen pharmakologischen Eigenschaften sowie der schlechten Löslichkeit konnten bisher nicht zufriedenstellend gelöst werden (West et al. 2002).

Auch Rapamycin ist in den letzten Jahren bei der Suche nach neuen Ansatzpunkten für Tumorthérapien immer mehr in das Blickfeld getreten.

Rapamycin bzw. sein Ester CCI-779 (Sirolimus®) findet mittlerweile auch vermehrt Einsatz in der Klinik, wenn auch teilweise noch in experimenteller Art und Weise. In Deutschland ist es seit April 2001 als Immunsuppressivum im Handel und wird v.a. nach Nierentransplantationen als Schutz vor einer Abstoßungsreaktion eingesetzt. Es scheint aber auch in der Behandlung fortgeschrittener Mamma-Karzinome, kolorektaler Tumoren und Prostata-

Karzinome nicht nur gute Ergebnisse zu liefern (Chan et al. 2005), sondern auch insgesamt gut verträglich zu sein.

Die Entwicklung weiterer spezifischer Inhibitoren und ihre Ergebnisse im klinischen Einsatz bleiben abzuwarten.

Es ist bekannt, dass genetische Veränderungen in Tumorzellen einen Hinweis auf Therapieansprechen und die 5-Jahresüberlebensrate geben können (z.B. n-myc beim Neuroblastom). Bei Gliomen gab es bisher keinen „Tumormarker“, der eine derartige Schlussfolgerung zugelassen hätte. Unsere Ergebnisse sowie Daten anderer Arbeitsgruppen (Huang et al. 2001, Huang und Houghton 2003, Heimberger et al. 2005) legen die Vermutung nahe, dass der PTEN- und p53-Status bei Gliomen diese Rolle in der Vorhersage übernehmen könnte. Auch hier bleiben weitere Untersuchungen (v.a. mit größeren Fallzahlen) abzuwarten.

## **6.6 Schlussfolgerung**

Die Behandlung humaner Gliomzellen mit den Inhibitoren LY 294002 (Blockade des PI3K/Akt-Signalweges) und Rapamycin (Blockade des p70 S6K-Signalweges) kann die Ergebnisse der Strahlentherapie *in vitro* verbessern. Die Behandlung mit LY 294002 war in allen vier Zelllinien effektiver als die Behandlung mit Rapamycin. Die Rapamycinbehandlung ist am effektivsten bei Zellen, die kein intaktes PTEN besitzen und eine konstitutive Aktivierung des Akt-Weges aufweisen (G109 und G139). Auch der p53-Status scheint einen Einfluss auf das Ansprechen der Behandlung zu haben. Rapamycin ruft in Zellen Apoptose hervor, die einen Defekt in der p53-abhängigen Zellzyklus-Kontrolle haben. In diesen Zellen ist der durch Rapamycin induzierte G1-Arrest nur temporär und die Zellen, die die frühe S-Phase erreichen, neigen zur Apoptose.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sowie die Tatsache, dass der Akt- und p70 S6K-Signalweg in Gliomzellen häufig fehlreguliert sind, führen zu der Schlussfolgerung, dass eine Blockade dieser anti-apoptotischen Signalwege neue Möglichkeiten in der Behandlung maligner Gliome eröffnen könnte.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Prognose des häufigsten und bösartigsten glialen Tumors, des GBM (Glioblastoms), ist nach wie vor schlecht. Aufgrund seines infiltrierenden Wachstums ist eine kurative chirurgische Resektion meist nicht möglich. Die einzige etablierte adjuvante Therapie ist die postoperative Bestrahlung, die aber auch in Kombination mit Chemotherapie bisher keinen wirklichen Durchbruch bei der Verlängerung der Überlebenszeit erbringen konnte (Grossman und Batarra 2004).

Bislang konnten die Gründe für das schlechte Ansprechen auf Radiotherapie nicht ausreichend geklärt werden. In zahlreichen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass ein sehr hoher Prozentsatz der Tumoren genetische Veränderungen aufweist, die zumindest teilweise für die Strahlenresistenz verantwortlich zu sein scheinen (z.B. im *p53*- und *PTEN*-Status). Weiterhin konnten Kleihues und Ohgaki zeigen, dass eine Assoziation zwischen den klinischen Varianten und den genetischen Veränderungen besteht (1999). Insbesondere scheint die Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege in einem Teil maligner Gliome für die Entwicklung der erheblichen Therapieresistenz dieser Tumoren mitverantwortlich zu sein (Ohgaki 2005).

In den letzten Jahren hat eine neue Art der Chemotherapie immer mehr an Bedeutung gewonnen: die sog. „*targeted therapy*“ (zielgerichtete Therapie). Hierbei interferieren die eingesetzten Medikamente gezielt mit einzelnen Molekülen spezifischer, z.B. anti-apoptotischer Signalwege.

In der vorliegenden Arbeit sollte dazu in verschiedenen GBM-Zelllinien die funktionelle Regulation intrazellulärer Signaltransduktionswege bei experimenteller Bestrahlung untersucht werden, um einen neuen Einblick in die Möglichkeiten der Blockade anti-apoptotischer Signalwege als neue Therapieoption zu erhalten.

Insbesondere sollte bei GBM-Zelllinien mit unterschiedlichem *p53*- und *PTEN*-Status der Effekt von Bestrahlung in Kombination mit Signalwegsinhibitoren untersucht werden.

Durch Blockade des PI3K/Akt-Signalweges mit dem synthetischen Inhibitor LY 294002 als auch des p70 S6K-Weges durch Rapamycin konnte die Effektivität der Bestrahlung in allen Zelllinien verstärkt werden. Die Behandlung mit LY 294002 war in allen Zelllinien effektiver als die Behandlung mit Rapamycin. Die Rapamycinbehandlung zeigte den stärksten Effekt bei Zellen, die kein intaktes PTEN besitzen und eine konstitutive Aktivierung des Akt-Weges

aufweisen. Auch der p53-Status scheint einen Einfluss auf die Effektivität der Behandlung zu haben. Es konnte gezeigt werden, dass Rapamycin in Zellen, die einen Defekt in der p53-abhängigen Zellzyklus-Kontrolle haben, Apoptose induzieren kann. In diesen Zellen war der durch Rapamycin induzierte G1-Arrest nur temporär und die Zellen, die die frühe S-Phase erreichen, neigten zur Apoptose.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des anti-apoptotischen PI3K- bzw. des p70 S6K-Signalweges den experimentellen Bestrahlungseffekt bei humanen GBM-Zelllinien effektivieren konnte. Die Stärke dieses Effekts war vom Signalwegstatus der jeweiligen Zelllinie abhängig.

Unter diesen Gesichtspunkten stellt die Blockade anti-apoptotischer Signalwege einen möglichen neuen Therapieansatz insbesondere in Kombination mit Radiatio oder als kombinierte Radiochemotherapie bei der Behandlung maligner Gliome dar. Auch wenn sich bislang nur wenige Signalwegsinhibitoren im klinischen Einsatz befinden, bleibt die Entwicklung neuer spezifischer Inhibitoren sowie deren Langzeitergebnisse abzuwarten.

---

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allan, L.A., Fried, M.: p53-dependent apoptosis or growth arrest induced by different forms of radiation in U2OS cells: p21<sup>WAF1/CIP1</sup> repression in UV induced apoptosis. *Oncogene*, 18: S. 5403-5412, 1999.
2. Alonso, G., Ambrosino, C., Jones, M., Nebreda, A.R.: Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *J. Biol. Chem.*, 275: S. 40641-40648, 2000.
3. Besson, A., Robbins, S.M., Yong, V.W.: PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur. J. Biochem.*, 263: S.605-611, 1999.
4. Bjornsti, M., Houghton, P.J.: The TOR pathway: A target for cancer therapy. *Nature Rev.*, 4: S. 335-348, 2004.
5. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: S. 248-254, 1976.
6. Brognard, J., Clark, A.S., Ni, Y., Dennis, P.A.: Akt/Protein Kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.*, 61: S. 3986-3997, 2001.
7. Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J.C., Abraham, R.T.: Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY 294002. *EMBO J.*, 15: S. 5256-5267, 1996.
8. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. : Biochemical pathways of caspase. Activation during apoptose. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 15: S. 269-290, 1999.
9. Buolamwini, J.K.: Novel molecular targets for cancer drug discovery. In: "The molecular basis of human cancer", Coleman, W.B., Tsongalis, G.J., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1. Aufl., S. 521-525, 2000.
10. Campbell, N.A.: Die Zelle. In: „Biologie“, Campbell, N.A., Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 2. Aufl., S. 226-238, 2000.
11. Cantley, L.C. and Neel, B.G.: New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: S. 4240-4245, 1999.

- 
12. Cavenee, W.K., Bigner, D.D., Newcomb, E.W., Paulus, W., Kleihues, P.: Diffuse astrocytomas. In: „Pathology and genetics of tumours of the nervous system”, Kleihues, P., Cavenee, W.K., International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1. Aufl., S. 1-36, 1997.
  13. Cell Signaling Technology, catalog & technical reference 2000-2001, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main: S. 1-208, 2000.
  14. Chan, S.: Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br. J. Cancer*, 91: S. 1420-1424, 2004.
  15. Chan, S., Scheulen, M.E., Johnston, S., Mross, K., Cardoso, F., Dittrich, C., Eiermann, W., Hess, D., Morant, R., Semiglazov, V., Borner, M., Salzberg, M., Ostapenko, V., Illiger, H.J., Behringer, D., Bardy-Bouxin, N., Boni, J., Kong, S., Cincotta, M., Moore, L.: Phase II Study of Temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily treated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23: S. 5314-5322, 2005.
  16. Chang, H.Y., Yang, X.: Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: S. 821-846, 2000.
  17. Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M., Lord, J.M.: Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 256: S. 34-41, 2000.
  18. Dhanalaskhmi, S., Agarwal, C., Singh, R.P., Agarwal, R.: Silibinin up-regulates DNA-protein kinase-dependent p53 activation to enhance UVB-induced apoptosis in mouse epithelial JB6 cells. *J. Biol. Chem.* 280: S. 20375-20382, 2004.
  19. deGraffenried, L.A., Friedrichs, W.E., Russell, D.H., Donzis, E.J., Middleton, A.K., Silva, J.M., Roth, R.A., Hidalgo, M.: Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt activity. *Clin. Cancer Res.*, 10: S. 8059-8067, 2004.
  20. Dumont, F.J., Su, Q.: Minireview: Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci.*, 58: S. 373-395, 1996.
  21. Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., Jin, S.: The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102: S. 8204-8209, 2005.
  22. Furnari, F.B., Lin, H., Huang, H.J., Cavenee, W.K.: Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: S. 12479-12484, 1997.

- 
23. Garber, K.: Rapamycin's resurrection: A new way to target the cancer cell cycle. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93: S. 1517-1519, 2001.
  24. Geng, L., Donnelly, E., McMahon, G., Lin, P.C., Sierra-Rivera, E., Oshinka, H., Hallahan, D.E.: Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res.*, 61: S. 2413-2419, 2001.
  25. Georger, B., Kerr, K., Tang, C., Fung, K., Powell, B., Sutton, L.N., Phillips, P.C., Janss, A.J.: Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer Res.*, 61: S. 1527-1532, 2001.
  26. Grossman, S.A., Batara J.F.: Current management of glioblastoma multiforme. *Sem. Oncol.*, 31: S. 635-644, 2004.
  27. Gupta, A.K., Bakanauskas, V.J., Cerniglia, G.J., Cheng, Y., Bernhard, E.J., Muschel, R.J., McKenna, W.G.: The Ras Radiation Resistance Pathway. *Cancer Res.*, 61: S. 4278-4282, 2001.
  28. Gupta, A.K., Cerniglia, G.J., Mick, R., Ahmed, M.S., Bakanauskas, V.J., Muschel, R.J., McKenna, W.G.: Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY 294002. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 56: S. 846-853, 2003.
  29. Gupta, N., Vij, R., Haas-Kogan, D.A., Israel, M.A., Deen, D.F., Morgan, W.F.: Cytogenetic damage and the radiation-induced G1-phase checkpoint. *Radiat. Res.*, 145: S. 289-298, 1996.
  30. Haas-Kogan, D.A., Yount, G., Haas, M., Levi, D., Kogan, S.S., Hu, L., Vidair, C., Deen, D.F., Dewey, W.C., Israel, M.A.: p53-dependent G1 arrest and p53-independent apoptosis influence the radiobiologic response of glioblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 36: S. 95-103, 1996.
  31. Hara, T., Namba, H., Yang, T.T., Nagayama, Y., Fukata, S., Kuma, K., Ishikawa, N., Ito, K., Yamashita, S.: Ionizing radiation activates c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK/SAPK) via a PKC-dependent pathway in human thyroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244: S. 41-44, 1998.
  32. Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y.: Apoptosis-the p53 network. *J. Cell Sci.*, 116: S. 4077-4085, 2003.

- 
33. Heimberger, A.B., Wang, E., McGary, E.C., Hess, K.R., Henry, V.K., Shono, T., Cohen, Z., Gumin, J., Sawaya, R., Conrad, C.A., Lang, F.F.: Mechanism of action of rapamycin in gliomas. *Neuro-oncol.*, 7: S. 1-11, 2005.
  34. Herold, G.: Gastroenterologie. In: *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung.* Herold, G., Köln, S. 346-470, 2001.
  35. Hidalgo, M. und Rowinsky E.K.: The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 19: S. 6680-6686, 2000.
  36. Hopkin, K.: A surprising function for the PTEN tumor suppressor. *Science* 282: S.1027-1030, 1998.
  37. Hu, L., Zaloudek, C., Mills, G.B., Gray, J., Jaffe, R.B.: In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY 294002). *Clin. Cancer Res.*, 6: S. 880-886, 2000.
  38. Huang, S., Liu, L.N., Hosoi, H., Dilling, M.B., Shikata, T., Houghton, P.J.: p53/p21 (CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin. *Cancer Res.*, 61: S. 3373-3381, 2001.
  39. Huang, S., Houghton, P.J.: Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 3: S. 371-377, 2003.
  40. Ishii, N., D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A.C. Diserens, and E.G. Van Meir: Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol.*, 9: S. 469-479, 1999.
  41. Izzard, R.A., Jackson, S.P., Smith, G.C.M.: Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent protein kinase. *Cancer Research*, 59: S. 2581-2586, 1999.
  42. Kao, S., Jaiswal, R.K., Kolch, W., Landreth, G.E.: Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the MAPK cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 276: S. 18169-18177, 2001.
  43. Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, 51: S. 6304-6311, 1991.
  44. Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., Harmon, B.V.: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73: S. 2013-2026, 1994.

- 
45. Khwaja, A.: Akt is more than just a Bad kinase. *Nature*, 401: S. 33-34, 1999.
  46. Kiefer, J.: Strahlung und Zellzyklus. In: „Biologische Strahlenwirkung“, Kiefer, J., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1. Aufl., S. 194-200, 1981.
  47. Kleihues, P., Cavenee, W.K.: World Health Organization classification of tumours of the nervous system. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2000.
  48. Kleihues, P., Ohgaki, H.: Primary and secondary glioblastoma: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncol.*, 1: S. 44-51, 1999.
  49. Kraus, A., Gross, M.W., Knuechel, R., Munkel, K., Neff, F., Schlegel, J.: Aberrant p21 regulation in radioresistant primary glioblastoma multiforme cells bearing wild-type p53. *J. Neurosurg.*, 93: S. 863-872, 2000.
  50. Kuboki, Y., Ito, M., Takamatsu, N., Yamamoto, K., Shiba, T., Yoshioka, K.: A scaffold protein in the c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathways suppresses the extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Biol. Chem.*, 275: S. 39815-39818, 2000.
  51. Kunwar, S., Mohapatra, G., Bollen, A., Lamborn, K.R., Prados, M., Feuerstein, B.G.: Genetic subgroups of astrocytomas correlate with patient age and survival. *Cancer Res.* 61: S. 7683-7688, 2001.
  52. Law, B.K.: Rapamycin: An anti-cancer immunosuppressant? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 56: S. 47-60, 2005.
  53. Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., Jacks, J.: p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362: S.847-849, 1993.
  54. Mandal, M., Kim, S., Younes, M.N., Jasser, S.A., El-Naggar, A.K., Mills, G.B., Myers, J.N.: The Akt inhibitor KP372-1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Br. J. Cancer*, 92: S. 1899-1905, 2005.
  55. Mayo, L.D., Dixon, J.E., Durden, D.L., Tonks, N.K., Donner, D.B.: PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J. Biol. Chem.*, 277: S. 5484-5489, 2001.
  56. Mills, G.B., Lu, Y., Kohn, E.C.: Linking molecular therapeutics to molecular diagnostics: Inhibition of the FRAP/RAFT/TOR component of the PI3K pathway preferentially blocks PTEN mutant cells in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: S. 10031-10033, 2001.
  57. Neshat, M.S., Mellinghoff, I.K., Tran, C., Stiles, B., Thomas, G., Petersen, R., Frost, P., Gibbons, J.J., Wu, H., Sawyers, C.L.: Enhanced sensitivity of PTEN-deficient

- 
- tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: S. 10314-10319, 2001.
58. Ohgaki, H.: Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathol.*, 25: S. 1-7, 2005.
59. Ohgaki, H., Kleihues, P.: Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.*, 109: S. 93-108, 2005.
60. Ohgaki, H., Kleihues, P.: Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 64: S. 479-489, 2005.
61. Osaki, M., Oshimura, M., Ito, H.: PI3K-Akt pathway: Its function and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9: S. 667-676, 2004.
62. Owa, T., Yoshino, H., Yoshimatsu, K., Nagasu, T.: Cell cycle regulation in the G1 phase: A promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr. Med. Chem.*, 8: S. 1487-1503, 2001.
63. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: Commonly used buffers. In: "Molecular cloning: a laboratory manual.", Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2. Aufl., S. B.20-B.28, 1989.
64. Schlegel, J., Piontek, G., Budde, B., Neff, F., Kraus, A.: 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: S. 103-108, 2000.
65. Sehgal, S.N., Baker, H., Vezina, C.: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.*, 28: S. 727-732, 1975.
66. Semba, S., Itoh, N., Ito, M., Harada, M., Yamakawa, M.: The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenylchromone (LY 294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 8: S. 1957-1963, 2002.
67. Smolinski, K.N., Meltzer, S.J.: Inactivation of negative growth regulators during neoplastic transformation. In: "The molecular basis of human cancer", Coleman, W.B., Tsongalis, G.J., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1. Aufl., S. 87-95, 2000.
68. Taghian, A., Suit, H., Pardo, F., Gioioso, D., Tomkinson, K., Dubois, W., Gerweck, L.: In vitro intrinsic radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 23: S. 55-62, 1992.

- 
69. Thornberry, N.A., Lazebnik, Y.: Caspases: enemies within. *Science*, 281: S. 1312-1316, 1998.
  70. Tohma, Y., Gratas, C., Biernat, W., Peraud, A., Fukuda, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H.: PTEN (MMAC1) Mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: S. 684-689, 1998.
  71. Vazquez, F., Sellers, W.R.: The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1470: S. M21-M35, 2000.
  72. Versteeg, H.H., Nijhuis, E., van der Brink, G.R., Evertzen, M., Pynaert, G.N., van Deventer, S.J.H., Coffey, P.J., Peppelenbosch, M.P.: A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein. *Biochem. J.*, 350: S. 717-722, 2000.
  73. v. Deimling, A., v. Ammon, K., Schoenfeld, D., Wiestler, O.D., Seizinger, B.R., Louis, D.N.: Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol.*, 3: S.19-26, 1993.
  74. Wang, C.C.: Biological factors that influence cell survival and radiation sensitivity. In: "Clinical radiation oncology", Wang, C.C., Wiley-Liss Verlag, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 2. Aufl., S. 31-34, 2000.
  75. West, K.A., Castillo, S.S., Dennis, P.A.: Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist. Updat.*, 5: S. 234-248, 2002.
  76. Zhang, Y., Dong, Z., Nomura, M., Zhong, S., Chen, N., Bode, A.M., Dong, Z.: Signal transduction pathways involved in phosphorylation and activation of p70 S6K following exposure to UVA irradiation. *J. Biol. Chem.*, 276: S. 20913-20923, 2001.

## 9. DANKSAGUNG

Für ihre großzügige Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit danke ich meinen Eltern, sowie meinem Bruder Hartmut.

An Herrn Prof. Dr. med. Schlegel richtet sich mein sehr herzlicher Dank für die Überlassung des Themas sowie für die sorgfältige wissenschaftliche Anleitung und die wohlwollende Unterstützung. Das mir entgegengebrachte Vertrauen und sein persönliches Engagement haben wesentlich zur Förderung meiner Arbeit beigetragen.

Für ihre freundliche Unterstützung im Labor möchte ich besonders Guido Piontek, Dr. Martina Rudelius, Dr. Frauke Neff und allen Doktoranden von der Fachabteilung für Neuropathologie danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Anca-Ligia Grosu und Dr. Nieder von der Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. M. Molls), Technische Universität München, bedanken, ohne deren großzügige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die sorgfältig durchgeführten Zellzyklus-Bestimmungen möchte ich mich herzlich bei Dr. Gero Brockhoff vom Institut für Pathologie, Regensburg, bedanken.

---

### Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

„Blockade des anti-apoptischen Phospholipid-Signalweges als möglicher adjuvanter Therapieansatz bei malignen Gliomen“

in der Fachabteilung Neuropathologie des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums Rechts der Isar unter der Anleitung und Betreuung durch Univ.-Prof. Dr. med. J. Schlegel ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleitung vorgelegt.
- Die vollständige Dissertation wurde in ..... veröffentlicht. Die Fakultät für Medizin hat der Veröffentlichung zugestimmt.
- Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
- Ich habe bereits am ..... bei der Fakultät für ..... der Hochschule ..... unter der Vorlage einer Dissertation mit dem Thema ..... die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis .....

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den .....

.....

Unterschrift

---

## CURRICULUM VITAE

### Persönliche Daten

Name, Vorname: Durchschlag, Gudrun Heide  
 Strasse: Adelgundenstr. 1  
 PLZ/Wohnort: 80538 München  
 Geburtsdatum/-ort: 15.06.1978, Regensburg  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: österreichisch

Eltern: Gerlinde Durchschlag, Dipl. Säuglings- und  
 Kinderkrankenschwester, dzt. Hausfrau  
 Dr. Helmut Durchschlag, Akademischer Direktor  
 an der Universität Regensburg

### Schulbildung

1984-1988 Grundschule Königswiesen in Regensburg  
 1988-1997 Goethe-Gymnasium in Regensburg (naturwissenschaftlicher  
 Zweig)  
 06/1997 Abitur am Goethe-Gymnasium

### Berufsausbildung

11/1997-05/2004 Studium der Humanmedizin an der Techn. Univ. München  
 08/1999 Ärztliche Vorprüfung  
 08/2000 Erstes Staatsexamen  
 04/2003 Zweites Staatsexamen  
 05/2004 Drittes Staatsexamen

02/2001-03/2004 Studentische Hilfskraft im Giftnotruf München der  
 toxikologischen Abteilung im Klinikum Rechts der Isar

06/2004-10/2004 Beschäftigung als Ärztin im Praktikum  
 11/2004-dato Beschäftigung als Assistenzärztin an der Kinderklinik und  
 Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar  
 der Techn. Univ. München

München,