

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

Einfluss von HER2 auf die EGF Rezeptor - vermittelte Signaltransduktion und
Migration in humanen Glioblastomzelllinien

Anne-Kristin Rappl

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

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

Die Dissertation wurde am 11. Januar 2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 27. Mai 2008 angenommen.

meinen Eltern

A.	Einleitung	1
1.	Problemstellung	1
2.	Das Glioblastom	1
2.1	Klassifikation glialer Tumoren	1
2.2	Pathologie des Glioblastoms	2
2.3	Molekularpathologie astroglialer Tumoren	3
2.4	Ätiologie und Risikofaktoren	5
2.5	Therapie	7
3.	Rezeptor Tyrosinkinasen und Signaltransduktion	8
3.1	Die Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) Familie	10
3.2	Der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) / Akt Signalweg	12
3.3	Der Mitogen aktivierte Protein (MAP)-Kinase Signalweg	14
4.	Zelladhäsionsmoleküle	15
4.1	Cadherine	16
4.2	Integrine	17
5.	Zielsetzung	19
B.	Material und Methoden	20
1.	Material	20
1.1	Geräte und Laborausstattung	20
1.2	Verbrauchsmaterial	20
1.3	Chemikalien und Reagenzien	21
1.4	Enzyme	22
1.5	Kommerzielle Kits und Größenstandards	22
1.6	Puffer und Lösungen	22
1.7	Medien und Reagenzien	23
1.7.1	Eukaryotische Zellkultur	23
1.7.2	Bakteriologie	23
1.8	Vektoren und Plasmide	24
1.9	Antikörper	24
1.10	Oligonukleotide	25
2.	Methoden	26
2.1	Klonierung der HER2 Rezeptor Konstrukte	26
2.2	Plasmidaufreinigung (Mini-Präp) aus <i>E. coli</i>	29
2.3	Kultivierung und Konservierung eukaryotischer Zellen	30
2.4	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	30

2.5	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen	31
2.6	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	32
2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.8	Western Blot Analyse	33
2.9	Zellbiologische Assays	33
2.9.1	Woundhealing Assay	33
2.9.2	RNA Interferenz	34
2.10	Immunfluoreszenz	34
2.11	Immunhistochemie	35
C.	Ergebnisse	36
I.	HER2 moduliert die EGF Rezeptor Aktivierung und Signaltransduktion in LN18 Glioblastomzellen	36
1.	Charakterisierung der HER2 Rezeptor transfizierten LN18 Zellklone	36
1.1	Expression und Aktivierung von HER2 und EGF Rezeptor	36
1.2	Lokalisation von HER2 und EGF Rezeptor	39
2.	Beeinflussung der EGF Rezeptor vermittelten Signaltransduktion	43
2.1	Einfluss von HER2 auf den PI3-Kinase / Akt Signalweg	44
2.2	Einfluss von HER2 auf den MAP-Kinase Signalweg	46
II.	HER2 beeinflusst das Migrationsverhalten der transfizierten LN18 Zellklone	47
1.	Migration in HER2VE und HER2VEKA transfizierten LN18 Zellen im Vergleich zu parentalen LN18 Glioblastomzellen	47
2.	Das unterschiedliche Migrationsverhalten der HER2-Klone wird durch Reorganisation von Zelladhäsionsmolekülen vermittelt	50
2.1	Expression und Lokalisation von E-Cadherin in LN18 HER2-Klonen	50
2.2	Expression von N-Cadherin in LN18 HER2-Klonen	51
2.3	Lokalisation von N-Cadherin in LN18 HER2-Klonen	52
2.4	Regulation weiterer Zelladhäsionsmoleküle	53
2.5	siRNA gegen N-Cadherin in LN18 HER2VEKA-Zellen	55
3.	Blockierung von EGF und HER2 Rezeptor führt zu erhöhter N-Cadherin Expression und verminderter Migration in HER2VE-Zellen	57
4.	Bestätigung der Ergebnisse in alternativen LN18 HER2N-, HER2VE- und HER2VEKA-Klonen, sowie in den Glioblastomzelllinien LN229 und G139	60

III.	N-Cadherin Expression und Lokalisation in humanem glialen Tumorgewebe lässt eine Unterscheidung von Tumorzentrum und Infiltrationszone zu	67
1.	Expression und Lokalisation von N-Cadherin im Glioblastom <i>in situ</i>	67
2.	N-Cadherin und pEGFR (pY1086) Coimmunfluoreszenz an Glioblastom Gewebeschnitten	71
D.	Diskussion	72
1.	HER2 moduliert die EGF Rezeptor Aktivierung und Internalisierung in LN18 Gliomzellen	74
2.	Die EGF Rezeptor vermittelte Signaltransduktion in LN18 Glioblastomzellen wird durch HER2 Rezeptor Konstrukte beeinflusst	76
3.	Expression des dominant-negativen HER2VEKA Rezeptors verhindert Migration in transfizierten LN18 Glioblastomzellen	78
4.	Die Unterschiede im Migrationsverhalten der HER2-Klone werden durch Reorganisation von N-Cadherin vermittelt	79
5.	EGF und HER2 Rezeptor beeinflussen N-Cadherin Reorganisation und Integrin Signaltransduktion in LN18 Glioblastomzellen	82
6.	Ausblick	86
E.	Zusammenfassung	88
F.	Literaturverzeichnis	90
G.	Abkürzungsverzeichnis	103
H.	Publikationen und Kongressbeiträge	106
	Danksagung	107

A. Einleitung

1. Problemstellung

Nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, stellen Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Bei fast jedem vierten Sterbefall im Jahr 2006 wurde eine bösartige Neubildung als Todesursache festgestellt.

An bösartigen Neubildungen – der bedeutendsten Todesursache in den mittleren Jahren – verstarben 2006 211523 Personen. Bei Männern waren die bösartigen Tumoren der Verdauungsorgane (36424 Verstorbene) und der Atmungsorgane (30538 Verstorbene) die häufigste Krebsart. Bei den Frauen waren neben den Tumoren der Verdauungsorgane (32188 Verstorbene), die bösartigen Neubildungen der Brustdrüse (17286 Verstorbene) die häufigsten Krebsarten (Statistisches Bundesamt, 2007).

Klinisch gesehen können ca. 100 verschiedene Krebsarten unterschieden werden.

Das Glioblastom ist ein hirneigener Tumor mit verheerender Prognose und macht etwa 40 % aller glialen Tumoren aus (Preston-Martin, 1996).

Trotz optimierter Therapien ist das Auftreten von Rezidiven die Regel, welches auf das hoch infiltrative Wachstum dieser Tumoren zurückzuführen ist (Hofer and Herrmann, 2001).

Für die Entwicklung effektiver Strategien gegen diese hochmalignen Tumoren ist es von großer Wichtigkeit, die Migrations- und Invasionsmechanismen der Tumorzellen zu identifizieren.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Identifikation der Mechanismen der Tumorzellmigration im Glioblastom, im Zusammenhang mit Rezeptor Tyrosinkinase (RTK) der EGF Rezeptor Familie (EGF und HER2 Rezeptor) sowie der zugehörigen Signaltransduktion.

2. Das Glioblastom

2.1 Klassifikation glialer Tumoren

Die Klassifikation und Gradierung glialer Tumoren erfolgt nach den Richtlinien der *World Health Organization (WHO)*. Diese beruht auf der Annahme einer Entdifferenzierung der Tumoren, deren Stufen den Malignitätsgraden (WHO-Grad I bis IV) entsprechen. WHO-Grad I Tumoren sind benigne und können durch vollständige neurochirurgische Resektion geheilt werden.

WHO-Grad II Tumoren sind niedrigmaligne und können einen günstigen klinischen Verlauf aufweisen. Eine Heilung durch Resektion ist hier allerdings nicht die Regel.

WHO-Grad III Tumoren sind maligne und kennzeichnen sich durch ihren tödlichen Verlauf innerhalb weniger Jahre.

WHO-Grad IV Gliome sind hochmaligne und führen in der Regel innerhalb eines Jahres zum Tod des Patienten.

Außerdem werden die Tumoren entsprechend ihres Ursprungsgewebes, so z. B. Astroglia, Oligodendroglioma oder Ependym klassifiziert. In der WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems aus dem Jahr 2000 wurde zudem erstmals die Rolle der Tumorgenetik umfassend mit aufgenommen (Kleihues 2000).

Die diffus infiltrierenden Astrozytome beim Erwachsenen zeigen regelhaft eine Tendenz zur Tumorprogression, als deren maligner Endpunkt das Glioblastom angesehen wird. Dabei wird ein 3-armiges Gradierungssystem angewendet, welches die WHO-Grade II bis IV umfasst. Diagnostische Kriterien des Glioblastoms sind der histopathologische Nachweis von Nekrosen, hoher Mitoseaktivität, sowie von Gefäßproliferaten und molekulare Untersuchungen hinsichtlich genetischer Abberationen, die gut mit dem jeweiligen Tumorgrad korrelieren (Louis, 2007).

2.2 Pathologie des Glioblastoms

Das Glioblastom (GBM) ist ein WHO-Grad IV Tumor und mit 12-15 % aller intrakraniellen Tumorerkrankungen die häufigste, primäre Neoplasie des ZNS mit astrozytärer Differenzierung. Dieser diffus und infiltrierend wachsende gliale Tumor macht ca. 60-75 % aller astrozytären Tumoren aus (Ohgaki and Kleihues, 2005). Es treten die Varianten Riesenzell-Glioblastom, mit z. T. mehrkernigen Riesenzellen, und das Gliosarkom auf. Die Histopathologie beinhaltet neben hoher Mitoseaktivität auch Gefäßproliferate und Tumorgewebnekrosen in großen Anteilen (bis zu 80 % der Tumormasse; s.a. Abb 1). Hier unterscheidet man zudem noch primäre, also *de novo* entstandene, und sekundäre, also aus WHO-Grad II oder III durch Progression entstandene, Glioblastome (Louis, 2007; Peiffer and Kleihues, 1999). Die Unterscheidung dieser beiden Typen ist jedoch aufgrund der gleichen histopathologischen Charakteristika schwierig, wobei man davon ausgeht, dass ca. 80 % der Gliome primären Ursprungs sind (Dropcho and Soong, 1996).

Das Glioblastom betrifft v. a. Erwachsene im Alter zwischen 45 und 75 Jahren und ist vorwiegend in den zerebralen Hemisphären lokalisiert. Frauen und Männer sind in etwa gleich stark betroffen. Die Lebenserwartung nach der Diagnose beträgt durchschnittlich ca. ein Jahr, und weniger als 2 % der Patienten überleben trotz Therapie (Resektion, Chemo- und Radiotherapie) mehr als 3 Jahre (Miller and Perry, 2007). Das infiltrative Wachstum dieser Tumorzellen in umliegende Hirnstrukturen ist das größte Problem in der Neuroonkologie, bei chirurgischer Resektion und bei Bestrahlung, da nie alle Tumorzellen entfernt bzw. erfasst werden können. Trotz des infiltrativen Wachstums innerhalb des

Gehirns, können die Tumorzellen jedoch nur höchst selten hämatogen oder innerhalb der Liquorräume in andere Teile des Körpers metastasieren (Louis, 2007).

Ein weiteres Problem ist die starke Chemoresistenz eines Großteils dieser Tumoren (Haroun et al., 2002), die für eine enttäuschende Wirkung der Chemotherapie sorgt und keinen durchschnittlichen Überlebenszeitgewinn erbringt. Ein Teil der Patienten scheint allerdings bezüglich der Überlebenszeit von der Chemotherapie zu profitieren.

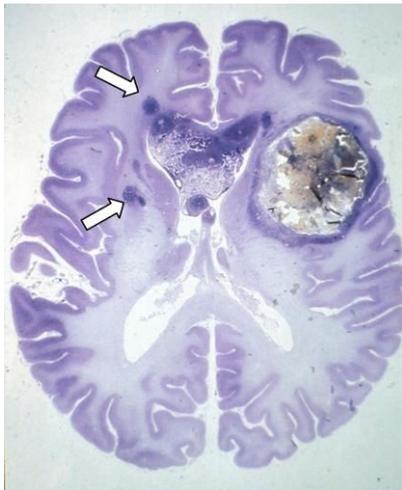


Abb 1: Doppelhemisphärenschnitt mit einem Glioblastom in der rechten Hemisphäre

In der rechten Hirnhälfte ist eine große Gewebsnekrose erkennbar. Um den nekrotischen Bereich herum sieht man in der Kresyl-Violett Färbung nach Nissl einen schmalen Saum vitaler Tumorzellen (dunkelblau), die das umliegende Hirnparenchym infiltrieren. Die so entstandenen Sekundärtumore sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

2.3 Molekularpathologie astroglialer Tumoren

Auch für die Tumoren der astroglialen Reihe besteht ein mehrstufiges Modell der Tumorprogression, wie für das sog. Vogelsteinmodell der Tumorigenese des Kolonkarzinoms beschrieben wurde. Dieses besagt, dass mehrere z. T. vererbte Einzelmutationen erfolgen müssen, um eine Entartung der Zellen auszulösen (Fearon and Vogelstein, 1990; Kinzler and Vogelstein, 1996; Weinberg, 1996).

Wegen der starken Fähigkeit zur Infiltration des umliegenden Hirnparenchyms rezidivieren niedergradige Astrozytome nahezu ohne Ausnahme. Etwa 70 % der WHO-Grad II Gliome entdifferenzieren durch Progression von differenzierten, weniger malignen Tumoren, hin zum hochmalignen Glioblastom (sekundäres Glioblastom). Dabei hat sich gezeigt, dass genetische Veränderungen mit der Tumorprogression glialer Tumoren einhergehen. So treten im primären Glioblastom häufig eine *EGFR* Genamplifikation, sowie eine Deletion des *PTEN*-Gens auf. Zytogenetische Veränderungen stellen z. B. Polysomie des Chromosoms 7 und Verluste des Chromosoms 10 (+7/-10) dar.

Sekundäre Glioblastome weisen hingegen häufig *Tp53*-Mutationen auf. Aufgrund dieser Daten konnte das in Abbildung 2 dargestellte Modell zur astroglialen Tumorprogression erstellt werden (Ohgaki and Kleihues, 2005).

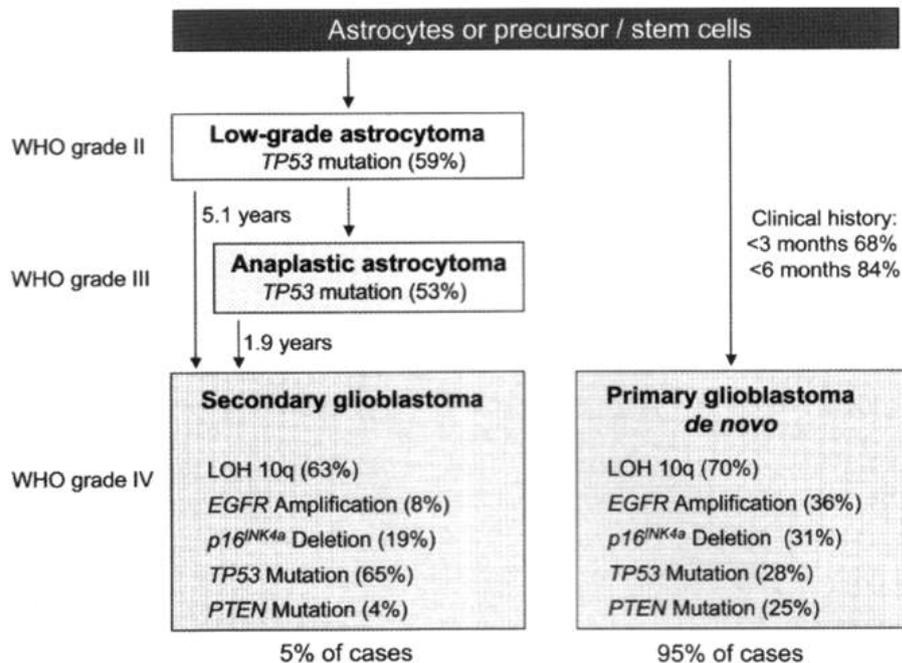


Abb 2: Modell der glialen Tumorprogression modifiziert nach Ohgaki et al. 2005

Zeitpunkt und Häufigkeit des Auftretens genetischer Abberationen bei der Entstehung des Glioblastoms. Loss of heterocycicity (LOH) des Chromosoms 10q tritt sowohl bei primären, als auch bei sekundären Glioblastomen auf; *TP53*-Mutationen sind frühe genetische Alterationen bei der Progression des sekundären Glioblastoms.

Das *TP53*-Gen codiert für das p53 Protein, das in verschiedenste zelluläre Prozesse involviert ist, wie z. B. Zellzyklus, Zellantwort auf DNA-Schädigung (Reparatur), Zelldifferenzierung oder Apoptose. Als Gegenspieler wirkt das Produkt des *MDM2*-Gens, das die transkriptionelle Aktivität des p53 Tumorsuppressors inhibiert. Dieses Protein ist auch für die Degradierung des p53 Proteins verantwortlich. In gesunden Zellen ist in einem Auto-Feedback-Mechanismus sowohl die p53 Aktivität, als auch die *MDM2* Expression reguliert (Picksley and Lane, 1993). Die daran beteiligten Faktoren weisen oft tumorspezifische Veränderungen in Gliomen auf (Ishii et al., 1999). Ein Verlust der p53 Funktion durch Mutationen im zugehörigen Gen tritt in ca. 65 % der sekundären aber nur in etwa 25 % der primären Glioblastome auf. Amplifikation oder Überexpression des *MDM2*-Gens stellt einen alternativen Mechanismus zur funktionellen Inaktivierung des p53 Proteins dar (Prives, 1998). Eine Amplifikation ist in ca. 10 % der primären Glioblastome ohne *TP53* Mutation nachweisbar (Reifenberger et al., 1993), während eine

Überexpression von MDM2 in über 50 % der primären Glioblastome zu finden ist (Biernat et al., 1997a; Kleihues and Ohgaki, 1999).

Der CDK4/Cyclin D1 Komplex phosphoryliert das Retinoblastom Protein (*RB1*-Gen), das für den Übergang von der G1 in die S Phase des Zellzyklus von großer Wichtigkeit ist. Durch die Phosphorylierung wird die Freisetzung des E2F Transkriptionsfaktors induziert, der wiederum Zellzyklus-regulierende Gene aktiviert. So kodiert das *p16^{INK4a}*-Gen für ein Protein, das den CDK4/Cyclin D1 Komplex inhibiert und so den G1-S Übergang negativ regulieren kann. Der Verlust der Zellzykluskontrolle resultiert aus Alterationen in einigen dieser Gene, so z. B. Verlust der *p16^{INK4a}* Expression, Überexpression oder Amplifikation der CDKs, oder Verlust der *RB1* Funktion (Ueki et al., 1996). In höhergradigen Gliomen finden sich für fast alle Gene Mutationen und Alterationen, wobei primäre und sekundäre Glioblastome mit einer Rate von 40-50 % gleichermaßen betroffen sind. Dabei schließen sich *RB1* und *p16* Mutationen nahezu gegenseitig aus und Mehrfachmutationen sind sehr selten (Biernat et al., 1997b).

Eine weitere, sehr häufig im Glioblastom anzutreffende Alteration ist die *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) Genamplifikation. Das Protein gehört zu den Rezeptor Tyrosinkinase und ist für die Signaltransduktion von u. a. Proliferation und Migration verantwortlich.

In etwa 40 % aller primären Glioblastome ist das *EGFR* Gen amplifiziert, in sekundären Glioblastomen dagegen kaum (Schlegel et al., 1994a). Die Genamplifikation ist oft mit strukturellen Abberationen des Rezeptors verbunden. Die häufigste Variante ist *EGFRvIII*, der ein Teil der extrazellulären Rezeptordomäne fehlt, und die in 20-50 % der Glioblastome mit *EGFR* Amplifikation vorkommt (Pedersen et al., 2001).

Ein weiteres, oft von Mutationen betroffenes Gen, das ebenfalls in die EGF Rezeptor Signaltransduktion involviert ist, ist das *PTEN*-Gen (*phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10*). Als Konsequenz der *PTEN*-Deletion kommt es u. a. zu einer Überaktivierung des PI3K/Akt (Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt) Signalweges, dessen Funktionen von Proliferation über Migration und Invasion bis hin zu Anti-Apoptose reichen. *PTEN* ist in 15-40 % aller primären Glioblastome mutiert (Ohgaki and Kleihues, 2007).

2.4 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie der glialen Tumoren des Menschen ist bisher nur unzureichend geklärt (Hochberg et al., 1984). Heute geht man davon aus, dass maligne Tumoren allgemein als genetisch-somatische Erkrankung angesehen werden können (Bishop and Hall, 2000). Ein Modell sieht die Basis der Tumorentstehung in einer gewissen genetischen Disposition; es kommt dann zu einer Akkumulation von Mutationen, die durch verschiedene Umwelteinflüsse entstanden sind. Dazu zählen chemische, physikalische

oder auch biologische Noxen die innerhalb des Lebensraums auftreten, aber auch das persönliche Verhalten und die Lebensgewohnheiten des Einzelnen beinhalten (Collins, 1998; Tomatis, 1994).

Risikofaktoren, also Faktoren die statistisch signifikant häufiger mit der Entstehung glialer Tumoren einhergehen, sind über viele Jahre identifiziert und z. T. kontrovers diskutiert worden. Es soll hier nur ein Teil der Daten zusammenfassend dargestellt werden, wobei v. a. auf die Einwirkung von Umweltfaktoren eingegangen werden soll, da außerhalb der sehr seltenen hereditären Syndrome (Li-Fraumeni-Syndrom, Turcot-Syndrom) keine familiäre Häufung für Hirntumoren zu bestehen scheint (Li et al., 1995). Mehrere Studien aus den USA, Kanada und Irland belegen, dass Arbeiter im land- und forstwirtschaftlichen Bereich, ein signifikant höheres Risiko besitzen, an einem Hirntumor zu erkranken. Verantwortliche Faktoren konnten jedoch noch nicht identifiziert oder bewiesen werden, wobei der Umgang mit Pestiziden als möglicher Auslöser angesehen wurde (Bohnen and Kurland, 1995; Daly et al., 1994). In einer aktuelleren Studie konnte hingegen kein Zusammenhang zwischen in der Landwirtschaft eingesetzten Pestiziden und erhöhter Inzidenz für Gliome gefunden werden (Ruder et al., 2004).

Es könnten Unterschiede zwischen ländlicher und städtischer Bevölkerung und damit verbundener Lebensführung als Risikofaktor für die Entstehung von Hirntumoren bestehen. Ries et al. stützen diese Annahmen, da in ihrer SEER-Studie (Surveillance Epidemiology and End Results) die höchsten Inzidenzen in ländlichen US-Staaten (North Dakota, Oregon, Arkansas, Tennessee) auftraten, während urbane Staaten, wie New York, die niedrigsten Inzidenzen aufwiesen (Ries, 1996).

Ein erhöhtes Risiko ergab sich zudem für Arbeiter in der amerikanischen Nuklearindustrie, bei Fernsehtechnikern, sowie bei Beschäftigten im molekularbiologischen Bereich, die mit Radionukliden arbeiten (Alexander, 1991; Cordier et al., 1995; Ryan et al., 1992). Alle hier genannten Berufsgruppen sind während der Arbeit einer gewissen Strahlenexposition ausgesetzt.

Bei der Untersuchung physikalischer Noxen als Risikofaktoren für Gliomentstehung, ist die Benutzung von Mobiltelefonen von Bedeutung. In einer aktuellen Studie konnte bei einer ≥ 10 jährigen Verwendung von Mobiltelefonen ein erhöhtes Gliom-Risiko bestätigt werden (Hardell et al., 2007).

Der hier dargestellte Ausschnitt an möglichen Risikofaktoren zeigt, dass all diese Faktoren wenn überhaupt, nur einen geringen Beitrag zur Tumorigenese von Gliomen leisten. Außerdem zeigen ein Teil der hier genannten Faktoren einen viel deutlicheren Einfluss bei der Entstehung anderer Krebsarten. Zusammenfassend ergeben sich keine eindeutig belegbaren Risikofaktoren, die deutlich oder mehrheitlich mit der Entstehung glialer Tumoren assoziiert sind.

2.5 Therapie

Nach histopathologischer Sicherung der Diagnose, die z. B. mittels einer stereotaktischen Biopsie herbeigeführt wurde, steht am Anfang der Therapie immer die neurochirurgische Resektion (Mikrochirurgie) des Glioms, nicht zuletzt wegen des äußerst aggressiven und infiltrativen Wachstums dieser Tumoren. Ein großes Problem besteht darin, dass häufig nicht der gesamte Tumor entfernt wird, da im Gehirn nicht großzügig im Gesunden operiert werden kann und wichtige benachbarte Hirnstrukturen geschont werden müssen. Daraus ergibt sich wiederum eine erhöhte Rezidivrate (Hofer and Herrmann, 2001; Prados and Levin, 2000).

Postoperativ schließt sich in einem adjuvanten Therapieansatz eine regional begrenzte Radiotherapie, heute oft als Radiochirurgie, an. Nach Bestrahlung verlängert sich die Überlebenszeit auf durchschnittlich 9-10 Monate, wohingegen eine lediglich operative Therapie ein Überleben von bis zu 8 Monaten sichert (Abb 3). Heute wird meist eine adjuvante Radiochemotherapie mit Nitrosoharnstoffen angewendet (Holland, 2000).

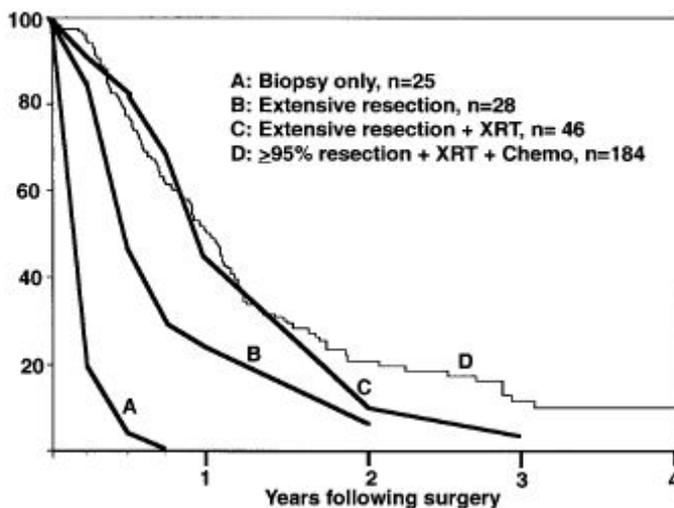


Abb 3: Kaplan-Meier Überlebenskurve für Glioblastompatienten nach Holland 2000

Es sind die Überlebensraten für Patienten mit A: alleiniger Biopsie, B: vollständiger Resektion, C: Resektion mit anschließender Radiotherapie und D: Resektion mit Radio- und Chemotherapie aufgezeichnet.

Leider ist die Kombination von Radio- und Chemotherapie nicht so erfolgreich wie erhofft, und auch komplexe und differenzierte Therapieschemata verlaufen eher enttäuschend, da Glioblastome eine sehr hohe Strahlen- und Chemoresistenz aufweisen. Es gibt folglich keine Langzeitüberlebenden länger als 18 Monate nach Erstdiagnose. Die optimale Chemotherapie für Glioblastompatienten gibt es zum heutigen Zeitpunkt noch nicht und

weitere Studien zu dieser Problematik sollten dringend erarbeitet werden (Hofer and Herrmann, 2001; Prados and Levin, 2000).

Der Einsatz von Temozolomid (TMZ), einem neuen alkylierendem Agens, zeigt erste Therapieerfolge, wobei nur ein Teil der Patienten auf diese Chemotherapie anspricht (Hegi et al., 2005). Bei adjuvanter Therapie mit zusätzlicher Temozolomid Applikation konnte die 2 jährige Überlebensrate von 10 auf 26 % gesteigert werden (Back et al., 2007; Stupp et al., 2005; Terasaki et al., 2007).

Ein weiterer Ansatzpunkt für neue Therapien sind monoklonale Antikörper (z. B. Cetuximab) und Inhibitoren (z. B. Gefitinib) in der sog. „Targeted Therapy“. Zielmoleküle dieser Therapie sind v. a. Oberflächenmoleküle der Tumorzellen, wie beispielsweise Wachstumsrezeptoren. In Gliomen kommt dafür der EGF Rezeptor in Frage, da er in einem Großteil der Tumoren überexprimiert wird. Durch die Bindung des Antikörpers werden die Aktivierung des Rezeptors und damit die Signaltransduktion, die mit Proliferation und Invasion der Zellen in Verbindung steht, verhindert. Eine andere Wirkstoffgruppe sind die Tyrosin Kinase Inhibitoren (TKI). Diese kleinen Moleküle sind in der Lage, die Tyrosinkinase Aktivität der Rezeptoren, oder *downstream* gelegener Tyrosinkinase, zu inhibieren und somit wiederum ebenfalls die Signaltransduktion zu blockieren (Nicholas et al., 2006).

3. Rezeptor Tyrosinkinase und Signaltransduktion

Rezeptor Tyrosinkinase (RTK) sind wichtige Regulatoren der interzellulären Kommunikation und an der Kontrolle von Zellwachstum, Proliferation, Differenzierungsprozessen oder dem Metabolismus beteiligt. Bis heute wurden ca. 20 unterschiedliche RTK Familien identifiziert. Die RTKs besitzen alle eine ähnliche molekulare Struktur; sie bestehen aus einer extrazellulären Bindedomäne für spezifische Liganden, einer Transmembran-Region sowie einer intrazellulären Tyrosinasedomäne (Ullrich and Schlessinger, 1990). Nach extrazellulärer Bindung eines für den jeweiligen Rezeptor spezifischen Liganden, wird die intrinsische Kinase aktiviert. Sie besitzt eine hochkonservierte ATP-Bindestelle, welche die Autophosphorylierung der Tyrosinreste katalysiert. Über diese phosphorylierten Tyrosinreste können wiederum Proteine an die Rezeptoren binden, die Src homologe 2 (SH2) oder Phosphotyrosin Bindedomänen (PTB) besitzen. Dies sind z. B. Shc, Grb2 oder Src. Diese Proteine rekrutieren ihrerseits weitere Effektormoleküle, die SH2 oder PTB Bindedomänen beinhalten. So kommt es zu einer Ansammlung von Signalkomplexen an der Membran und zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Wichtige Signalwege, die über RTKs aktiviert werden beinhalten den MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalweg, den PI3K/Akt (Phosphoinositol 3-Kinase/Akt) Signalweg und den JAK/STAT (Janus kinases/signal transducers and activators of transcription) Signalweg (Abb 4). Die Signaltransduktion führt zur

Aktivierung oder Repression verschiedener Gene, was die biologische Antwort auf ein extrinsisches Signal auslöst (Zwick et al., 2002).

In gesunden Zellen werden die Aktivität und die nachgeschaltete Signaltransduktion der RTKs genau koordiniert und strikt kontrolliert. Eine Fehlregulation der beschriebenen Signalsysteme, durch autokrin-parakrine Stimulations-Loops oder genetische Alterationen der Rezeptoren (z. B. Genamplifikation), resultiert in einer fehlregulierten Tyrosinkinase Aktivität. Die meisten dieser Abberationen führen zur Ausbildung von RTKs mit konstitutiver oder verstärkter Aktivierung und Signalweiterleitung, was zu maligner Transformation der Zelle führen kann. Aus diesem Grund sind RTKs regelmäßig mit humanen Krebserkrankungen in Verbindung zu bringen (Zwick et al., 2002).

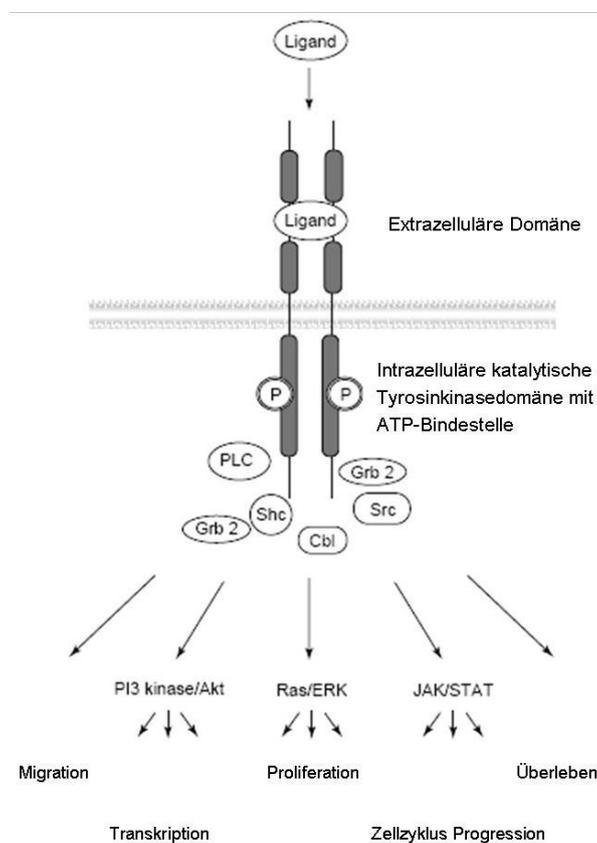


Abb 4: Schema der Rezeptor Tyrosinkinase Signaltransduktion
Erklärung des Schemas siehe Text. Modifiziert nach Zwick et al. 2002.

3.1 Die Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) Familie

Der EGF (*Epidermal Growth Facto*) Rezeptor (Abb 5) ist ein Mitglied der EGF Rezeptor Familie, die aus vier Rezeptor Tyrosinkinasen (HER1/ErbB1/EGFR, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4) besteht. Diese RTK Familie spielt in einer Vielzahl biologischer Prozesse eine große Rolle, sowohl in der normalen Entwicklung als auch bei der Tumorigenese verschiedener Krebsarten (Linggi and Carpenter, 2006). Die ErbB Rezeptoren erkennen insgesamt 11 verschiedene Liganden (Wachstumsfaktoren), die in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tabelle 1: Mitglieder der EGF Rezeptor Familie und ihre Liganden

Ligand	Rezeptor			
	HER1	HER2	HER3	HER4
EGF	+	-	-	-
TGF- α	+	-	-	-
HB-EGF	+	-	-	+
Amphiregulin	+	-	-	-
Betacellulin	+	-	-	+
Epigen	+	-	-	-
Epiregulin	+	-	-	+
Neuregulin-1	-	-	+	+
Neuregulin-2	-	-	+	+
Neuregulin-3	-	-	-	+
Neuregulin-4	-	-	-	+

Die Ligandenbindung induziert die Formation verschiedener Homo- und Heterodimere, was in Konsequenz die intrinsische Kinasedomäne der ErbB Rezeptoren aktiviert, und letztendlich zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne führt. Dies dient als Signal für weitere Effektormoleküle, deren Rekrutierung wiederum zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden führt (Bazley and Gullick, 2005; Holbro and Hynes, 2004). Obwohl die EGF Rezeptor Familie als Prototyp der RTKs gilt, sind die Rezeptoren HER2 und HER3 nicht autonom funktionsfähig; für den HER2 Rezeptor konnte bis heute kein Ligand identifiziert werden und HER3 besitzt keine aktive Kinasedomäne. Diese beiden Rezeptoren können daher normalerweise nur durch Heterodimerisierung mit HER1/EGFR oder HER4 funktionierende Rezeptorkomplexe bilden. Der HER2 Rezeptor spielt eine zentrale Rolle im ErbB Rezeptor Netzwerk, da er

der bevorzugte Dimerisierungspartner aller anderen ErbB Rezeptoren ist (Graus-Porta et al., 1997). Des Weiteren sind HER2 beinhaltende Heterodimere für starke und verlängerte Aktivierung der *downstream* gelegenen Signalwege verantwortlich (Holbro et al., 2003).

Alle Signalwege, die über die Mitglieder der EGF Rezeptor Familie netzwerkartig aktiviert werden, lösen biologische Antworten aus, die von Migration, über Differenzierung und Apoptose, bis hin zu Proliferation reichen (Wells, 1999).

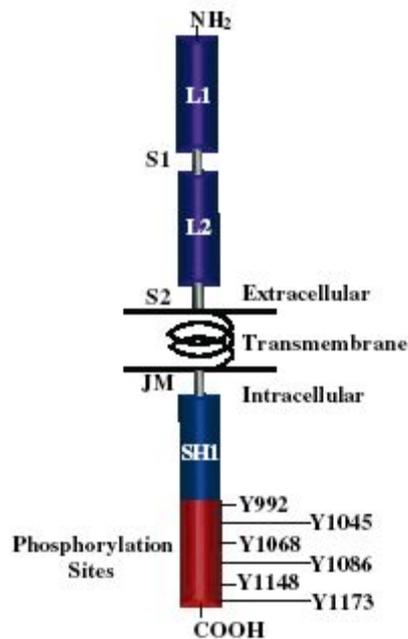


Abb 5: Schematischer Aufbau des EGF Rezeptors

Der EGF Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne, die zwei ligandenbindende Subdomänen (L1 und L2) sowie zwei Cystein-reiche Regionen (S1 und S2) aufweist. Über S1 erfolgt die Bindung an einen zweiten Rezeptor beim Vorgang der Dimerisierung. SH1 kennzeichnet die Tyrosinkinase Domäne, welche die Phosphorylierung der sechs darunterliegenden Tyrosinreste katalysiert. Nach Bazely und Gullick, 2005.

Die Mitglieder der EGF Rezeptor Familie spielen aber nicht nur in normalen humanen Entwicklungsprozessen eine Rolle, sondern auch in der Tumorigenese einer Vielzahl verschiedener solider Tumoren, wo häufig eine Überexpression, Amplifikation oder Mutation der Rezeptoren vorliegt. Alterationen v. a. im EGF und HER2 Rezeptor führen dabei zu einer aggressiveren Ausprägung der Erkrankung, einer damit verbundenen schlechteren Prognose und einer hohen Rezidivrate. Im Glioblastom findet man eine *EGFR* Genamplifikation in über 40 % aller Fälle und auch strukturelle Abberationen (z. B. EGFRvIII) kommen häufig vor; diese resultieren oft in konstitutiver Aktivierung des Rezeptors (Ekstrand et al., 1994).

Eine Überexpression des HER2 Rezeptors spielt besonders im Mammakarzinom eine Rolle bei der Zelltransformation, Migration und Invasion. Hier ist HER2 ein wichtiger prognostischer Faktor und Ansatzpunkt der Therapie (*targeted therapy*, Herceptin®) (Yarden, 2001). Es gibt jedoch immer mehr Hinweise, dass HER2 auch bei der Entstehung des Glioblastoms eine Rolle spielt. Studien belegen die Expression von HER2 im Glioblastom und stellen eine Verbindung von erhöhter HER2 Expression mit erhöhter Mortalität, schlechterer Prognose und einer erhöhten Inzidenz an weiteren primären Tumorerkrankungen außerhalb des ZNS zu erkranken, her (Koka et al., 2003; Mineo et al., 2007; Potti et al., 2004).

Es herrscht keine Klarheit über die Relevanz des HER2 Rezeptors bei der Gliom-Entstehung, oder über die Konsequenzen der Koexpression von HER2 und EGF Rezeptor im Glioblastom, der daraus resultierenden Signalkomplexe oder Unterschiede in der Internalisierung und Degradierung, und damit der Inaktivierung dieser Rezeptoren.

Die Prozesse der ligandeninduzierten endosomalen Internalisierung und Degradierung bzw. das Recycling der Rezeptoren zurück an die Oberfläche sind für den EGF und HER2 Rezeptor unterschiedlich und richtet sich nach dem jeweiligen Dimerisierungspartner. EGF Rezeptor Homodimere werden dabei schneller internalisiert, als HER2 Dimere. Heterodimerisierung ist hoch favorisiert, wenn HER2 in den Zellen exprimiert wird, und diese Heterodimere werden dann langsamer internalisiert (Baulida et al., 1996; Hendriks et al., 2003b). Des Weiteren scheinen EGF Rezeptor Homodimere eher Cbl-abhängig degradiert und lysosomal abgebaut zu werden, während EGFR/HER2 Heterodimere zurück an die Membran transportiert werden (Yarden, 2001).

Der EGF Rezeptor ist zudem in die Zelladhäsion involviert. So konnten Interaktionen des Rezeptors mit FAK und Integrinen nachgewiesen werden, die Zell-Zell- und Zell-Matrix Interaktionen vermitteln und zur Zellmigration beitragen (Sieg et al., 2000).

Um die funktionelle Diversität der Proteine, die von Mitgliedern der EGF Rezeptor Familie komplexiert und phosphoryliert werden, wiedergeben zu können, werden im Folgenden einige wichtige Signalwege der EGF Rezeptor Signalkaskade näher erläutert.

3.2 Der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) / Akt Signalweg

PI3-Kinasen spielen eine große Rolle bei der Kontrolle zellulärer Funktionen. Es gibt drei Klassen von PI3-Kinasen, wobei nur Vertreter der Klasse Ia durch RTKs aktiviert werden können. Mittels der durch RTKs aktivierten PI3-Kinase wird Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP₃) phosphoryliert; ein wichtiges Zielmolekül des PIP₃ ist Akt/ PKB (Akt/Protein Kinase B), welches ein Hauptmediator diverser zellulärer Funktionen, wie Anti-Apoptose, Proliferation und Migration, ist (Jorissen et al., 2003). Die Serin/Threonin Kinase Akt wird durch PIP₃ an die Zellmembran transloziert, wo sie von Proteinkinasen wie PDK-1

phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Die Aktivierung von Akt/PKB kann über verschiedene Signale, z. B. EGF-vermittelte EGF Rezeptor Aktivierung oder über die Integrin/FAK (*focal adhesion kinase*) Kaskade induziert werden (Jorissen et al., 2003; Khwaja et al., 1997; Ruder et al., 2004). Akt/PKB ist ein wichtiges Effektormolekül und es ist eine Vielzahl an Zielmolekülen der Akt/PKB bekannt. Dazu gehören z. B. mTOR, MDM2 oder GSK3 und andere, die in diverse zelluläre Prozesse, wie Apoptose, Proteinsynthese, Zellzyklusregulation oder Migration involviert sind (Abb 6) (Brazil et al., 2004; Cantley, 2002).

Die Lipidphosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) katalysiert wiederum die Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂, bzw. blockiert von vornherein die Formierung von PIP₃ und verhindert so die Aktivierung von Akt/PKB. Dieser Prozess stellt die hauptsächliche negative Regulierung im PI3K/Akt Signalweg dar. Der Verlust der PTEN Lipidphosphatase Funktion, welche als Tumorsuppressor wirkt, ist für eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges in vielen humanen Tumorerkrankungen, u. a. im Glioblastom, verantwortlich (Knobbe et al., 2002; Schlegel et al., 2000). Hierbei kommt es in 15-40 % der Fälle zu einer PTEN Mutation (Louis, 2007). Darüberhinaus wirkt PTEN wegen seiner Tensin Homologie als Regulator der Integrin Signalweiterleitung und ist in der Lage FAK zu dephosphorylieren (Tamura et al., 1998; Tamura et al., 1999).

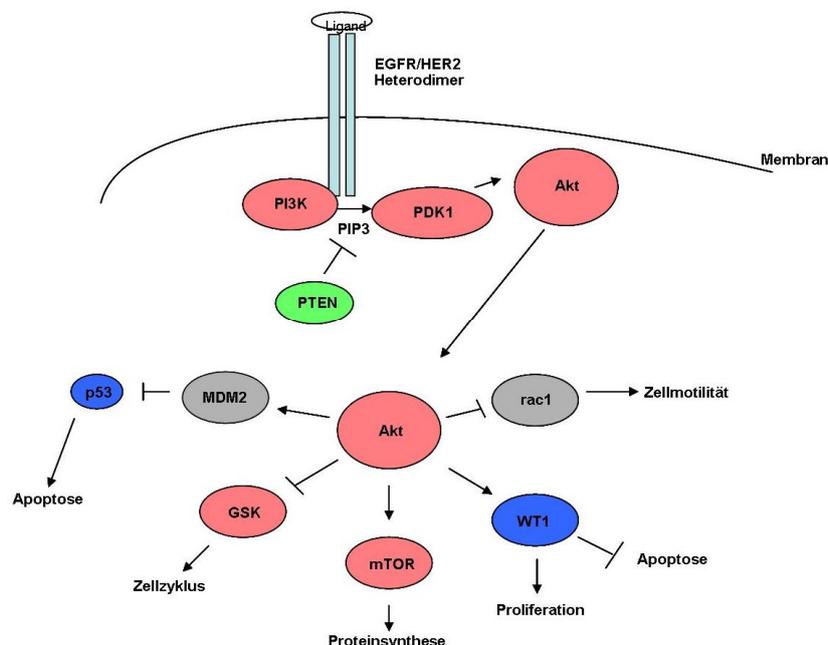


Abb 6: Schematische Darstellung des PI3K/Akt Signalweges und seine EGF Rezeptor abhängige Aktivierung

Schema modifiziert aus Cell Signaling Technology® Katalog 2007-08

3.3 Der Mitogen aktivierte Protein (MAP)-Kinase Signalweg

Auch der MAPKinase Signalweg spielt in der EGF Rezeptor vermittelten Signaltransduktion eine erhebliche Rolle. Über ihn werden u. a. Zellproliferation und Migrationsprozesse gesteuert (Mawrin et al., 2003). Es existieren 3 Unterklassen an MAPKinasen: Erk1/2 (extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen), p38 MAPK und SAPK/JNK (Stress-aktivierte /c-Jun N-terminale Proteinkinasen). Die Spezifität der MAPK Interaktionen und die Art der Effektormoleküle hängen stark davon ab, welche MAPK Subtypen stimuliert wurden. So werden Erk 1/2 v. a. von Wachstumsfaktoren aktiviert und modulieren Differenzierung und Zellwachstum, während p38 MAPK und JNKs in Stresssituationen aktiviert werden und an Prozessen wie Anti-Apoptose, Apoptose oder Zytokinproduktion beteiligt sind (Abb 7) (Lowes et al., 2002; Pearson et al., 2001).

Nach Aktivierung der EGF Rezeptor Tyrosinkinase kommt es zur Rekrutierung von Grb2 direkt an die Phosphorylierungsstellen Y1068 und Y1086 des EGF Rezeptors (Batzer et al., 1994). Alternativ kann die Rekrutierung von Grb2 an die Tyrosinreste des Rezeptors indirekt über Shc erfolgen (Sasaoka et al., 1994). Grb2 bindet dann an Sos und dieser Komplex wird an die Plasmamembran transloziert, wo Sos in der Lage ist, Ras zu aktivieren. Ras aktiviert die Kinase Raf-1, was wiederum über mehrere dazwischen liegende Kinasen zur Phosphorylierung von Erk1/2 führt, die dann in der Lage sind, die Phosphorylierung nukleärer Transkriptionsfaktoren zu katalysieren (Jorissen et al., 2003). Im Glioblastom ist der MAPKinase Signalweg u. a. für Proliferation verantwortlich und die EGF Rezeptor induzierte Aktivierung der Kaskade ist für die Tumorprogression *in vivo* mitverantwortlich (Mawrin et al., 2003).

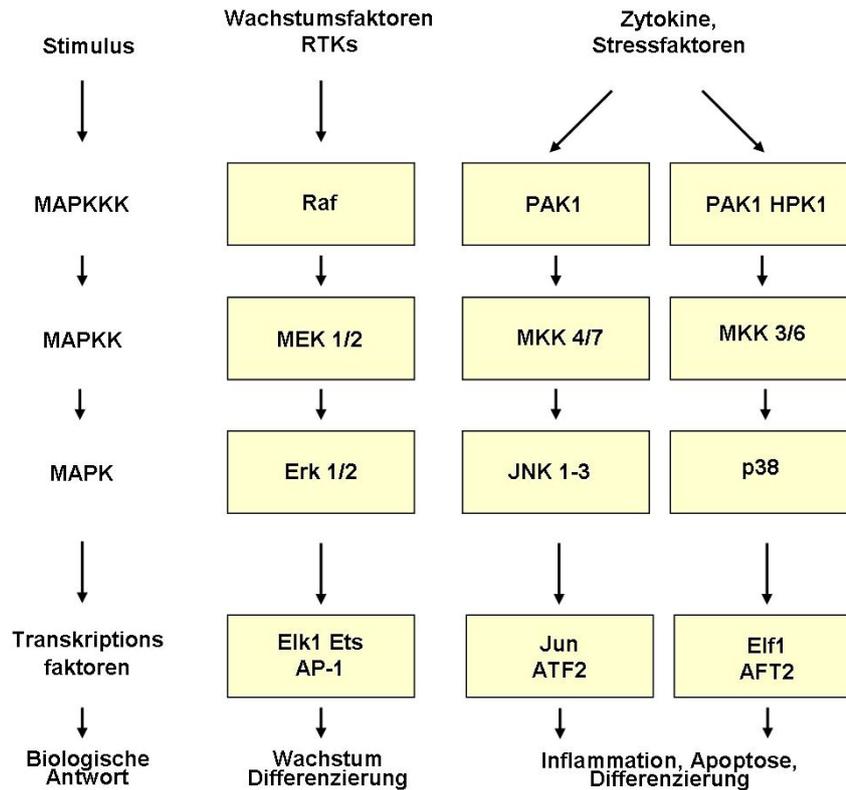


Abb 7: Schema der MAPKinasen Signalkaskaden
 Erklärung siehe Text; modifiziert nach Pearson et al. 2001.

4. Zelladhäsionsmoleküle

Unter Zelladhäsion versteht die Zellbiologie die Kontakte zwischen Zellen oder mit einer extrazellulären Matrix (EZM). Diese können in einem Gewebe vorliegen oder in einem Aggregationsverband. Die Zelladhäsionsmoleküle können in verschiedene Klassen eingeteilt werden, u. a. gehören dazu die Cadherine, Integrine und die Immunglobulin-ähnlichen Zelladhäsionsmoleküle (Ig-CAMs). Diese interagieren und modulieren verschiedene Signalwege; umgekehrt können Signalmoleküle die Adhäsionsmoleküle beeinflussen, was zu Veränderungen in Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen führen kann (Cavallaro and Christofori, 2004). Tumorprogression, Migration und Invasion in umliegendes Gewebe können so durch Reorganisation des Zytoskelettes und durch den Auf- und Abbau von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten stattfinden (Perego et al., 2002). Verlust von epithelalem (E)-Cadherin, Zunahme an mesenchymalem Cadherin oder Veränderungen der Ig-CAM Expression kennzeichnen die Progression vieler Tumorerkrankungen (Cavallaro and Christofori, 2004).

4.1 Cadherine

Interzelluläre Adhäsion wird in Vertebratenzellen vorwiegend durch drei unterschiedliche Typen von Zell-Zell-Kontakten vermittelt: *tight junctions* (TJs), *adherens junctions* (AJs) und Desmosomen. Cadherine sind die Hauptkomponenten von AJs und Desmosomen und lagern sich in den meisten Geweben an Zell-Zell-Kontakten an (Perez-Moreno et al., 2003). Die Cadherin Superfamilie besteht aus den klassischen (Typ I), den atypischen (Typ II) und den Proto-Cadherinen. Sie sind involviert in eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie Adhäsion, Morphogenese, Zytoskelettorganisation und Migration. Da v. a. die klassischen Cadherine in die Tumorprogression involviert sind, wird im Folgenden nur noch auf diesen Typ eingegangen (Angst et al., 2001; Cavallaro et al., 2006).

Dabei handelt es sich um Ca^{2+} -abhängige Glykoproteine, die aus einem extrazellulären Anteil, der die Ca^{2+} -abhängigen Interaktionen zwischen den Cadherinmolekülen vermittelt, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne bestehen (Abb 8). Der extrazelluläre Anteil der klassischen Cadherine ist bei allen Vertretern gleich aufgebaut und besteht aus fünf identischen Domänen (EC1-EC5). Der zytoplasmatische Anteil der Cadherinmoleküle ist hoch konserviert und interagiert u. a. mit Mitgliedern der Catenin Familie (α -, β - oder γ -Catenin) (Angst et al., 2001).

E-Cadherin (epithelial) und N-Cadherin (neuronal) sind die am besten charakterisierten Vertreter der klassischen Typ I Cadherine, die Zelladhäsion vermitteln. E-Cadherin spielt eine große Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung vieler epithelialer Tumoren. Dabei kommt es zur Suppression des E-Cadherin durch z. B. Inaktivierung durch Genmutation, Hypermethylierung des Promotors oder Repression des Transkriptionsfaktors Snail, und damit zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten und verstärkter Tumorzell Migration (Birchmeier and Behrens, 1994; Van Aken et al., 2001). Es existieren auch Untersuchungen der E-Cadherin Expression in hirneigenen Tumoren, wobei speziell im Meningeom, E-Cadherin Expression nachgewiesen werden konnte (Schwechheimer et al., 1998). In astrozytären Tumoren scheint E-Cadherin jedoch keine Rolle zu spielen (Asano et al., 2000; Utsuki et al., 2002).

N-Cadherin, ein weiterer Vertreter der klassischen Cadherine spielt eine große Rolle bei der Migration von Zellen während der Embryogenese und wird u. a. auch in glialen Tumorzellen exprimiert. Seine Rolle in der Tumorigenese maligner Gliome ist jedoch weitgehend ungeklärt, nicht zuletzt weil die Funktion des N-Cadherins kontrovers diskutiert wird. Es kann je nach Zelltyp und -kontext und sowohl Migration und Invasion, als auch Adhäsion vermitteln (Barami et al., 2006; Derycke and Bracke, 2004; Fedor-Chaikin et al., 2003; Kashima et al., 2003).

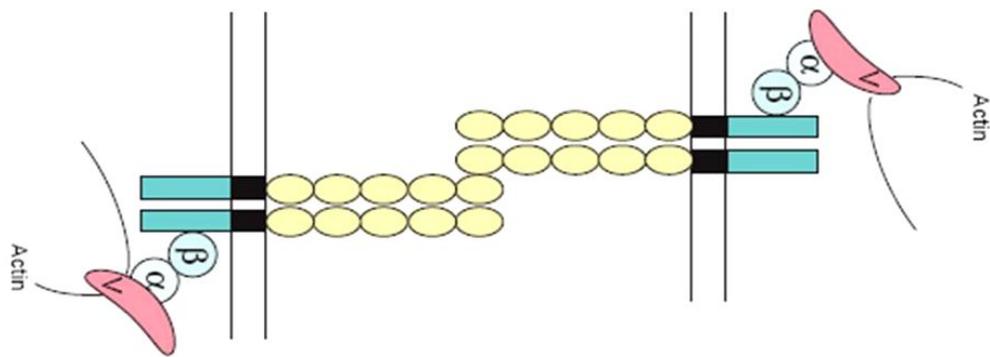


Abb 8: Schema klassischer Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Adhäsion

Klassische Cadherine bilden laterale Homodimere, die mit Homodimeren benachbarter Zellen über EC1 interagieren. Intrazellulär binden zytoplasmatische Moleküle wie α - oder β -Catenin sowie Vinculin und bilden die Vernetzung zum Aktin Zytoskelett. Nach Angst et al. 2001.

Dies setzt eine Interaktion mit Signalmolekülen voraus. Als direkter Bindepartner des N-Cadherins wurde u. a. der *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) identifiziert, der in Neuronen zusammen mit N-Cadherin, axonales Wachstum und Synapsenbildung induziert. Funktionelle Interaktionen sind außerdem mit PI3K oder der Src Kinase möglich und es kann zu einer Aktivierung der FAK durch N-Cadherin kommen (Cavallaro and Christofori, 2004; Van Aken et al., 2003). β -Catenin ist ein weiterer Interaktionspartner, der durch Phosphorylierung in die Regulation der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion involviert ist.

Weiterhin scheint N-Cadherin mit Angiogenese in Zusammenhang zu stehen: erhöhte N-Cadherin Expression führt demnach zu Hypervaskularisation in nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Nakashima et al., 2003).

4.2 Integrine

Integrine sind eine große Familie von Membranproteinen, die in Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen involviert sind (Hynes, 1992). Die Integrin Familie besteht aus mehr als 20 Glycoproteinen, die nicht kovalent assoziiert sind und Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, bilden. Dabei sind etwa 20 verschiedene Kombinationen aus 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten möglich. Die meisten Integrin Heterodimere binden verschiedenste EZM Moleküle, wie Collagen, Fibronectin oder Laminin, wobei die Spezifität von der Kombination der Untereinheiten abhängt. Während manche Integrine nur bestimmte Liganden erkennen können, z. B. kann $\alpha_5\beta_1$ nur als Rezeptor für Fibronectin dienen, können die meisten Integrine mehrere Liganden binden, z. B. $\alpha_V\beta_3$. Integrin vermittelte Zell-Matrix Interaktionen sind essentiell für Proliferation,

Entwicklung, Adhäsion, Differenzierung, Migration und viele weitere Prozesse, so auch Tumorprogression und Metastasierung (Brakebusch and Fassler, 2003; Watt, 2002). Nach erfolgter Ligandenbindung werden Signale von den Integrinen ins Zellinnere weitergeleitet und biologische Antworten ausgelöst. Intrazellulär kann eine Vielzahl von Signalmolekülen an die Integrine binden, so z. B. MAPK, Akt, die Familie der kleinen Rho-GTPasen (Rho, Rac und Cdc42), PI3K und diverse Proteinkinasen wie FAK, Paxillin und Src Kinasen (Rosales et al., 1995). Über das Adaptorprotein Nck2 können die Integrine mit dem EGF Rezeptor und anderen RTKs interagieren (Abb 9) (Hehlhans et al., 2007). Auch im Glioblastom spielt die Expression und Signaltransduktion bestimmter Integrine eine Rolle. Sie haben Anteil am hoch malignen Phänotyp dieser Tumorerkrankung, so an Migration, Invasion, Angiogenese und Chemoresistenz. Verschiedene β_1 Integrine sind dabei für Migration und Invasion verantwortlich und $\alpha_v\beta_3$ Integrin für Angiogenese und Anti-Apoptose (Demuth and Berens, 2004; Uhm et al., 1999).

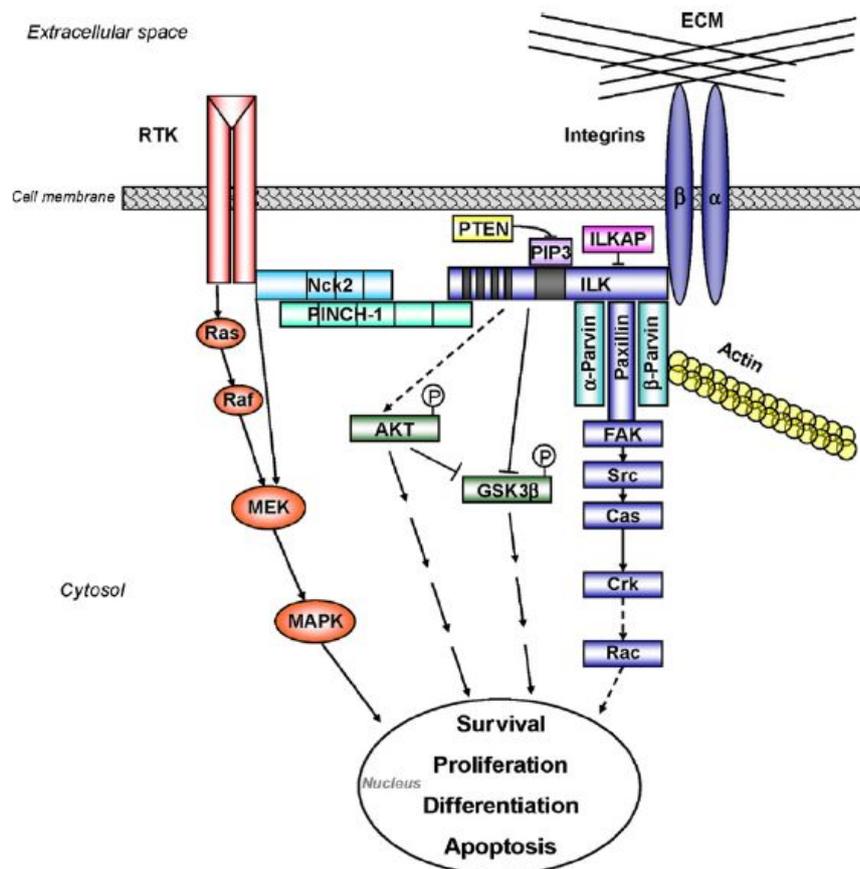


Abb 9: Schema des Integrin-RTK-Aktin-Netzwerks nach Hehlhans et al. 2007

Ein wichtiges Struktur- und Signalprotein ist ILK (*integrin-linked kinase*). ILK bindet Integrine, PINCH-1, α -, β - und γ -Parvin, Paxillin und PIP₃. ILK verbindet Integrine mit RTKs über PINCH-1 und Nck2, sowie die EZM mit dem Aktinskelett über die Parvine. Die ILK Kinaseaktivität ist PI3K abhängig und in der Lage, sowohl Akt zu aktivieren, als auch GSK3 β mittels Phosphorylierung zu inhibieren. ILK Kinaseaktivität wird u. a. durch PTEN inhibiert.

5. Zielsetzung

In über 40 % aller primären Glioblastome ist das *EGFR*-Gen amplifiziert, häufig auch in Kombination mit strukturellen Abberationen des Rezeptors, z. B. EGFR vIII (Ekstrand et al., 1994; Schlegel et al., 1994a). Die tumorbiologische Bedeutung dieses Charakteristikums konnte jedoch bis heute nicht geklärt werden.

Außerdem wird für das Glioblastom ein Zusammenhang von HER2 Expression mit schlechter Prognose und erhöhter Mortalitätsrate angenommen (Koka et al., 2003; Mineo et al., 2007; Potti et al., 2004).

Bisherige Vorarbeiten deuten darauf hin, dass die HER2 Expression in humanen Gliomen tumorbiologisch hoch relevant ist und einen interessanten neuen Ansatz für die Therapie maligner Hirntumoren bietet. Für ein tiefergehendes Verständnis des Migrationsverhaltens glialer Tumorzellen und zur Optimierung einer spezifischen molekularen Therapie ist die genaue Kenntnis der Wechselwirkungen der Rezeptoren der EGF Rezeptor Familie in Gliomen wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle heterodimerer Signalkomplexe der EGF Rezeptor Familie (EGFR/HER2) auf das Migrationsverhalten maligner glialer Tumorzellen untersucht werden. Dabei sollte u. a. die Bedeutung der Kompartimentalisierung der Signaltransduktion charakterisiert werden.

Für die Untersuchungen sollte die etablierte Glioblastomzelllinie LN18, die den EGF Rezeptor stark überexprimiert, mit unterschiedlichen HER2 Rezeptorkonstrukten stabil transfiziert werden. Die Konstrukte beinhalten neben dem wildtyp HER2N Rezeptor, eine konstitutiv-aktivierte HER2VE Mutante und eine dominant-negative HER2VEKA Rezeptorvariante. Diese dienen als Instrument, um die EGF Rezeptor vermittelte Signaltransduktion in HER2 abhängiger Weise zu modulieren.

Zunächst sollten die Internalisierung und der endosomale Transport der verschiedenen aktivierten und inaktivierten Signalkomplexe erfasst und der Einfluss dessen auf die unterschiedlichen Signalwege näher untersucht werden.

Weiterhin sollten die Auswirkungen der HER2 Rezeptor Expression auf das biologische Verhalten, insbesondere die Motilität glialer Tumorzellen untersucht und die ursächlichen Moleküle identifiziert und innerhalb der Signalweiterleitung eingeordnet werden.

B. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte und Laborausstattung

Bakterienschüttler Certomat®	B. Braun, Melsungen
Brutschrank	Memmert, Schwabach
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, München
Eagle Eye™ II	Stratagene, Heidelberg
Gelkammern, horizontal	Biorad, München
Gelkammern, vertikal	Biorad, München
Genetic Analyzer 3130	Applied Biosystems, Weiterstadt
Magnetrührer/Heizplatte	IKA-Labortechnik, Staufen
Minishaker MS1	IKA-Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge 5471R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma, Deisenhofen
Orbital Shaker IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik Staufen
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	Konica Minolta, Unterföhring
Schüttler	Heidolph, Kelheim
Semidry Blotapparat	Biorad, München
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus, München
Thermocycler AB 2720	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
UV/Vis Spektrophotometer DU® 530	Beckmann, München
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Gesellschaft f. Labortechnik, Burgwedel
Zeiss ApoTome konfokales Epifluoreszenz- mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Zeiss Axioplan 2	Carl Zeiss, Jena
Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Zeiss Axiovert 135 Konfokales Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Zellzählgerät CASY® 1	Schärfe System, Reutlingen

1.2 Verbrauchsmaterial

Aqua Ad Iniectabilia	B. Braun, Melsungen
Blotting Papier	Sartorius, Göttingen
ChamberSlide™ 8-well, Lab-Tek® II	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Deckgläser	Schubert und Weiss, München
Einmalspritzen 2ml	B. Braun, Melsungen
Einmalspritzennadel 19Gx2"	B. Braun, Melsungen
Hyperfilm™ ECL™	GE Healthcare, München
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Kryo-Röhrchen (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Microcon Filter, 30	Millipore, Schwalbach
Mikrotiterplatten 96-well	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Petrischalen (Bakteriologie)	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
PVDF Immobilon-P Membran 0,45 µm	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter steril, 0,2 µm	Schubert und Weiss, München
Zellkulturplatten 6-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten 12-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten 24-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 6, 10, 15 cm Ø	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

1.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton p.a.	Roth, Karlsruhe
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Amino-n-caprioic-acid	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Antikörperverdünnungslösung	Dako, Hamburg
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
ATP	Invitrogen, Karlsruhe
Biorad Protein Assay	Biorad, München
Bromphenol Blue	Sigma, Deisenhofen
Bromphenol Blue-Xylene Cyanol Dye	Sigma, Deisenhofen
BSA Proteinstandard	Biorad, München
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Citronensäure Monohydrat	Roth, Karlsruhe
DAPI (0,1mg/ml)	Roche, Mannheim
DTT	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd, säurefrei	Roth, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck Biosciences, Darmstadt
Goatserum	Dako, Hamburg
Isopropanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Merck Biosciences, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck Biosciences, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Qiagen, Hilden
Methanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxyd	Roth, Karlsruhe
PCR Buffer 10fach	Qiagen, Hilden
Pertex® Eindeckmedium	Mediate, Burgdorf
PMSF	Sigma, Deisenhofen
RNAse Away®	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 2M	Roth, Karlsruhe
SDS 20 %	Roth, Karlsruhe
TBE Puffer 10fach	Biorad, München
TEMED	Biorad, München

Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm
Tween [®] 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth, Karlsruhe
VectaShield [®] Eindeckmedium	Linaris, Wertheim
Xylol	Hedinger, Stuttgart

1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme, Endonukleasen	Roche, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Amersham, Braunschweig

1.5 Kommerzielle Kits und Größenstandards

REAL [™] Detection System Peroxidase/DAB+	Dako, Hamburg
ECL Western Blot Reagenzien	Millipore, Schwalbach
Molekulargewichtsmarker (DNA) 1kb	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker (DNA) 100bp	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Molekulargewichtsmarker (Protein) Page Ruler [™]	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick, Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Plasmid-Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Miniprep Kit	SeqLab, Göttingen

1.6 Puffer und Lösungen

Blockierungspuffer	5 % Magermilchpulver in TBST
Citratpuffer pH 6,0	2,1 g Citronensäuremonohydrat, pH 6,0 mit NaOH einstellen; ad 1000 ml H ₂ O
Minipräp Lösung I	50 mM Glucose; 25 mM TrisHCl, pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; ad 100 ml H ₂ O
Minipräp Lösung II	0,2 N NaOH, 1 % SDS; Frisch ansetzen
Minipräp Lösung III	60 ml 5M Kaliumacetat; 11,5 ml Eisessig; ad 100 ml H ₂ O
5x SDS Protein-Ladepuffer	312,5 mM Tris-Cl pH 6,8; 10 % SDS; 50 % Glycerol; 250 mM DTT; 0,05 % Bromphenol-Blue; ad 10 ml H ₂ O
10x SDS Proteingel-Laufpuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS; ad 1000 ml H ₂ O
10x TBS Puffer	24,2 g Tris; 80 g NaCl; pH 7,6 mit Essigsäure einstellen; ad 1000 ml H ₂ O

TBST Waschpuffer		1x TBS Puffer; 0,1 % Tween 20
Transferpuffer	Anode I Anode II Kathode	300 mM Tris, 20 % Methanol; ad 500 ml H ₂ O 25 mM Tris; 20 % Methanol; ad 500 ml H ₂ O 25 mM Tris; 20 % Methanol; 40 mM amino-n-caprioic-acid; ad 500 ml H ₂ O
10x Tris-Puffer pH 7,6		60,5 g Tris-Base, 90 g NaCl, pH 7,6 mit HCl einstellen ad 1000 ml H ₂ O
TE-Puffer (1x)		1 ml Tris HCl (pH 8,0); 200 µl 0,5 M EDTA; ad 1000 ml H ₂ O

1.7 Medien und Reagenzien

1.7.1 Eukaryotische Zellkultur

Glioblastomzelllinien	LN18 LN229 G139	Dr. E. Van Meir, Lausanne, Schweiz Dr. E. Van Meir, Lausanne, Schweiz Neurochirurgie, Universität Heidelberg
Accutase		PAA, Pasching (A)
AEE788		Novartis, Frankfurt
Collagen Typ I (rat tail)		Sigma, Deisenhofen
EGF (human, rekombinant)		Millipore, Schwalbach
Dulbecco´s MEM mit Glutamax, 4500 mg/l		Invitrogen, Karlsruhe
Glucose		
Dulbecco´s PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 1x		PAA, Pasching (A)
FCS		Biochrom, Berlin
G418-BC		Biochrom, Berlin
Gelatine		Sigma, Deisenhofen
HiPerFect Transfektionsreagenz		Qiagen, Hilden
L-Glutamin		Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectin® Reagent		Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM Medium		Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin		Invitrogen, Karlsruhe
Rapamycin		Merck Biosciences, Darmstadt
siRNA N-Cadherin		Qiagen, Hilden
Tyrphostin AG1478		Sigma, Deisenhofen
Tyrphostin AG825		Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA 0,5 %		Invitrogen, Karlsruhe
Zell-Lysepuffer 10fach		New England Biolabs (NEB), Frankfurt

1.7.2 Bakteriologie

<i>E. coli</i> DH-5α	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Biochrom, Berlin
Hefeextrakt	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin	Biochrom, Berlin
Pepton	Invitrogen, Karlsruhe
Agar	Invitrogen, Karlsruhe

1.8 Vektoren und Plasmide

pEGFP-N2 Vektor	Clontech, Heidelberg
pSV2-erbB2N	Messerle et al., 1994
pSV-erbB2VE	Messerle et al., 1994
pSV2-erbB2VEKA	Messerle et al., 1994

1.9 Antikörper

Im Folgenden werden die Bezeichnungen mAK bzw. pAK für monoklonaler bzw. polyklonaler Antikörper, sowie WB als Abkürzung für Western Blot und IF bzw. IHC für Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie herangezogen.

Tabelle 2: Liste aller verwendeten Antikörper mit Angabe der jeweiligen Verdünnung

Antikörper	Verdünnung	Katalognummer	Firma
pAK Kaninchen-Anti-Akt	1:5000 WB	#9272	NEB, Frankfurt
pAK Kaninchen-Anti-pAkt (Ser473)	1:5000 WB	#9271	NEB, Frankfurt
mAK Maus-Anti- β -Catenin	1:5000 WB	#610154	BD Transduction Laboratories, Kentucky, USA
pAK Kaninchen-Anti-p β -Catenin (Thr41/Ser45)	1:1000 WB	#9565	NEB, Frankfurt
mAK Maus-Anti-E-Cadherin (AEC)	1:5000 WB	#610182	BD Transduction Laboratories, Kentucky, USA
mAK Maus-Anti-E-Cadherin (HECD)	1:250 IF	#13-1700	Invitrogen, Karlsruhe
pAK Kaninchen-Anti-EGFR	1:2500 WB	sc-03	Santa Cruz, CA, USA
pAK Kaninchen-Anti-pEGFR (Y1086)	1:2500 WB 1:150 IF	#36-9700	Invitrogen, Karlsruhe
pAK Kaninchen-Anti-erbB2	1:2500 WB 1:400 IF	#A 0485	Dako, Hamburg
pAK Kaninchen-Anti-perbB2 (Y1248)	1:1000 WB	#2244	NEB, Frankfurt
pAK Kaninchen-Anti-FAK	1:2000 WB	sc-558	Santa Cruz, CA, USA
mAK Maus-Anti-pFAK (Y397)	1:5000 WB	#611722	BD Transduction Laboratories, Kentucky, USA

mAK Maus-Anti-Integrin β 1	1:20000 WB	#610467	BD Transduction Laboratories, Kentucky, USA
mAK Maus-Anti-Integrin β 3	1:5000 WB	#611140	BD Transduction Laboratories, Kentucky, USA
mAK Maus-Anti-Integrin β 4	1:500 WB	#611232	BD Transduction Laboratories, Kentucky, USA
mAK Maus-Anti-Fibronectin	1:10000 WB	#610077	BD Transduction Laboratories, Kentucky, USA
pAK Kaninchen-Anti-p44/42 MAPK	1:5000 WB	#9102	NEB, Frankfurt
mAK Kaninchen-Anti-p-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	1:5000 WB	#4376	NEB, Frankfurt
mAK Maus-Anti-N-Cadherin	1:10000 WB 1:1000 IF, IHC	#610920	BD Transduction Laboratories, Kentucky, USA
pAK Kaninchen-Anti-pPaxillin (Y118)	1:2000 WB	#2541	NEB, Frankfurt
pAK Kaninchen-Anti-PTEN	1:5000 WB	#9552	NEB, Frankfurt
mAK Maus-Anti-Rab5	1:2000 WB 1:50 IF	#610724	BD Transduction Laboratories, Kentucky, USA
mAK Maus-Anti- α -Tubulin	1:500000 WB	T 9026	Sigma, Deisenhofen
Ziege-Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	1:10000 WB	#7076	NEB, Frankfurt
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	1:10000 WB	#7074	NEB, Frankfurt
Ziege-Anti-Maus IgG, Cy TM 3-gekoppelt	1:100 IF	#81-6515	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, FITC-gekoppelt	1:100 IF	#81-6111	Invitrogen, Karlsruhe

1.10 Oligonukleotide

Sequenzier-Primer für pEGFP-N2-erbB2N, VE und VEKA jeweils in 5´- 3´ Orientierung:

pEGFP-N2fwd	TGGATAGCGGTTTGACTCACG	Position 397
pEGFP-N2rev	GTGGTGCAGATGAACTTCAGG	Position 834

2. Methoden

2.1 Klonierung der HER2 Rezeptor Konstrukte

Um den Einfluss von HER2 auf die Tumorentstehung und – progression des Glioblastoms untersuchen zu können, wurden verschiedene HER2-Rezeptor-Mutanten in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert und anschließend in die Glioblastomzelllinie LN18 stabil transfiziert.

Es sollten der Wildtyp-Rezeptor (HER2N), eine konstitutiv aktivierte HER2-Variante (HER2VE) und eine dominant-negative HER2-Mutante (HER2VEKA) (Abb 10) in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N2 kloniert werden.

Alle HER2-Formen lagen ursprünglich im pSV2-Vektor über die Restriktionsschnittstelle HindIII kloniert vor.

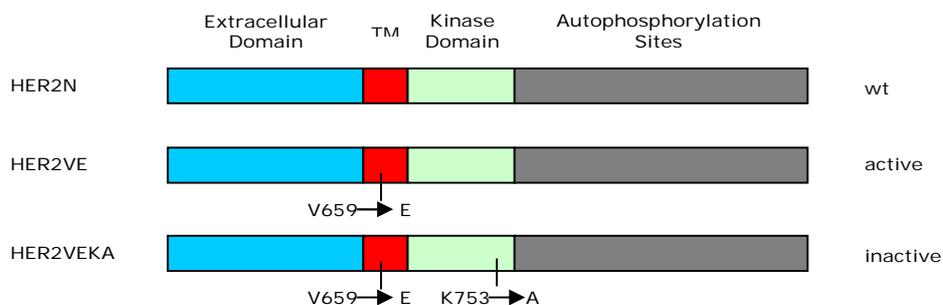


Abb 10: Schematische Darstellung der verschiedenen HER2 Konstrukte

HER2N beschreibt den Wildtyp Rezeptor, HER2VE eine konstitutiv aktive Variante, die durch eine Punktmutation in der Transmembran (TM) Domäne, von Valin an Position 659 zu Glutamin, generiert wurde. HER2VEKA ist ein dominant-negativer HER2-Rezeptor, der durch eine zusätzliche Punktmutation in der ATP-Bindestelle der Kinasedomäne, von Lysin an Position 753 zu Alanin, kloniert wurde (Messerle et al., 1994).

Klonierungsdurchführung:

1. Restriktion mit HindIII:

10 µg des Akzeptorvektors pEGFP-N2 wurden mit HindIII 1h bei 37°C linearisiert.

Die HER2-Varianten wurden aus pSV2 ebenfalls durch Verdau mit HindIII herausgeschnitten. Da sowohl das Insert, als auch das Plasmid in diesem Fall ca 4,2 kb groß wären, wurde zusätzlich mit PvuI verdaut, wodurch aus pSV2 zwei weitere Fragmente von je ca. 2,1 kb entstanden, was die Unterscheidung der einzelnen Banden im präparativen Agarosegel erleichterte.

Restriktionsansätze:

10x Puffer B	8 µl
HindIII [10u/µl]	2 µl
Plasmid-DNA	10 µg
ad 80 µl H ₂ O bidest.	

Die Restriktionsansätze wurden anschließend auf einem 1%-igen präparativen Agarosegel aufgetrennt, die jeweiligen Banden unter UV Licht ausgeschnitten und mittels QIAquick Gelextraktionskit aufgereinigt und in 35 µl Volumen nach Herstellerangaben eluiert.

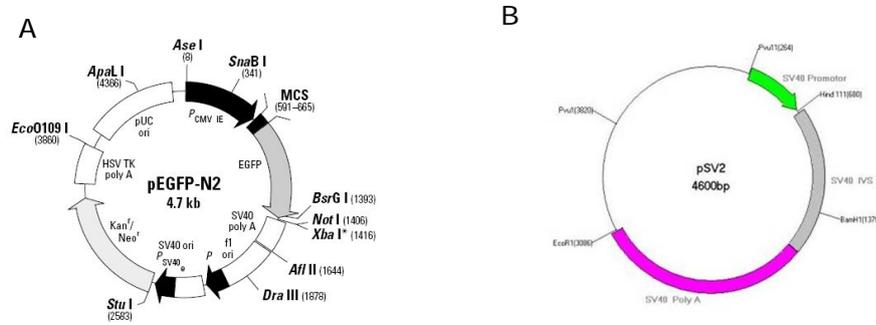


Abb 11: Verwendete Plasmide für die Umklonierung der verschiedenen HER2-Konstrukte (A) Akzeptorvektor, der mit HindIII linearisiert wurde. (B) Donorvektor, der die HER2-Inserts über die HindIII-site enthält und mit HindIII und PvuII verdaut wurde.

2. Dephosphorylierung:

50 ng des linearisierten und gereinigten pEGFP-N2 Plasmids wurden mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) der Firma Roche für 10 min bei 37°C dephosphoryliert und das Enzym anschließend bei 65°C für 15 min deaktiviert. Diese Behandlung verhindert eine Religation des Vektors ohne Insert.

Dephosphorylierungsansatz:

10x Puffer	1 µl
SAP [1 u/µl]	1 µl
Plasmid-DNA	50 ng
ad 10 µl H ₂ O bidest	

3. Ligation:

Der dephosphorylierte pEGFP-N2 Vektor wurde mit den unterschiedlichen HER2-Inserts in jeweils einem Standard-Ligationsansatz bei 4°C über Nacht ligiert. Um das Verhältnis von Plasmid-DNA zu Insert-DNA für eine optimale Ligationseffizienz zu berechnen, wurde folgende Formel verwendet:

$$[(\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}) : \text{kb Vektor}] \times 5 = \text{ng Insert}$$

Ligationsansatz:

Plasmid-DNA	50 ng	(aus Dephospho-Ansatz)
Insert	x ng	(nach Formel s. o.)
ATP [100mM]	1 µl	
5x Puffer	4 µl	
T4-Ligase	1 µl	
ad 20 µl H ₂ O bidest		

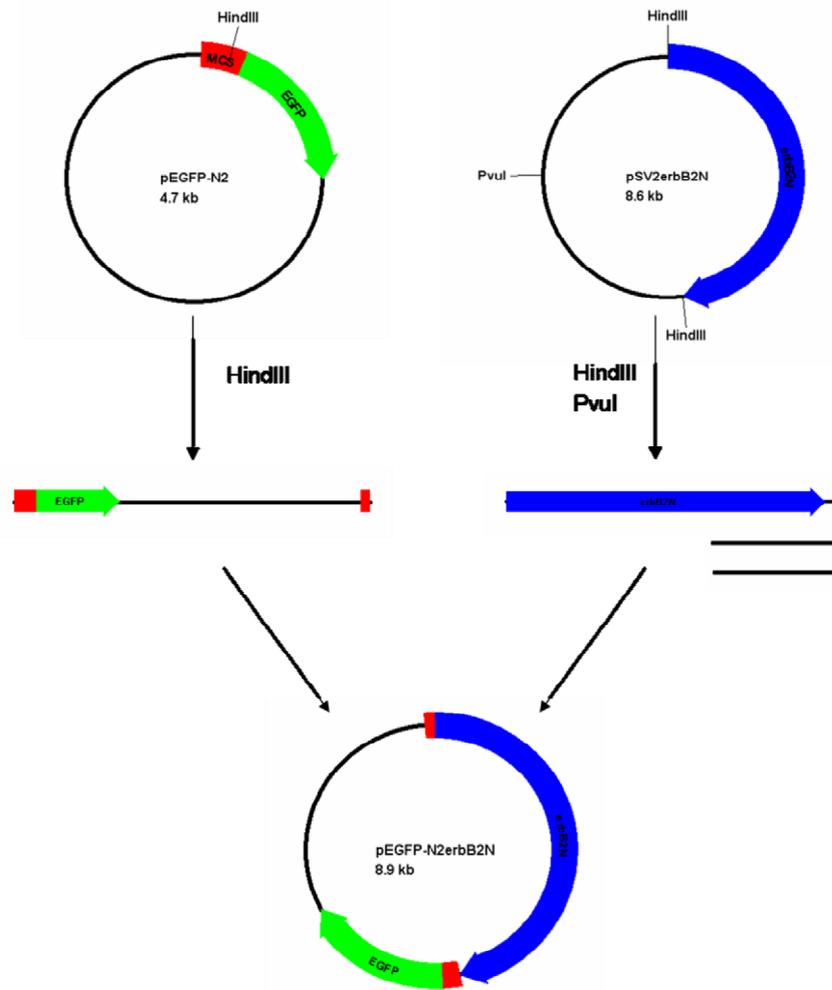


Abb 12: Schematische Darstellung der angewendeten Klonierungsstrategie

Herstellung der verschiedenen HER2-Konstrukte pEGFP-N2erbB2N, pEGFP-N2erbB2VE und pEGFP-N2erbB2VEKA

4. Transformation kompetenter Bakterien:

Chemisch-kompetente *E. coli* Bakterien (Calciumchlorid-Methode) wurden für die Transformation verwendet. Dabei wurden 200 µl Bakterien mit 20 µl Ligationsansatz versetzt und auf Eis 10 min inkubiert. Das Gemisch wurde dann im Wasserbad bei 42°C für 2 min einem Hitzeschock unterzogen, wobei die Plasmid-DNA von den Bakterien aufgenommen werden kann. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde die Kultur bei 37°C für 1 h geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf einer kanamycinhaltigen Agarplatte ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden gewachsene Kolonien gepickt und in 3 ml kanamycinhaltigem LB-Medium bei 37°C über Nacht vermehrt.

2.2 Plasmidaufreinigung (Mini-Präp) aus *E. coli*

Mittels dieser Methode wird extrachromosomale Plasmid-DNA aus Bakterien gewonnen, um positive Klone, die das Plasmid mit gewünschtem Insert enthalten, identifizieren zu können. Dabei wurde ein Kit der Firma SeqLab verwendet, dem die alkalische Lyse nach Birnboim (1979) zugrunde liegt.

1,5 ml der gepickten Übernachtskultur wurden bei 10 000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Zellpellet wurde mit 100 µl RNase-haltigem Resuspensionspuffer (Lösung I) versetzt und gut resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer (Lösung II) wurde das Reaktionsgefäß sanft über Kopf geschwenkt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit 150 µl Neutralisierungspuffer (Lösung III) einmal sanft über Kopf geschwenkt und weitere 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14 000 rpm für 30 min wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 2 Volumen absoluten Ethanol versetzt um die DNA zu präzipitieren. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14 000 rpm für 30 min. Das entstandene Pellet wurde dann mit 1 ml 70 %-igem Ethanol zum Waschen versetzt und 5 min bei RT inkubiert, bevor erneut bei 14 000 rpm für 5 min abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert, das Pellet an der Luft getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen. Die auf diese Weise isolierte Plasmid-DNA wurde dann direkt in einem Restriktionsverdau mit anschließender Agarose Gelelektrophorese überprüft.

Positive Bakterienklone wurden weitervermehrt, die Plasmid-DNA in größerem Maßstab (Midi-Präp) isoliert und bei -20°C verwahrt.

Die DNA-Konzentration wurde dann über eine OD-Messung im Photometer bei 260 nm und anschließende Berechnung durch folgende Formel bestimmt:

$$\text{Konzentration (dsDNA) } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

Aus dem Verhältnis der OD₂₆₀ und der OD₂₈₀ erhält man Aufschluß über den Reinheitsgrad der DNA. Eine proteinfreie Nucleinsäurelösung weist demnach ein Verhältnis von 1,8 - 2,0 auf.

Die richtige Orientierung der verschiedenen HER2-Varianten im pEGFP-N2 Vektor wurde mittels Sequenzierung der Basenabfolge im Genetic Analyzer von Applied Biosystems mit geeigneten Primern bestätigt.

2.3 Kultivierung und Konservierung eukaryotischer Zellen

Kultivierung:

Die verschiedenen, adhärenenten Glioblastomzelllinien LN18, LN229, G139 und die mit HER2N, HER2VE und HER2VEKA transfizierten LN18-Klone wurden bei 5 % CO₂, 95 % relativer Luftfeuchte und 37°C im Brutschrank in Dulbecco´s DMEM Vollmedium (DMEM, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (v/v) L-Glutamin, 10 % (v/v) FCS) in Gewebekulturschalen (Ø 10 cm) kultiviert und alle 3 Tage passagiert. Dabei wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1x mit 4 ml warmem PBS gewaschen und mit 0,5-1 ml Trypsin/EDTA für 5 min abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde mit frischem Vollmedium abgestoppt, die abgelösten Zellen vereinzelt und ein Teil davon in neue Zellkulturschalen überführt. Das Medium der transfizierten LN18-Klone enthielt zusätzlich 0,5 mg/ml G418-BC, um die Plasmide über die durch die Transfektion erworbene Resistenz in den Zellen zu halten. Die Überstände 3 Tage alter Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen mittels PCR auf Mycoplasmen untersucht.

Konservierung:

Von allen Zelllinien wurden Aliquots von 1 ml Zellsuspension in flüssigem Stickstoff konserviert. Hierfür wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % in Kulturschalen (Ø 10 cm) kultiviert, anschließend mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 310 g für 2 min abzentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde in 2 ml eiskaltem Einfriermedium (FCS, 10 % DMSO) aufgenommen und zu je 1 ml auf 2 Einfrieröhrchen verteilt. In zwei Schritten wurden die Zellen dann zunächst für 2 Tage in Isopropanol bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff bei ca. -180°C eingefroren.

2.4 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion der adhärenenten Glioblastomzelllinie LN18 erfolgte stabil per Lipotransfektion mit dem Transfektionsreagenz Lipofectin[®]. Dabei wurden die HER2N, HER2VE und HER2VEKA enthaltenen pEGFP-N2 Plasmide mittels Lipopolysacchariden von den Zellen endozytiert.

2 x 10⁵ Zellen wurden pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und nach 24 h Kultur in Vollmedium mit je 5 µg Plasmid-DNA transfiziert. Dafür wurden pro Ansatz 20 µl Lipofectin[®], 30 min mit OptiMEM inkubiert und anschließend mit 2,5 µg Plasmid-DNA zusammenpipettiert. Nach weiteren 15 min Inkubation wurde dieses Gemisch dann auf 2 ml mit OptiMEM aufgefüllt und auf die mit OptiMEM gewaschenen Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen für weitere 24 h in Vollmedium kultiviert. Dann erfolgte die Ablösung der LN18 Zellen mit Trypsin/EDTA und die

Überführung in eine Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Selektion positiver Klone mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum G418-BC (1 mg/ml) im Vollmedium. Nur die Zellen, die einen Vektor aufgenommen haben, besitzen eine Resistenz gegen G418 und können so im Medium überleben. Für die nächsten zwei Wochen erfolgte alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel, wobei die überlebenden Zellen Kolonien bildeten, die dann bei entsprechender Größe gepickt und als Einzelklone zunächst in 24-Well-Platten weiterkultiviert wurden. Zum Erhalt der Resistenz und der Plasmide in den Zellen, wurde ein steter Selektionsdruck mit nunmehr 0,5 mg/ml G418-BC erzeugt. Die Einzelklone wurden dann mittels Western Blot Analyse auf die Proteinexpression des eingebrachten Gens untersucht und geeignete Klone weiterkultiviert und als Stocks eingefroren.

2.5 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden je nach Fragestellung in Vollmedium, serumfreien Medium und mit bzw. ohne Stimulierung/Inhibierung (s. a. Tabelle 3) in Zellkulturschalen kultiviert.

Um Proteinlysate herzustellen, wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit eiskaltem PBS gewaschen und die Schalen anschließend auf Eis überführt. Nach Zugabe eines kommerziell erwerbbaaren Zell-Lysepuffers (+1mM PMSF als Proteaseinhibitor frisch zugefügt), wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und die erhaltenen Lysate in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 15 min bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Triton-lösliche Proteinfraction im Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Triton-unlösliche Fraction im Pellet wurde verworfen. Die Lysate wurden bei -20°C verwahrt.

Tabelle 3: Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Zytokine und Inhibitoren und die eingesetzten Konzentrationen

Zytokine/Inhibitoren	Stockkonzentration	Endkonzentration	Zielmolekül
EGF	100 µg/ml	100 ng/ml	EGFR
AG1478	1 mg/ml (3,2 mM)	10 µM	EGFR
AG825	2 mg/ml (5 mM)	1 µM	HER2
AEE788	1 mg/ml (10 mM)	5 µM	EGFR/HER2

2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Gesamtproteinkonzentration wird durch die Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine gemessen. Dabei wird die Zunahme an Blaufärbung und somit die Absorption bei 595 nm als Maß für die Proteinkonzentration angesehen.

Die Proteinlysate werden 1:10 mit PBS verdünnt und dann in einer Einmal-Küvette mit PBS, 0,01 % Triton X-100 und Biorad Reagenz (1:4 mit PBS verdünnt) vermischt. Die Messung erfolgte dann nach 5 min Inkubation bei RT in einem Spektralphotometer bei 595 nm. Anhand einer Kalibrationskurve, die mit BSA-Proteinstandards erstellt wurde, wurde die jeweilige Proteinmenge quantifiziert.

Ansatz:

Proteinlysate, 1:10	20 µl
PBS	180 µl
Triton X-100, 0,01 %	200 µl
Biorad Reagenz, 1:4	600 µl

2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen. Dabei wird die Bindungsfähigkeit der Proteine an das Detergenz SDS ausgenutzt. Das SDS führt zu einer negativen Ladung der Proteine, denaturiert sie und verhindert somit Protein-Protein Wechselwirkungen. Somit unterscheiden sich die Proteine nur noch in ihrer Größe und werden dementsprechend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurde das diskontinuierliche Lämmli-System verwendet, wobei ein Sammelgel (5 %, pH 6,8) ein Trenngel (10 % oder 12,5 %, pH 8,8) überschichtet. Das Trenngel wurde vertikal zwischen Glasplatten gegossen und mit H₂O überschichtet. Nach ca. 45 min Polymerisation wurde das Sammelgel darübergelassen und der Probenkamm eingeschoben. 5-10 µg Protein wurden mit 5 x Gelladepuffer bei 95°C für 5 min aufgekocht und anschließend kurz abzentrifugiert; die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 V für 1-2 h.

Tabelle 4: Trenn- und Sammelgelzusammensetzungen für SDS-PAGE

	Sammelgel	Trenngel	
	5 %	10 %	12,5 %
30 % Acrylamid	836 µl	1,33 ml	2,1 ml
1 M Tris/HCl pH6,8	626 µl	-	-
1 M Tris/HCl pH8,8	-	1 ml	1,87 ml
H ₂ O bidest.	3,5 ml	1,66 ml	1 ml
20 % SDS	25 µl	25 µl	25 µl
10 % APS	25 µl	25 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	25 µl

2.8 Western Blot Analyse

Die Proteine des SDS-Gels wurden dabei zunächst im Semi-dry Verfahren 1 h bei 225 mA elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Freie Proteinbindungsstellen der Membran wurden mit 5 % Magermilchpulver in TBST 1 h bei RT abgesättigt. Der jeweilige Primärantikörper wurde in TBST verdünnt und die Membran damit bei 4°C über Nacht unter schütteln inkubiert. Die Membran wurde anschließend 3 x 5 min mit TBST gewaschen und mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern, verdünnt in Blocklösung, bei RT 1 h inkubiert. Nach erneut dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation der Membran mit einem Chemilumineszenzsubstrat für die Peroxidase (ECL); die entstehende Lichtreaktion wurde über Röntgenfilm gemessen.

Strippen von Membranen:

Die auf den Membranen immobilisierten Proteine können mehrmals mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden. Dazu wurde die Membran mit Stripping-Lösung (80 % H₂O, 10 % Methanol, 10 % Eisessig) 2 x 10 min gewaschen und der gebundene Antikörper dadurch abgespült. Nach einem erneuten Blockierungsschritt konnte die Membran erneut mit einem Antikörper inkubiert werden.

2.9 Zellbiologische Assays

2.9.1 Woundhealing Assay

Dieser Test wird angewendet, um einen Überblick über die Migrationsfähigkeit von adhärennten Zellen zu bekommen. Dabei wurden die verschiedenen LN18 Klone (parental, HER2N, HER2VE und HER2VEKA) in einer 6-Well-Platte ausgesät und bis zu 70 % Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde der Zellrasen mit einer Pipettenspitze aufgekratzt (*Scratch*), so dass ein Spalt entstand. Der Zellrasen wurde dann mindestens 3 x mit PBS gewaschen, um abgelöste Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen und mit oder ohne Stimulierung/Inhibitorbehandlung (s. a. Tabelle 3) standardmäßig weiterkultiviert. Gleich nach dem Scratch, nach 24 und nach 48 h wurden Durchlichtaufnahmen des Spalts gemacht, wobei immer dieselbe Stelle der Kulturschale fotografiert wurde, um den Wundschluß dokumentieren zu können. Dazu wurde ein Zeiss Axiovert 135 Mikroskop mit digitaler Kamera verwendet. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Wundränder auf den Fotos nach initialem Scratch, nach 24 und 48 h. Die mittlere Distanz der Wundränder zum Zeitpunkt 0 und 48 h zueinander wurde in Prozent ausgedrückt.

2.9.2 RNA Interferenz

LN18 HER2VEKA Zellen (2×10^5) wurden kurz vor Transfektion in einer 12-Well-Platte in 1,1 ml Vollmedium ausgesät. Eine Mischung von 18 μ l HiPerFect Transfektionsreagenz und 200 ng short interference RNA (siRNA), in serumfreiem OptiMEM, wurde zusammenpipettiert und 10 min bei RT inkubiert. Die verwendete siRNA war gegen N-Cadherin (gene accession number NM_001792) gerichtet und kommerziell bei Qiagen zu erwerben (Bestellnummer 1603686). Das Gemisch wurde anschließend tropfenweise auf die Zellsuspension gegeben, leicht geschwenkt und zurück in den Brutschrank gestellt. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurden die Zellen für Proteinlysate geerntet und der knock-down der N-Cadherin Proteinexpression im Western Blot verifiziert. Die siRNA wurde nach identischem Transfektionsprotokoll außerdem in Woundhealing Assays eingesetzt.

2.10 Immunfluoreszenz

Diese Methode eignet sich um die Expression sowie die Lokalisation von Proteinen innerhalb der einzelnen Zelle gleichzeitig darzustellen. Dabei werden die jeweiligen Primärantikörper mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern im Fluoreszenzmikroskop detektiert.

3×10^4 Zellen wurden in 6-Well-Platten auf Deckgläschen in Vollmedium ausgesät. Die Zellen wurden je nach Fragestellung 2-3 Tage mit oder ohne Serum kultiviert und stimuliert oder inhibiert. Die Zellen wurden 2 x mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und anschließend mit 4 % Formaldehyd/PBS für 20 min bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) wurden die fixierten Zellen für 10 min bei RT mit 50 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl) versetzt um freie Aldehydgruppen abzusättigen. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen 5 min bei RT mit 0,25 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert und wieder 3 x gewaschen. Es folgte ein Blockierungsschritt mit 5 % Ziegen Serum in PBS für 30 min bei RT. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern (ca. 80 μ l Antikörperverdünnung pro Deckglas) bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen dann mit korrespondierenden Sekundärantikörpern, die entweder mit Cy3 oder FITC gekoppelt waren, bei RT 1 h lichtgeschützt inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift (3 x) und der Kernfärbung mit DAPI (1 μ g/ml) für 5 min wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger mit VectaShield überführt und somit eingedeckelt. Die OTs wurden bei -20°C verwahrt.

Die Präparate wurden unter einem Apotome Epifluoreszenzmikroskop begutachtet und repräsentative Ausschnitte photographiert. Dies erfolgte durch multidimensionale Aufnahme der verschiedenen Fluoreszenzkanäle. Die Bilder wurden mit der Software AxioVisionLE 4.5 bearbeitet.

2.11 Immunhistochemie

Es wurden ca. 2 µm dicke Gewebeschnitte aus FFPE (*formalin fixed paraffin embedded*) Tumormaterial hergestellt und auf Objektträger aufgezogen. Nach Trocknen über Nacht im Ofen bei 58°C wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Dabei wurden die Schnitte erst 3 x 10 min in Xylol entparaffiniert, und anschließend 2 x 5 min in Isopropanol, 5 min in 96 % Ethanol, 5 min in 70 % Ethanol und 5 min in H₂O bidest. rehydriert. Um eine ausreichende Antigenität der Proteine zu gewährleisten, müssen die Epitope demaskiert werden. Dies erfolgte durch Kochen der Schnitte in 10 mM Citrat-puffer pH 6,0 im Dampfkochtopf für 7 min. Anschließend wurden die Schnitte in 3 % H₂O₂ für 15 min im Dunkeln inkubiert um endogene Peroxidase zu quenchen und anschließend 3 x 2 min in Tris-Puffer pH 7,6 gewaschen. Nach 30 minütiger Blockierung der unspezifischen Proteinbindestellen mit 5 % Ziegen-serum folgte die Inkubation mit entsprechend verdünnten Primärantikörpern für 1 h bei RT in feuchter Kammer. Nach 3 x 2 min Waschen folgte die Inkubation mit biotinyliertem Sekundär- und Streptavidin-Peroxidase-Tertiär-Antikörper für jeweils 30 min mit anschließendem Waschen für 3 x 2 min.

Als Substrat für die Peroxidase wurde DAB-Chromogen zugegeben und nach 4 min mit Tris-Puffer abgespült und gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne und der Gewebehintergrund mit Haemalaun gegengefärbt und unter fließendem Wasser für 5 min differenziert. Abschließend erfolgte nach aufsteigender Alkoholreihe zu Dehydrierung, die Eindeckung mit Deckglas und Pertex Eindeckmedium.

C. Ergebnisse

I. HER2 moduliert die EGF Rezeptor Aktivierung und Signaltransduktion in LN18 Glioblastomzellen

EGF Rezeptor und HER2 Überexpression spielen bei der Entstehung und Progression vieler Tumorerkrankungen eine große Rolle. So kann im Falle des Glioblastoms in über 40 % aller Fälle eine *EGFR* Genamplifikation beobachtet werden, was eine aberrierende Signalweiterleitung ins Innere der Zelle nach sich zieht. Daraus resultiert u. a. eine erhöhte Proliferations-, Migarations- und Invasionsfähigkeit der Zelle und begünstigt dadurch die Tumorprogression und Infiltration des umliegenden Gewebes (Louis, 2006). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass auch der HER2 Rezeptor für die Progression des Glioblastoms mitverantwortlich zu sein scheint (Koka et al., 2003; Mineo et al., 2007; Potti et al., 2004); die genauen Mechanismen und die Signifikanz des Rezeptors im EGF Rezeptor Netzwerk glialer Tumorzellen bleiben jedoch bisher ungeklärt. Durch die Transfektion einer ausgewählten Zelllinie mit verschiedenen aktivierten HER2 Rezeptor Varianten sollte der Einfluss von HER2 auf die EGF Rezeptor Aktivierung und zugehörige Signaltransduktion, und die daraus resultierenden Veränderungen bezüglich des Migrationsverhaltens untersucht werden.

1. Charakterisierung der HER2 Rezeptor transfizierten LN18 Zellklone

1.1 Expression und Aktivierung von HER2 und EGF Rezeptor

Die permanente Glioblastomzelllinie LN18 zeigt deutliche Proteinexpressionsunterschiede für den EGF Rezeptor und den HER2 Rezeptor (Abb 36). Während der EGF Rezeptor endogen sehr stark exprimiert wird, ist die Expression des HER2 Rezeptors sehr gering, bis gar nicht detektierbar. Es wurden der HER2 Wildtyp Rezeptor (HER2N), eine konstitutiv aktivierte HER2 Variante (HER2VE), und eine dominant-negative Rezeptormutante (HER2VEKA), (Rezeptorschemata s. Abb 10) stabil in die Zelllinie LN18 transfiziert und die erhaltenen Einzelzellklone zunächst auf proteinbiochemischer Ebene mittels Western Blot Analyse charakterisiert.

Es wurden geeignete Klone mit jeweils mittelstarker HER2 Proteinexpression per Western Blot Analyse ausgewählt und bezüglich HER2 und EGF Rezeptor Expression und Aktivierung untersucht. Im Folgenden werden die Bezeichnungen HER2N-Zellen, HER2VE-Zellen und HER2VEKA-Zellen für den mit der jeweiligen HER2 Rezeptormutante transfizierten LN18 Einzelklon verwendet.

Unter serumfreien Kulturbedingungen und ohne EGF Stimulierung, konnte nur in den HER2VE-Zellen eine hohe Phosphorylierung, und damit Aktivierung, des HER2 Rezeptors

mittels Western Blot Analyse beobachtet werden. HER2N-Zellen zeigten unter Verwendung eines phospho-spezifischen Anti-HER2 Antikörpers (pY 1248) eine leichte Aktivierung von HER2, wohingegen untransfizierte, parentale LN18 Kontrollzellen, und dominant-negativ transfizierte HER2VEKA-Zellen keinerlei Aktivierung des HER2 Rezeptors aufwiesen (Abb 13). Stimulierung mit EGF (100 ng/ml) für fünf Minuten resultierte in verstärkter Phosphorylierung des HER2 Rezeptors in HER2N-Zellen, während in HER2VE-Zellen keine weitere Zunahme der konstitutiven Aktivierung mehr detektierbar war. In Parentalzellen, sowie HER2VEKA-Zellen konnte auch nach Stimulierung mit EGF keinerlei Phosphorylierung beobachtet und somit keine Bande bei 180 kDa nachgewiesen werden (Abb 13).

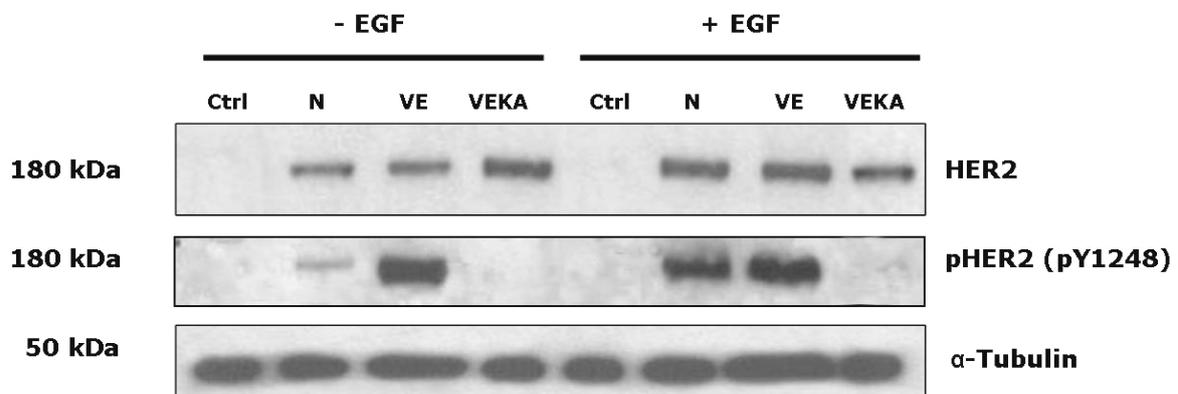


Abb 13: Proteinexpression und Aktivierung des HER2 Rezeptors in der Glioblastomzelllinie LN18 nach Transfektion mit den HER2 Rezeptormutanten HER2N, HER2VE und HER2VEKA

Parentalzellen (Ctrl) und stabil transfizierte LN18 Zellen wurden nach 24 h Serumstarvation für 5 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert. HER2 Expression und Phosphorylierung (pY 1248) wurde durch Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper ermittelt. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

Die Expression des endogenen EGF Rezeptors blieb von der Transfektion mit den HER2 Varianten unbeeinflusst und in allen untersuchten Zellklonen war eine gleich starke Bande bei 170 kDa detektierbar (Abb 14). Bei Kultivierung in serumfreien Medium, und ohne EGF Stimulierung zeigten nur HER2VE-Zellen, die einen konstitutiv aktivierten HER2 Rezeptor exprimieren, auch eine schwache Aktivierung des EGF Rezeptors. Nach EGF Stimulierung konnte unter Verwendung eines phospho-spezifischen Anti-EGFR Antikörpers (pY 1086) in allen vier Zellklonen EGF Rezeptor Phosphorylierung nachgewiesen werden, wobei HER2N- sowie HER2VE-Zellen ein sehr starkes Signal zeigten. Parentalzellen und HER2VEKA-Zellen zeigten eine vergleichbare

Aktivierungsintensität, die jedoch deutlich unter dem Aktivierungsniveau der HER2N- und HER2VE-Zellen lag (Abb 14).

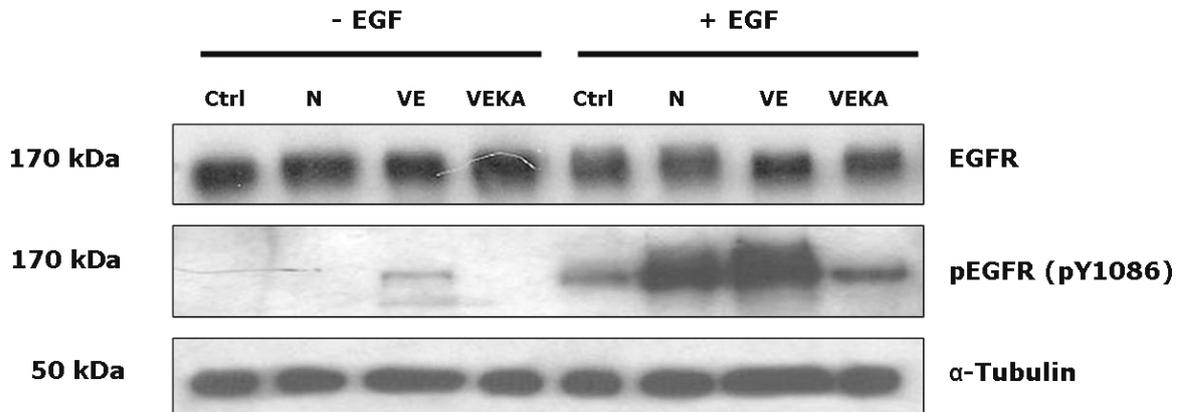


Abb 14: Proteinexpression und Aktivierung des EGF Rezeptors in der Glioblastomzelllinie LN18 nach Transfektion mit den HER2 Rezeptormutanten HER2N, HER2VE und HER2VEKA

Parentalzellen (Ctrl) und stabil transfizierte LN18 Zellen wurden nach 24 h Serumstarvation für 5 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert. EGFR Expression und Phosphorylierung (pY 1086) wurde durch Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper ermittelt. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

Betrachtet man den zeitlichen Ablauf der EGF Rezeptor Aktivierung, werden auch hier Unterschiede zwischen den einzelnen HER2 Klonen deutlich. Es wurde eine Zeitkinetik erstellt, die eine EGF Stimulierung von 3 bis 60 Minuten beinhaltet. Parentale LN18 Zellen zeigten im Western Blot die stärkste EGF Rezeptor Phosphorylierung (pY 1086) zum Zeitpunkt von 5 Minuten nach EGF Zugabe. Danach nimmt das Signal stetig ab, ist aber nach 60 Minuten noch sehr gut detektierbar. Die unstimulierte Kontrolle zeigte keine EGF Rezeptor Phosphorylierung. Im Falle der HER2N-Zellen war das Signal bis zu 15 Minuten sehr hoch und fiel danach relativ schnell ab, wobei auch nach 60 Minuten noch EGF Rezeptor Aktivierung nachweisbar war. Auch hier war unstimuliert keine Aktivierung detektierbar.

HER2VE-Zellen zeigten die stärkste Aktivierung zum Zeitpunkt von 3 Minuten, das Signal blieb jedoch auch danach bis zu 60 Minuten nach EGF Zugabe sehr stark. Unstimuliert war hier die konstitutive EGFR Aktivierung, bedingt durch den konstitutiv aktivierten HER2VE Rezeptor nachweisbar.

Die Aktivierung des EGF Rezeptors in HER2VEKA-Zellen war allgemein schwächer, wenn auch zwischen 3 und 15 Minuten am stärksten. Zum Zeitpunkt 60 Minuten war jedoch kaum noch Signal detektierbar (Abb 15).

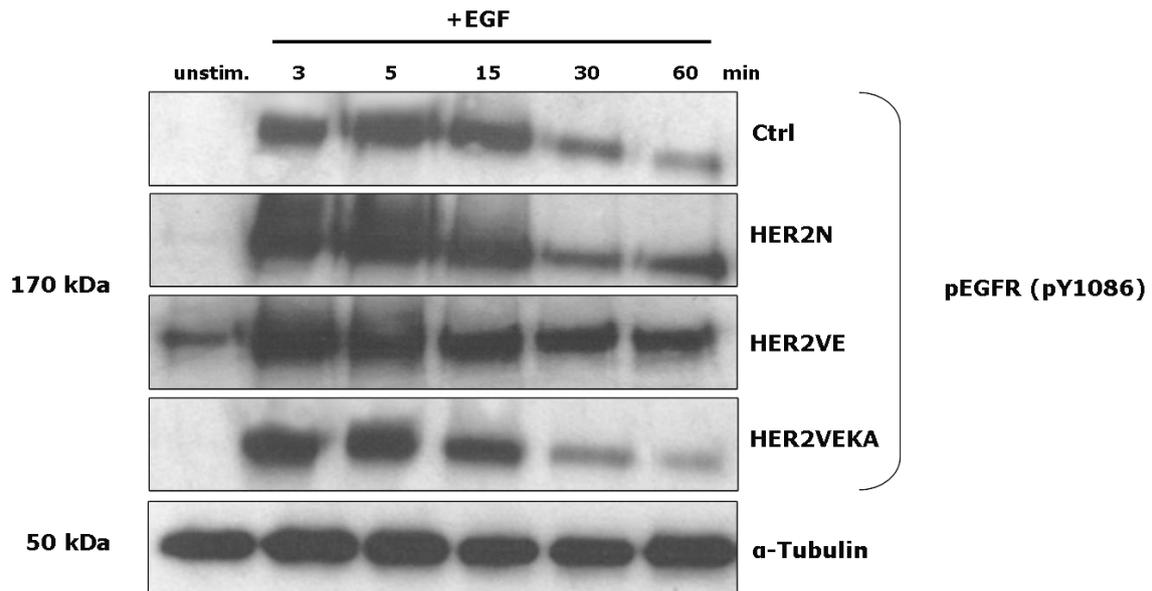


Abb 15: Zeitkinetik der EGF Rezeptor Aktivierung nach EGF Stimulierung

Aktivierung des EGF Rezeptors in LN18 Ctrl, HER2N-, HER2VE- und HER2VEKA Zellen nach Stimulierung mit 100 ng/ml EGF für 3, 5, 15, 30 und 60 Minuten nach 24 h Serumstarvation. Die EGF Rezeptor Phosphorylierung wurde mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers (pY 1086) in Western Blot Analysen detektiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

Diese Daten zeigen deutlich, dass HER2 und EGF Rezeptor in humanen Glioblastomzellen interagieren und sich in ihrer Aktivierungsstärke und -dauer beeinflussen.

1.2 Lokalisation von HER2 und EGF Rezeptor

Zur weiteren Charakterisierung wurde mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation von HER2 und EGFR innerhalb der einzelnen Zelle in den vier verschiedenen transfizierten HER2 Klonen ermittelt und miteinander verglichen. In parental LN18 Kontrollzellen konnte jedoch aufgrund der sehr niedrigen, endogenen HER2-Expression nur der EGF Rezeptor untersucht werden.

Es wurde dabei jeweils eine serumfreie, unstimulierte Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden vor der Fixierung zwischen einer und sechzig Minuten mit EGF stimuliert, um so eine zeitliche Kinetik der Aktivierung und Internalisierung der Rezeptoren zu erhalten.

Betrachtete man die Lokalisation von HER2 (FITC markiert, grün) und EGF Rezeptor (Cy3 markiert, rot) nach EGF Stimulierung in den verschiedenen Zellklonen, konnte man in HER2N-Zellen eine membranständige Färbung zwischen 3 und 5 Minuten nach EGF Zugabe erkennen. Zu späteren Zeitpunkten nahm die Membranständigkeit ab und die Rezeptoren waren, in Endosomen angereichert, in perinukleärer Lokalisation zu sehen. Die Anreicherung im Endosom wurde mittels einer Coimmunfluoreszenz mit Anti-pEGFR

(pY 1086) und Anti-Rab5 Antikörpern, einem frühen Endosomenmarker, kontrolliert (Abb 19). Diese Lokalisation war in mittlerer Intensität bis zum Zeitpunkt von 30 Minuten nach Stimulation erkennbar, wobei HER2 schon ab 5 Minuten internalisiert wurde, der EGF Rezeptor erst ab 15 Minuten nach Stimulierung. Dafür war der Prozess für HER2 schon zwischen 30 und 60 Minuten abgeschlossen, wohingegen der EGF Rezeptor auch nach 60 Minuten nach EGF Zugabe noch in Endosomen zu finden war. In unstimuliertem Zustand waren zytoplasmatisch verteilter HER2 Rezeptor, aber weder membranständiger noch internalisierter EGF Rezeptor nachweisbar (Abb 16).

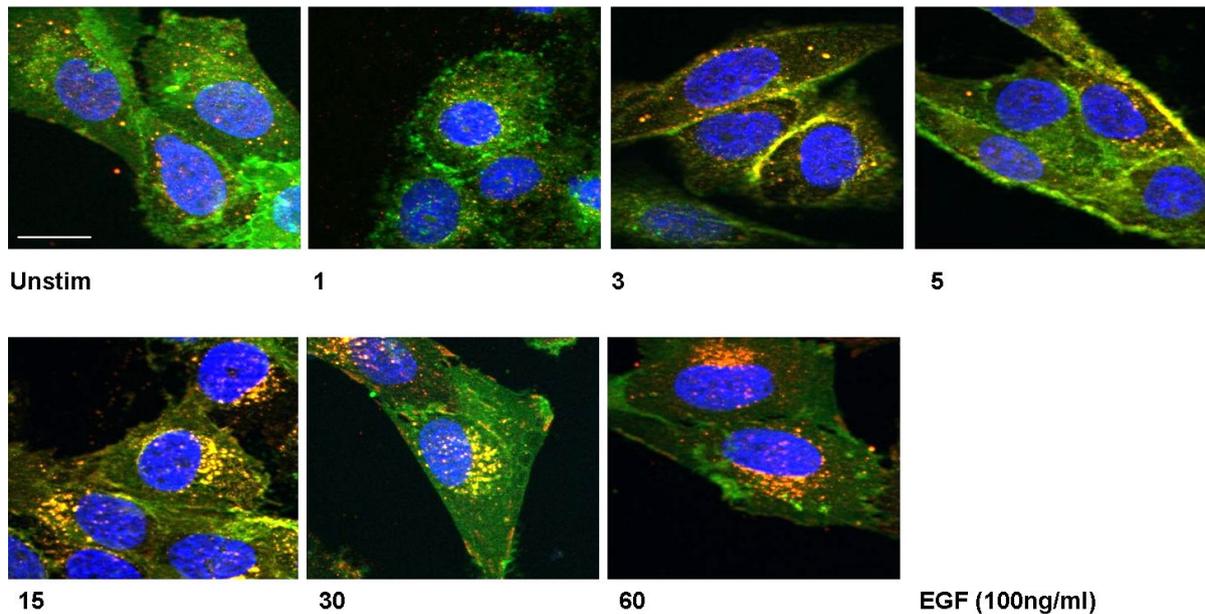


Abb 16: Zeitkinetik der HER2N und EGF Rezeptor Aktivierung und zelluläre Lokalisation der Rezeptoren zu den untersuchten Zeitpunkten in HER2N-Zellen

Die Rezeptoren (pEGFR und HER2N) wurden mittels Immunfluoreszenz in ihrer zeitlichen und räumlichen Verteilung und Aktivierung aufgenommen. Der HER2N Rezeptor erscheint hierbei im FITC-Kanal (grün), während pEGFR (pY 1086) im Cy3-Kanal (rot) detektierbar ist. Gelbe Bereiche kennzeichnen Kolokalisation beider Rezeptoren. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Zellen wurden nach 24 h serumfreier Kultivierung auf Chamberslides™ zwischen 1 und 60 Minuten mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, das mit einer digitalen Kamera ausgestattet war, mit 63 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.5 bearbeitet. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

In HER2VE-Zellen hingegen konnte aufgrund der konstitutiven HER2-Aktivierung zu jedem Zeitpunkt der EGF Stimulierung ein Fluoreszenzsignal für HER2 an der Membran detektiert werden. Das Signal für membranständigen EGF Rezeptor hingegen war zwischen 1 und 5 Minuten am stärksten; danach war die Anreicherung vesikulär im perinukleären Bereich der Zellen. Die Internalisierung beider Rezeptoren erreichte 15

Minuten nach EGF Gabe ihren Höhepunkt; zu späteren Zeitpunkten, und in unstimulierten HER2VE-Zellen, waren vereinzelte Vesikel detektierbar (Abb 17).

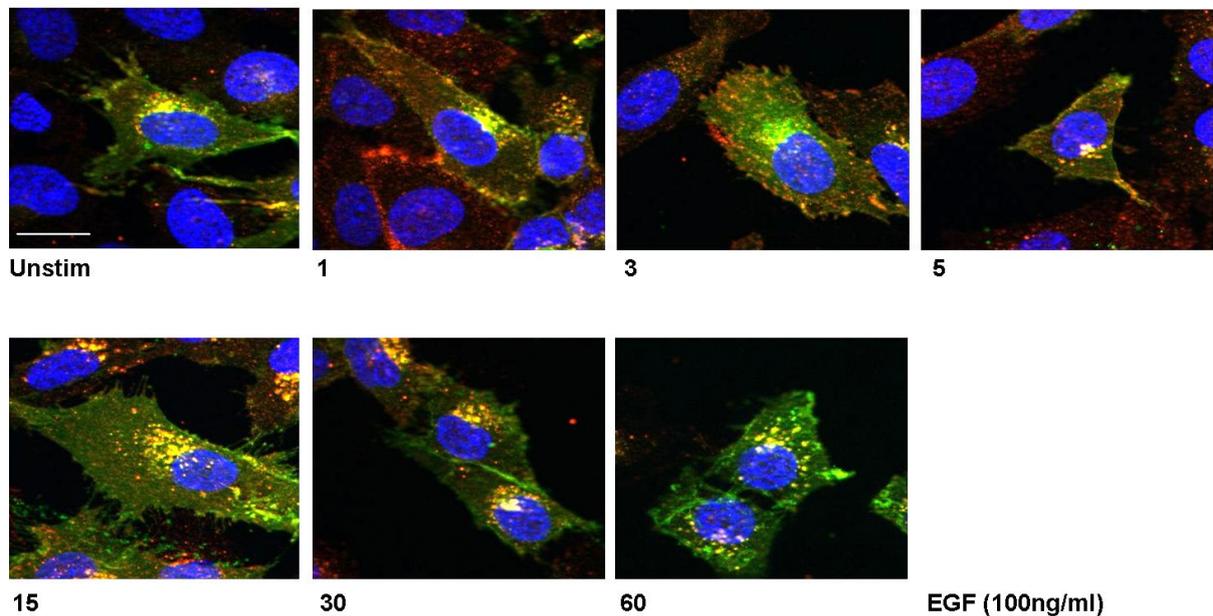


Abb 17: Zeitkinetik der HER2VE und EGF Rezeptor Aktivierung und zelluläre Lokalisation der Rezeptoren zu den untersuchten Zeitpunkten in HER2VE-Zellen

Die Rezeptoren (pEGFR und HER2VE) wurden mittels Immunfluoreszenz in ihrer zeitlichen und räumlichen Verteilung und Aktivierung aufgenommen. Der HER2VE Rezeptor erscheint hierbei im FITC-Kanal (grün), während pEGFR (pY 1086) im Cy3-Kanal (rot) detektierbar ist. Gelbe Breiche kennzeichnen eine Kolokalisation beider Rezeptoren. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Die Zellen wurden nach 24 h serumfreier Kultivierung auf Chamberslides™ zwischen 1 und 60 Minuten mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, das mit einer digitalen Kamera ausgestattet war, mit 63 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.5 bearbeitet. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

In HER2VEKA-Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt nach EGF Stimulierung ein membranständiges HER2 Signal gemessen werden. Auch der EGF Rezeptor war erst zwischen 3 und 15 Minuten an der Membran detektierbar. Der Internalisierungsprozess war zwischen 15 und 30 Minuten am stärksten; zu früheren und auch zu späteren Zeitpunkten konnte nur perinukleäres HER2 Signal, aber kein EGF Rezeptor Signal detektiert werden. Unstimuliert konnte keinerlei EGF Rezeptor Fluoreszenz gemessen werden (Abb 18).

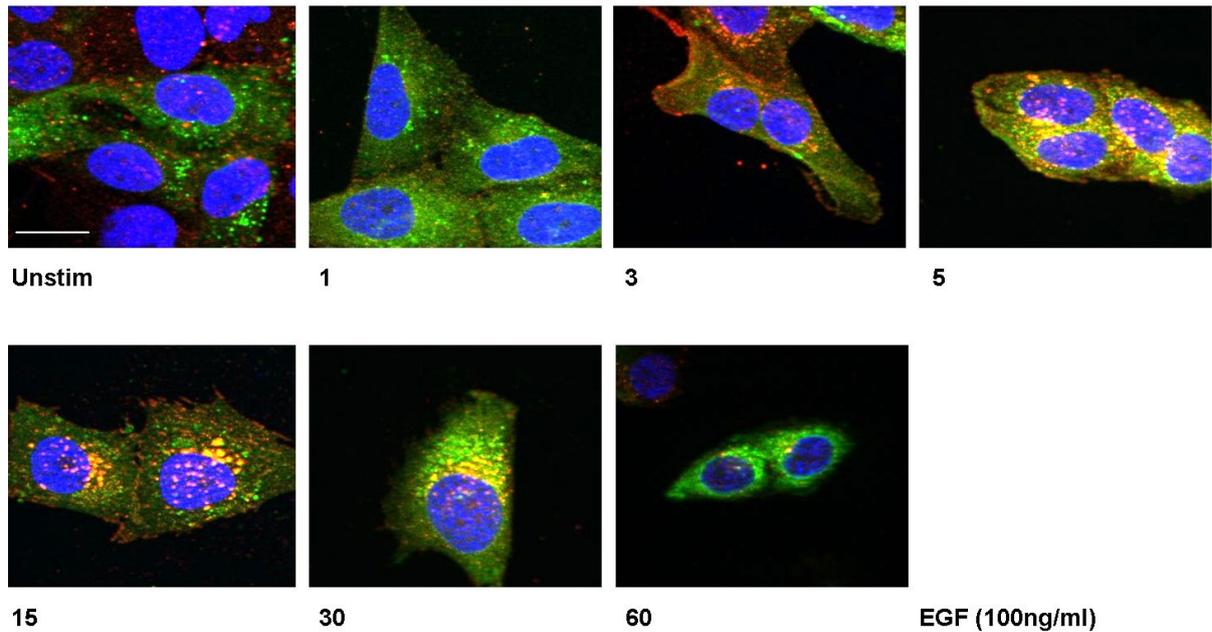


Abb 18: Zeitkinetik der HER2VEKA und EGF Rezeptor Aktivierung und zelluläre Lokalisation der Rezeptoren zu den untersuchten Zeitpunkten in HER2VEKA-Zellen

Die Rezeptoren (pEGFR und HER2VEKA) wurden mittels Immunfluoreszenz in ihrer zeitlichen und räumlichen Verteilung und Aktivierung aufgenommen. Der HER2VEKA Rezeptor erscheint hierbei im FITC-Kanal (grün), während pEGFR (pY 1086) im Cy3-Kanal (rot) detektierbar ist. Gelbe Bereiche kennzeichnen eine Kolokalisation beider Rezeptoren und die Zellkerne erscheinen durch DAPI-Färbung blau. Die Zellen wurden nach 24 h serumfreier Kultivierung auf Chamberslides™ zwischen 1 und 60 Minuten mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, das mit einer digitalen Kamera ausgestattet war, mit 63 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.5 bearbeitet. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Die parentalen LN18 Zellen konnten nur hinsichtlich des EGF Rezeptors untersucht werden. Es wurde außerdem Rab5 (Cy3 markiert, rot) als Endosomenmarker dazugenommen. Hierbei konnte man das stärkste membranständige pEGFR (pY 1086) Signal (FITC markiert, grün) zu den frühen Zeitpunkten, also zwischen 1 und 3 Minuten, erkennen. Ab 5 Minuten nach EGF Gabe war der EGF Rezeptor bereits in Endosomen nachweisbar und der Internalisierungsprozess war nach 60 Minuten komplett abgeschlossen. Unstimuliert konnte keine EGF Rezeptor Aktivierung detektiert werden (Abb 19).

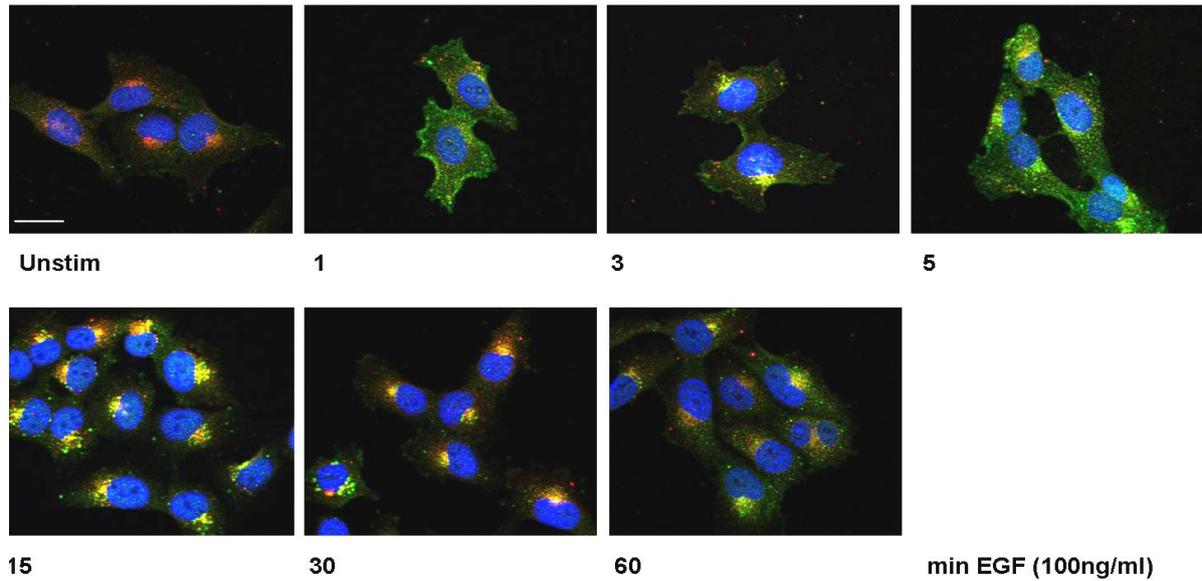


Abb 19: Zeitkinetik der EGF Rezeptor Aktivierung und zelluläre Lokalisation des Rezeptors zu den untersuchten Zeitpunkten in LN18 Parentalzellen

pEGFR (pY 1086) wurde mittels Immunfluoreszenz in seiner zeitlichen und räumlichen Verteilung und Aktivierung aufgenommen. Der EGF Rezeptor erscheint hierbei im FITC-Kanal (grün), während Rab5 im Cy3-Kanal (rot) detektierbar ist. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Gelbe Bereiche kennzeichnen Kolokalisation von EGF Rezeptor und Rab5. Die Zellen wurden nach 24 h serumfreier Kultivierung zwischen 1 und 60 Minuten mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, das mit einer digitalen Kamera ausgestattet war, mit 63 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.5 bearbeitet. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Diese Ergebnisse lassen Unterschiede in der zeitlichen und räumlichen Verteilung der verschiedenen HER2-Klone erkennen. Zusammenfassend kann man sagen, dass nach EGF Stimulierung HER2 schneller internalisiert wird als der EGF Rezeptor, wenn beide Rezeptoren gleichzeitig in den Zellen vorliegen. Liegt kein HER2 in den Zellen vor (LN18 Parentalzellen), erfolgt die Internalisierung von EGF Rezeptor Homodimeren weitaus schneller.

2. Beeinflussung der EGFR vermittelten Signaltransduktion

Die Transfektion der Zelllinie LN18 mit verschiedenen HER2-Konstrukten zeigte deutliche Auswirkungen auf die EGF und HER2 Rezeptor Aktivierung. Ausgehend von der Rezeptoraktivierung werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die unter anderem für die Kontrolle von Proliferation, Adhäsion, Migration, Invasion oder Apoptose verantwortlich sind. Die klassischen Signalwege im ErbB/HER Netzwerk sind der PI3-Kinase Signalweg und der MAPKinase Signalweg (Holbro and Hynes, 2004). Im Folgenden sollten die Auswirkungen der Transfektion der verschiedenen HER2 Rezeptor

Mutanten auf die nachgeschaltete Signaltransduktion im EGFR/HER2 Netzwerk untersucht werden.

2.1 Einfluss von HER2 auf den PI3-Kinase / Akt Signalweg

PI3-Kinasen spielen eine große Rolle bei der Kontrolle zellulärer Funktionen. Es gibt drei Klassen von PI3-Kinasen, wobei nur Vertreter der Klasse Ia durch Rezeptor Tyrosinkinase (RTKs) aktiviert werden können. Mittels der PI3-Kinase wird PIP₂ zu PIP₃ phosphoryliert; ein wichtiges Zielmolekül des PIP₃ ist PKB/Akt, welches ein Hauptmediator diverser zellulärer Funktionen wie Anti-Apoptose und Migration ist (Jorissen et al., 2003).

PTEN, eine Lipidphosphatase katalysiert wiederum die Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂, bzw. verhindert von vornherein die Formierung von PIP₃. Dieser Prozess stellt die hauptsächliche negative Regulierung im PI3K/Akt Signalweg dar. Der Verlust der tumorsuppressiven PTEN Funktion ist u. a. für eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs in vielen humanen Tumorerkrankungen, so auch im Glioblastom, verantwortlich. Die Zelllinie LN18 trägt keine Mutation im *PTEN* Gen (Ishii et al., 1999; Schlegel et al., 2000).

Es wurde die EGF Rezeptor abhängige Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs unter serumfreien Kulturbedingungen mit anschließender EGF Stimulierung in den vier verschiedenen Transfektanten mittels Western Blot Analyse untersucht. Unter serumfreien Bedingungen und ohne zusätzliche EGF Zugabe zeigten nur HER2N- und HER2VE-Zellen eine konstitutive Aktivierung von Akt (pSer 473), wobei diese in HER2VE-Zellen stärker war. Nach EGF Stimulierung für fünf Minuten war in allen Zellklonen Akt-Aktivierung messbar, in dominant-negativen HER2VEKA-Zellen war jedoch eine deutlich schwächere Signalintensität nachweisbar. In HER2VE-Zellen hingegen war im Vergleich zu LN18 Parentalzellen eine leichte Erhöhung des phospho-Akt Signals zu detektieren. Die Transfektion hatte keinerlei Auswirkungen auf die Gesamt Proteinexpression von PI3K/Akt (Abb 20).

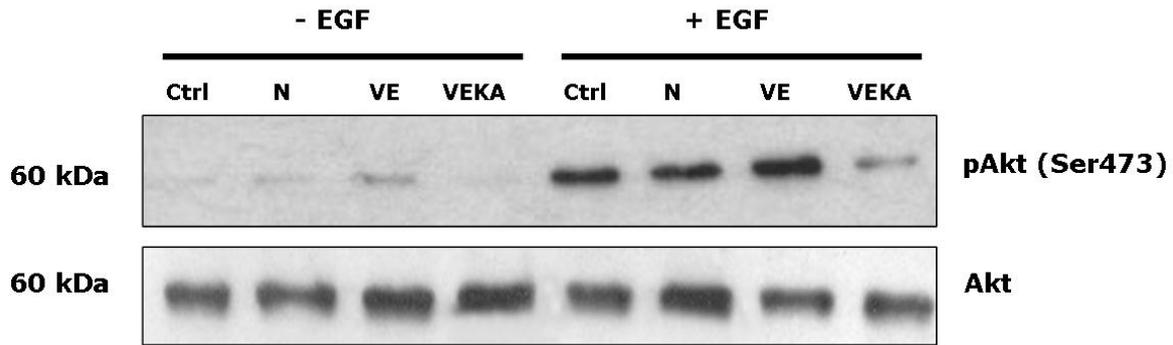


Abb 20: Proteinexpression und Aktivierung von Akt im PI 3-Kinase Signalweg in humanen LN18 Glioblastomzellen nach Transfektion mit HER2N, HER2VE und HER2VEKA

LN18 Parentalzellen (Ctrl) und stabil transfizierte LN18 Zellen wurden nach 24 h Serumstarvation für 5 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Akt Expression und Phosphorylierung (pSer 473) wurde durch Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper ermittelt. Als Ladekontrolle diente die Gesamt-Akt-Expression.

Die Gesamt Proteinexpression von PTEN, gemessen in Lysaten aus Zellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, zeigte Unterschiede innerhalb der HER2-Transfektanten. Zellen, die keinen oder einen inaktivierten HER2-Rezeptor exprimierten (LN18 Parentalzellen und HER2VEKA), wiesen dabei eine höhere PTEN Expression auf als Zellen mit aktivem HER2 (HER2N und HER2VE) (Abb 21). Diejenigen Zellen, die eine erhöhte PTEN Expression aufwiesen, zeigten gleichzeitig eine abgeschwächte Akt-Aktivierung (Parental- und HER2VEKA-Zellen). Die Ergebnisse lassen auf eine Regulation der EGF Rezeptor nachgeschalteten Signaltransduktion im Falle des PI3-Kinase Signalweges schließen, da bei Expression des dominant-negativen HER2VEKA Rezeptors eine eindeutig schwächere Akt Phosphorylierung, gepaart mit einer dazu passenden Erhöhung der PTEN Expression detektierbar ist.

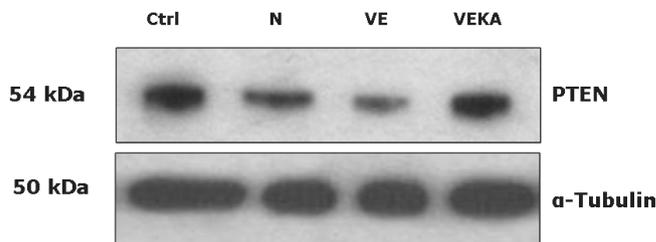


Abb 21: Expression von PTEN in der humanen Glioblastomzelllinie LN18 transfiziert mit HER2N, HER2VE und HER2VEKA

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend lysiert. Die Detektion von PTEN erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers. α-Tubulin diente als Ladekontrolle.

2.2 Einfluss von HER2 auf den MAP-Kinase Signalweg

Auch der MAP-Kinase Signalweg spielt in der EGF Rezeptor vermittelten Signaltransduktion eine erhebliche Rolle. Über ihn werden u. a. Zellproliferation und Migrationsprozesse gesteuert (Mawrin et al., 2003). Im Western Blot zeigte sich eine ähnliche Signalverteilung wie im Falle der Akt Aktivierung. Ohne EGF Stimulierung war MAPK p44/42 nur in Zellen mit aktivem HER2, also in HER2N- und HER2VE-Zellen detektierbar. Nach fünfminütiger EGF Stimulierung konnte in allen vier untersuchten Zellklonen phosphorylierte MAPK (pMAPK Thr202/Tyr204) nachgewiesen werden, wobei auch hier weiterhin die HER2N- und HER2VE-Zellen den höchsten Aktivierungsstatus aufwiesen. HER2VEKA-Zellen zeigten die schwächste Aktivierung, die in etwa mit dem Signal der Parentalzellen vergleichbar war. Die Gesamt Proteinexpression der MAPK war nicht reguliert und das Signal in allen unstimulierten und stimulierten Proben gleich. Die Daten machen deutlich, dass HER2VEKA in dominant-negativer Weise auf die EGFR abhängige Signaltransduktion im MAP-Kinase Signalweg wirkt, während der HER2VE Rezeptor einen aktivierenden Einfluss auf die Signalweiterleitung hat (Abb 22).

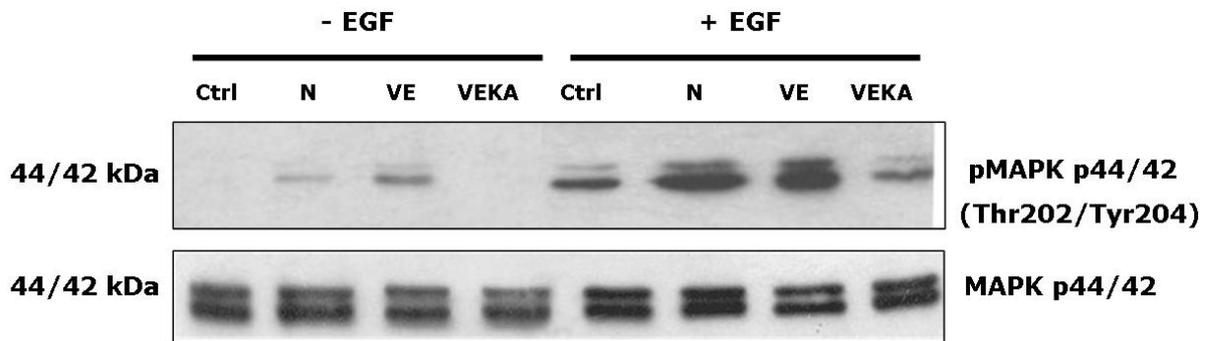


Abb 22: Proteinexpression und Aktivierung der MAPK im MAP-Kinase Signalweg in humanen LN18 Glioblastomzellen nach Transfektion mit HER2N, HER2VE und HER2VEKA

LN18 Parentalzellen (Ctrl) und stabil transfizierte LN18 Zellen wurden nach 24 h Serumstarvation für 5 min mit 100 ng/ml EGF stimuliert. p44/42 MAPK Expression und Phosphorylierung (Thr 202 /Tyr 204) wurde durch Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper ermittelt. Als Ladekontrolle diente die Gesamt-MAPK-Expression.

II. HER2 beeinflusst das Migrationsverhalten der transfizierten LN18 Zellklone

Da die Infiltration in umliegendes Gewebe eines der größten Probleme bei der Behandlung maligner Gliome ist, und da das ErbB Rezeptor Netzwerk an Vorgängen der Zellmigration und –infiltration maßgeblich beteiligt ist, war es von großem Interesse die Auswirkungen der HER2 Expression auf das Migrationsverhalten der einzelnen Zellklone zu untersuchen.

1. Migration in HER2VE und HER2VEKA transfizierten LN18 Zellen im Vergleich zu parentalen LN18 Glioblastomzellen

Die erste Auffälligkeit nach Transfektion der Konstrukte HER2N, HER2VE und HER2VEKA war die morphologische Veränderung der Zellen unter Standardkulturbedingungen. LN18 Zellen, die den dominant-negativen HER2VEKA Rezeptor exprimierten, wuchsen eng gedrängt in Zellhaufen oder –kolonien, zeigten starke Zell-Zell-Adhäsion und einen epithelialen Phänotyp. Expression des konstitutiv aktivierten HER2VE Rezeptors hingegen führte zu einem kompletten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und die Zellen zeigten einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp. Der HER2N exprimierende Zellklon ähnelte hingegen dem Phänotyp der LN18 Parentalzellen, wobei hier eine Mischung aus Kolonie-artigem Wachstum und einzelnen Zellen vorlag, das an ein „Pflastersteinmuster“ erinnerte (Abb 23). Der HER2 Rezeptor scheint somit in der Lage zu sein, das Adhäsionssystem der Zellklone zu beeinflussen.

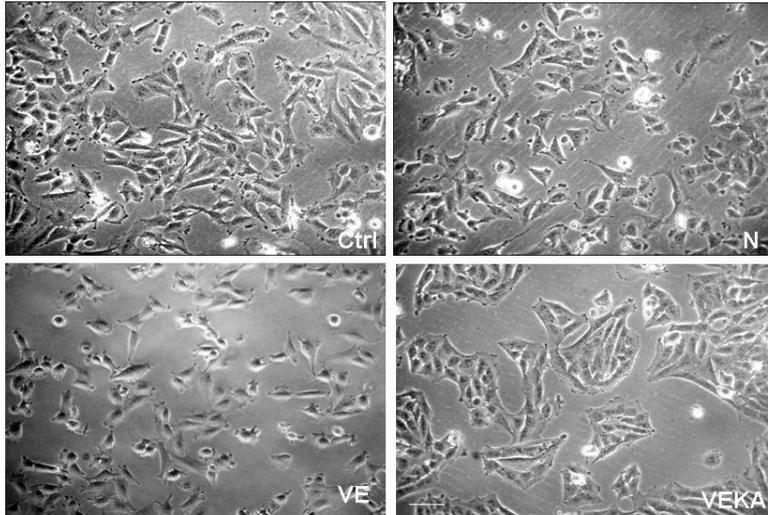


Abb 23: Zellmorphologie der Glioblastomzelllinie LN18 nach Transfektion mit HER2N, HER2VE und HER2VEKA

Durchlichtaufnahmen der LN18 Parentalzellen (Ctrl) und der unterschiedlichen HER2-Transfektanten unter Standardkulturbedingungen. Die Zellen wurden mit einem inversen Mikroskop, ausgestattet mit einer digitalen Kamera, mit 20 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Mit diesen stark divergierenden morphologischen Unterschieden ging ein verändertes Migrationverhalten der transfizierten LN18 Zellklone einher. Die Zellmotilität und damit das Migrationsvermögen wurden qualitativ anhand von Woundhealing Assays getestet, wobei die Zellen unter serumfreien Bedingungen gehalten wurden. 48 Stunden nach dem initialen *Scratch* (Kratzer), war bei HER2VEKA-Zellen keinerlei Migration zu beobachten. Bei HER2VE-Zellen hingegen, waren der „Wundschluß“ und damit die Migration der Zellen stark beschleunigt und die Zellen wanderten dabei als Einzelzellen in den Spalt ein. HER2N-Zellen und Parentalzellen zeigten ein vergleichbares Migrationsverhalten, das zwischen dem der HER2VE- und HER2VEKA-Zellen anzusiedeln war (Abb 24). In Abbildung 25 wurden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Woundhealing Assays wie in Material und Methoden (s. S. 33) beschrieben semiquantitativ ausgewertet und grafisch dargestellt. Diese Daten indizieren eine funktionelle Rolle des HER2 Rezeptors in glialer Tumorzell-Migration, da durch die Expression eines inaktiven HER2VEKA Rezeptors Migration verhindert werden kann.

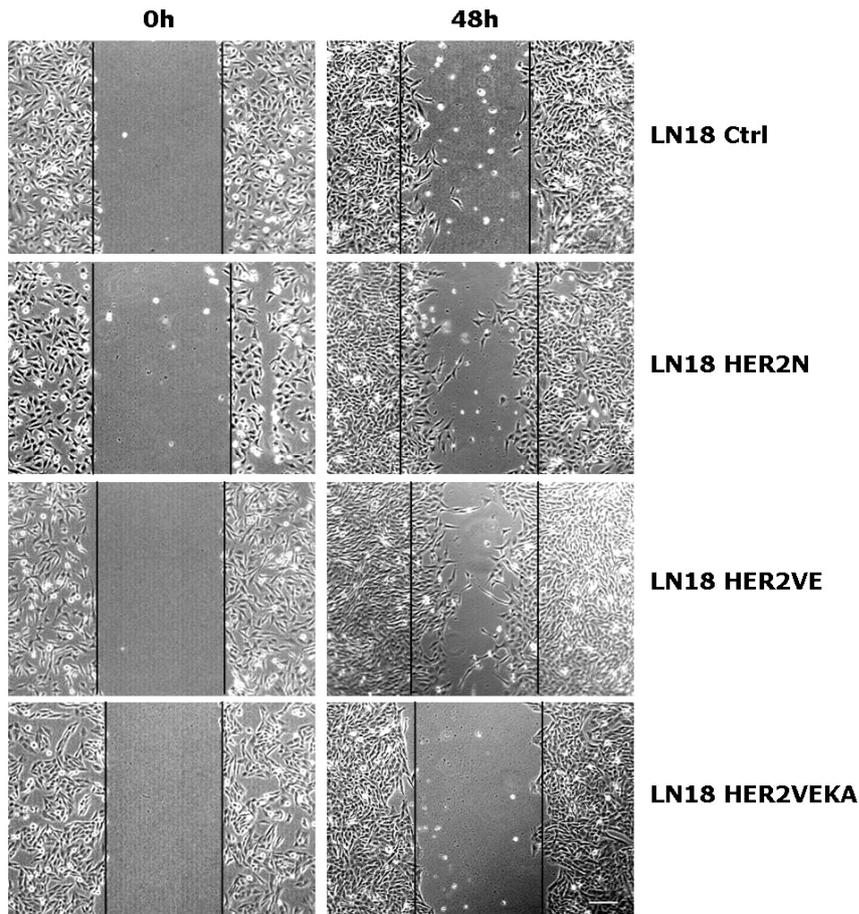


Abb 24: Woundhealing Assay zur Messung des Migrationsverhaltens von LN18 Parentalzellen (Ctrl) und den Transfektanten HER2N, HER2VE und HER2VEKA

Die Zellen wurden jeweils zum Zeitpunkt des initialen Scratches (linke Spalte) und 48 h danach (rechte Spalte) mit einem inversen Mikroskop mit 10 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Dabei wurde jeweils dieselbe Stelle der Kulturschale fotografiert. Während der Versuchsdurchführung wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Kontrast und Helligkeit wurden mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.5 von Zeiss reguliert. Die Linien bezeichnen die ursprünglichen Wundränder. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

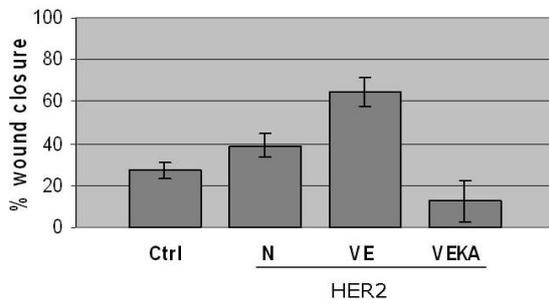


Abb 25: Grafische Darstellung der semiquantitativen Auswertung der Woundhealing Assays aus Abb 24

Der Wundschluß der verschiedenen HER2 Rezeptor exprimierenden LN18 Zellen wurde auf dem jeweiligen Bild gemessen und prozentual zur Ausgangsdistanz berechnet. Die Abbildung repräsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

2. Das unterschiedliche Migrationsverhalten der HER2-Klone wird durch Reorganisation von Zelladhäsionsmolekülen vermittelt

Die Veränderungen der Zellmorphologie und des Migrationsverhaltens legen Alterationen im Zelladhäsionssystem der Zellen nahe. Tumorprogression, Migration und Invasion in umliegendes Gewebe müssen u. a. durch Reorganisation des Zytoskelettes und durch den Auf- und Abbau von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten stattfinden (Perego et al., 2002). Bei der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion spielen Cadherine eine große Rolle. Dabei handelt es sich um Ca^{2+} -abhängige Glykoproteine, welche in vielen Krebserkrankungen herunterreguliert sind und somit die Tumorzell-Migration begünstigen. Am besten charakterisiert ist dabei die Rolle des E-Cadherin in epithelialen Tumoren (Birchmeier and Behrens, 1994). N-Cadherin, ein weiterer Vertreter der klassischen Cadherine wird u. a. in glialen Tumorzellen exprimiert. Seine Rolle in der Tumorgenese maligner Gliome ist jedoch weitgehend ungeklärt, nicht zuletzt weil die Funktion des N-Cadherins kontrovers diskutiert wird. Es kann je nach Zellkontext sowohl Migration und Invasion, als auch Adhäsion vermitteln (Barami et al., 2006; Derycke and Bracke, 2004).

2.1 Expression und Lokalisation von E-Cadherin in LN18 HER2-Klonen

E-Cadherin Expression und v. a. deren Verlust stehen im Zusammenhang mit vielen Tumorerkrankungen. Es existieren auch Untersuchungen zur E-Cadherin Expression in hirneigenen Tumoren, wobei speziell im Meningeom, E-Cadherin Expression nachgewiesen werden konnte (Schwechheimer et al., 1998).

Hier wurden die Proteinexpression und die Lokalisation von E-Cadherin sowohl in den drei HER2 Transfektanten, als auch in den Parentalzellen untersucht. Western Blot Ergebnisse zeigten, dass in Parentalzellen, HER2N- und HER2VE-Zellen keine bis sehr schwache E-Cadherin Proteinexpression vorlag. Nur in HER2VEKA-Zellen, die ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte aufwiesen, konnte ein klares E-Cadherin Signal bei 130 kDa detektiert werden. Um die Funktionalität des E-Cadherin an den Zelloberflächen zu bestätigen, wurde mittels Immunfluoreszenz die Lokalisation des Proteins untersucht. Es konnte jedoch kein membranständiges E-Cadherin, in den HER2-Klonen nachgewiesen werden. In HER2VEKA-Zellen war lediglich eine diffuse, zytoplasmatische Färbung erkennbar. E-Cadherin scheint folglich keine Rolle für die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte in HER2VEKA-Zellen zu spielen (Abb 26).

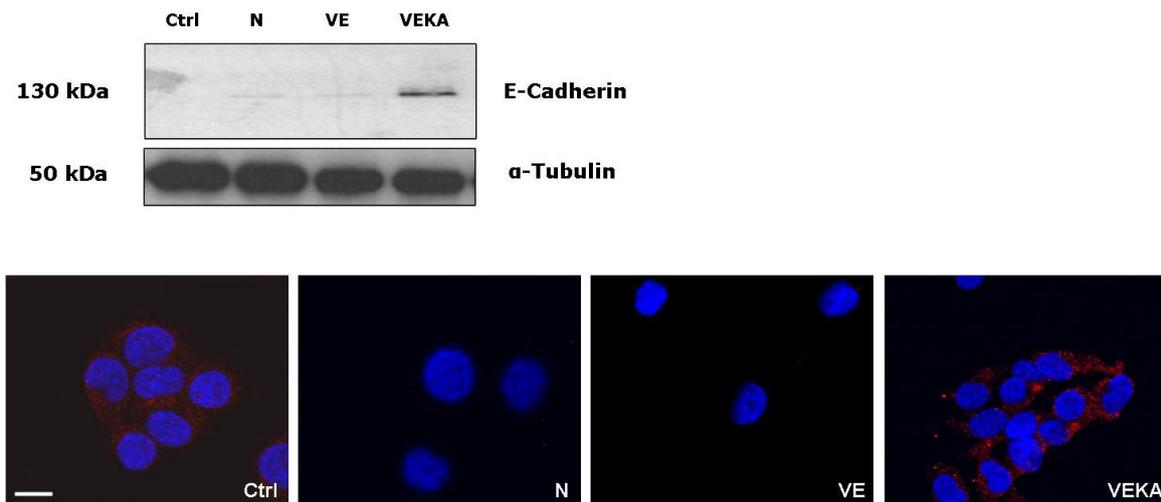


Abb 26: Expression und Lokalisation von E-Cadherin in LN18 Kontrollzellen und HER2 Rezeptor transfizierten Klonen HER2N, HER2VE und HER2VEKA

Die Expression des E-Cadherins wurde mittels Western Blot Analyse in den einzelnen HER2-Klonen unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers ermittelt. Die Lokalisation des E-Cadherins wurde mittels Immunfluoreszenz durch Inkubation mit einem spezifischen Anti-E-Cadherin Antikörper ermittelt. Als Sekundärantikörper diente ein Cy3-gekoppelter Antikörper. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einer digitalen Kamera, mit 63 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Die Bildverarbeitung hinsichtlich Helligkeit und Kontrast erfolgte mit der Software AxioVision 4.5 von Zeiss. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

2.2 Expression von N-Cadherin in LN18 HER2-Klonen

Die beobachteten Veränderungen bezüglich der Zellmorphologie und des Migrationsverhaltens deuten auf Alterationen der Zelladhäsion hin. Da N-Cadherin eine tragende Rolle im Migrations- und Invasionsverhalten glialer Tumorzellen spielen soll (Barami et al., 2006), wurde seine Bedeutung in HER2-vermittelter Zellmigration im Folgenden überprüft.

Western Blot Analysen bestätigten die Proteinexpression des N-Cadherin in untransfizierten LN18 Parentalzellen. Im Vergleich dazu konnte eine geringere Signalintensität in Lysaten der HER2N- und HER2VE-Zellen gemessen werden. Der HER2VEKA-Klon hingegen zeigte die stärkste N-Cadherin Bande bei 140 kDa, die eine starke Hochregulierung des Proteins andeutete (Abb 27). Serumstarvation der Zellen zog keinerlei Veränderung der N-Cadherin Expression nach sich.

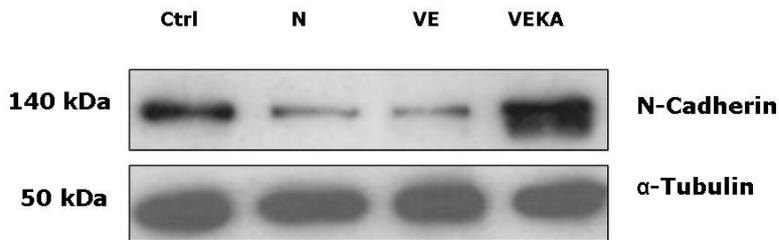


Abb 27: Expression von N-Cadherin in LN18 Kontrollzellen und HER2N-, HER2VE- und HER2VEKA-Zellen

Die Proteinexpression des Zelladhäsionsmoleküls N-Cadherin wurde durch Western Blot Analysen unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers unter Standardkulturbedingungen detektiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

2.3 Lokalisation von N-Cadherin in LN18 HER2-Klonen

Da N-Cadherin an der Zellmembran lokalisiert sein muss, um als Zelladhäsionsmolekül wirken zu können, wurde mittels Immunfluoreszenz die Membranständigkeit des Moleküls in den verschiedenen HER2-Klonen vergleichend untersucht.

Dabei bestätigten sich die Western Blot Ergebnisse bezüglich der Signalintensität. HER2VEKA-Zellen zeigten somit neben dem stärksten N-Cadherin Signal zusätzlich als einziger Zellklon eine starke membranständige Lokalisation des Moleküls (Abb 28). Im Gegensatz dazu war die Signalverteilung in allen anderen HER2-Klonen und in den Parentalzellen vorwiegend zytoplasmatisch und schwächer.

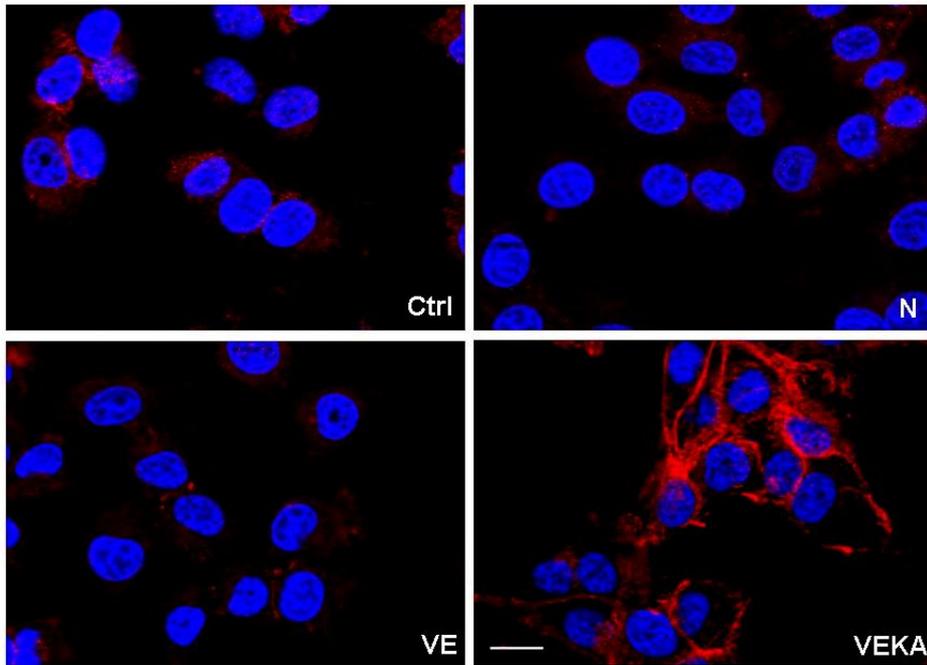


Abb 28: N-Cadherin Lokalisation in LN18 Parentalzellen und HER2N-, HER2VE- und HER2VEKA-Zellen

Die unterschiedlichen HER2-Einzelklone wurden mittels Immunfluoreszenz auf ihre N-Cadherin Lokalisation innerhalb der Zelle untersucht. Die Zellen wurden dabei unter Standardkulturbedingungen auf Deckgläschen kultiviert. Der N-Cadherin Antikörper wurde mittels eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einer digitalen Kamera, mit 63 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Die Bildverarbeitung hinsichtlich Helligkeit und Kontrast erfolgte mit der Software AxioVision 4.5 von Zeiss. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

2.4 Regulation weiterer Zelladhäsionsmoleküle

Für eine effiziente Zellmigration sind neben den bereits erwähnten Veränderungen der Zell-Zell-Adhäsion, auch Veränderungen im Zell-Matrix-Adhäsionssystem denkbar. Daher wurden in Western Blot Untersuchungen einige Proteine des Zell-Matrix-Adhäsionssystems hinsichtlich ihrer Expression und gegebenenfalls ihrer Aktivierung analysiert. Es handelte sich dabei um Proteine des Integrin-Signalkomplexes und *downstream* gelegene FAK-assoziierte Proteine. Vergleicht man zunächst motile HER2VE- mit nicht-migrierenden HER2VEKA-Zellen, so sind sowohl Integrin $\beta 1$ als auch Integrin $\beta 4$ in HER2VEKA-Zellen hochreguliert und weisen eine starke Bande bei 130 bzw. 200 kDa auf. Außerdem konnte unter Verwendung phospho-spezifischer Antikörper gegen FAK (pY 397) und Paxillin (pY 118) eine verstärkte Aktivierung der jeweiligen Proteine in HER2VEKA-Zellen durch starke Signale auf Höhe von 125 bzw. 68 kDa nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war Fibronectin, ein für die Migration notwendiger Bestandteil der EZM, der von Tumorzellen selbst sezerniert werden kann (Chintala et al.,

1996), in den motilen HER2VE-Zellen vermehrt exprimiert, während in HER2VEKA-Zellen kaum eine korrespondierende Bande bei 240 kDa detektiert werden konnte. Nahm man den HER2N-Klon und die Parentalzellen mit in den Vergleich auf, so konnte man feststellen, dass sich die HER2N-Zellen im Expressionsmuster der einzelnen Proteine den HER2VE-Zellen annäherten, wohingegen die Parentalzellen ähnlich den HER2VEKA-Zellen reagierten (Abb 29). Es konnte hiermit belegt werden, dass nicht nur das Zell-Zell- sondern auch das Zell-Matrix-Adhäsionssystem von der unterschiedlichen HER2 Rezeptor Expression betroffen ist. Darüber hinaus scheinen die hier detektierten Expressionsmuster zum nicht-migrierenden Phänotyp der HER2VEKA-Zellen beizutragen.

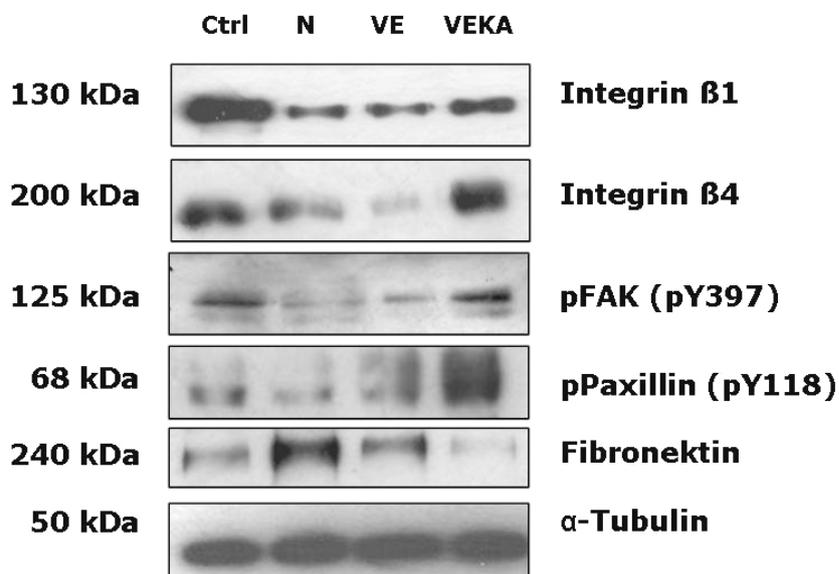


Abb 29: Expression N-Cadherin assoziierter Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle in LN18 Parentalzellen und stabilen HER2-Einzelklonen

Die Proteinexpression einiger Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle, wie Integrin β 1 und β 4, und FAK-assoziiierter Faktoren wie pFAK (pY 397) und pPaxillin (pY 118), sowie Fibronectin wurden durch Western Blot Analysen unter Verwendung spezifischer Antikörper ermittelt. Die Zellen wurden unter Standard Kulturbedingungen gehalten und wie in Material und Methoden beschrieben lysiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

2.5 siRNA gegen N-Cadherin in LN18 HER2VEKA Zellen

Da es mit den unter 2.4 genannten Ergebnissen erste Hinweise gibt, dass N-Cadherin eine wichtige Rolle im Migrationsverhalten der HER2 transfizierten LN18-Klone spielt, sollte im Folgenden die Signifikanz und Relevanz von N-Cadherin für die Migration in RNA Interferenz Experimenten bestätigt werden. Durch eine kommerziell erhältliche siRNA gegen N-Cadherin (siNcad) wurde das Protein in HER2VEKA-Zellen um bis zu 80 % herunterreguliert. Der Nachweis wurde im Western Blot mit anschließender densitometrischer Auswertung geführt (Abb 30 A, B).

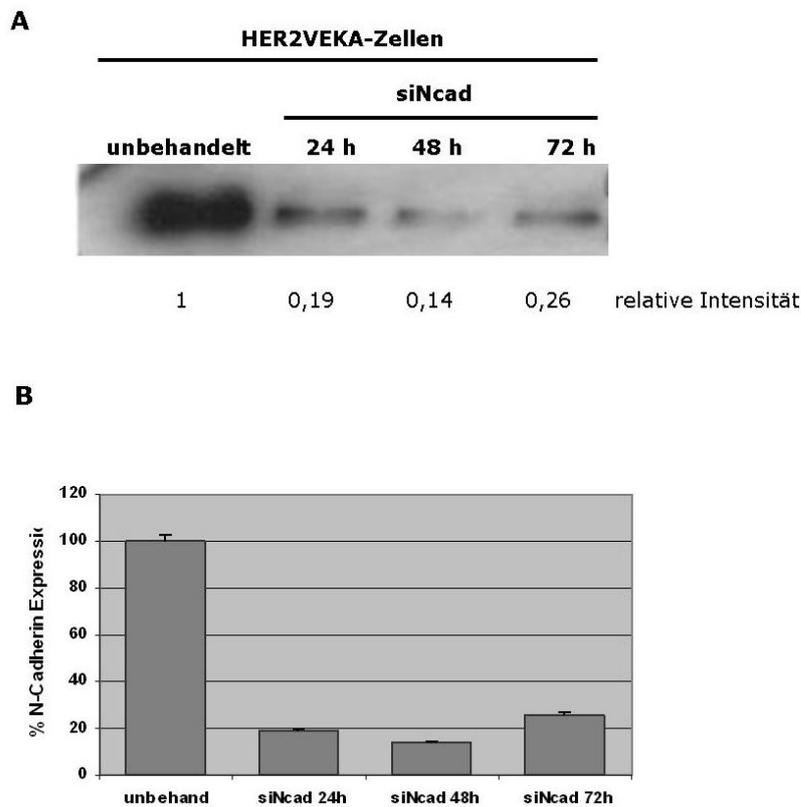


Abb 30: siRNA Behandlung gegen N-Cadherin (siNcad) in HER2VEKA-Zellen

HER2VEKA-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h mit 15 mM einer N-Cadherin spezifischen siRNA (siNcad) transfiziert und anschließend lysiert. (A) Die Abnahme der N-Cadherin Proteinexpression wurde im Western Blot unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers bestätigt. (B) Die densitometrische Auswertung unter Verwendung der Software ScionImage ergab eine durchschnittliche Abnahme der N-Cadherin Expression um 80 %. Die Grafik stellt den Mittelwert \pm der Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

Woundhealing Assays mit HER2VEKA-Zellen und die anschließende Auswertung belegten zudem, dass der motile Phänotyp fast bis auf das Level der HER2VE-Zellen wiederhergestellt werden konnte (Abb 31 A, B). Als Kontrolle dienten HER2VEKA-Zellen, die mit einer unspezifischen siRNA behandelt wurden (HER2VEKA Ctrl). Des Weiteren

zeigten Immunfluoreszenz Experimente, dass die Membranständigkeit des N-Cadherin im HER2VEKA-Klon nach siRNA Behandlung abgeschwächt war (Abb 32).

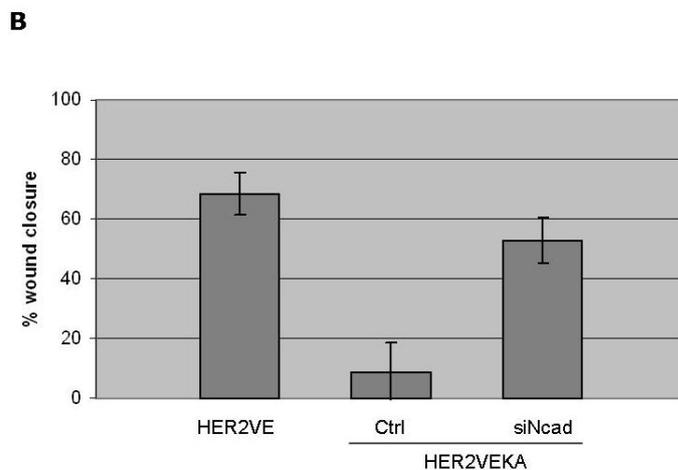
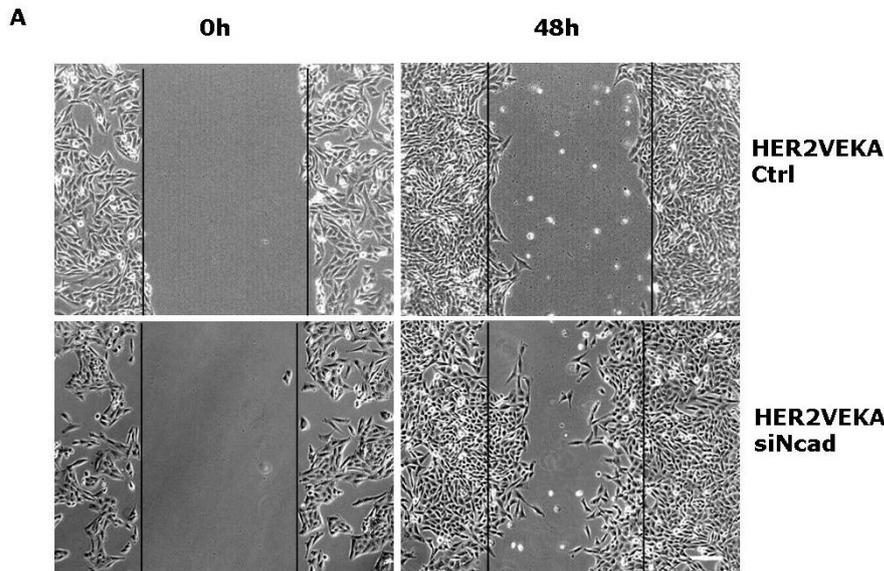


Abb 31: Migrationsverhalten siNcad-behandelter HER2VEKA-Zellen

(A) Die Woundhealing Assays wurden unter Standardkulturbedingungen und mit dem für siNcad etablierten Transfektionsprotokoll durchgeführt. Als Kontrolle dienten HER2VEKA-Zellen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurden. Die Zellen wurden jeweils zum Zeitpunkt des initialen Scratches (linke Spalte) und 48 h danach (rechte Spalte) mit einem inversen Mikroskop mit 10 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Dabei wurde jeweils dieselbe Stelle der Kulturschale fotografiert. Kontrast und Helligkeit wurden mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.5 von Zeiss reguliert. Die Linien bezeichnen die ursprünglichen Wundränder. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. (B) Der Wundschluß der siNcad behandelten HER2VEKA-Zellen und der zugehörigen Kontrollen wurde auf dem jeweiligen Bild gemessen und prozentual zur Ausgangsdistanz berechnet. Die Abbildung repräsentiert den Mittelwert \pm der Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

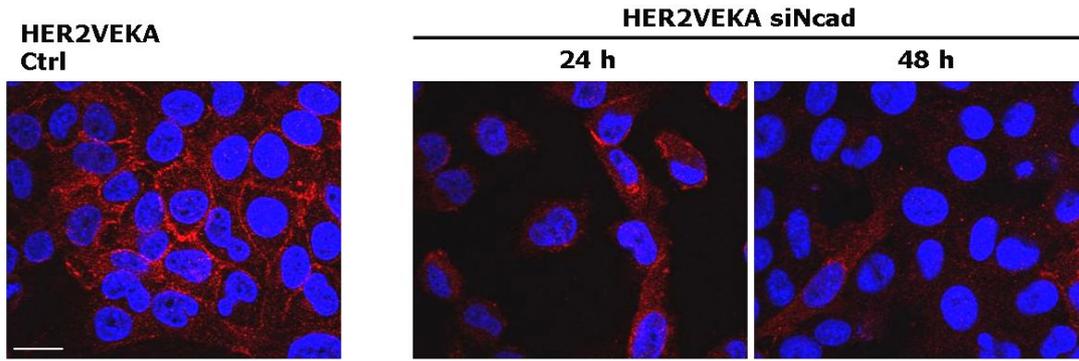


Abb 32: N-Cadherin Lokalisation in siNcad transfizierten HER2VEKA-Zellen

Immunfluoreszenzaufnahmen von siNcad behandelten HER2VEKA-Zellen zu den Zeitpunkten 24 bzw. 48 h nach Transfektion. N-Cadherin wurde mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert und unter Verwendung eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers im Cy3-Kanal eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops mit 63 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

3. Blockierung von EGF und HER2 Rezeptor führt zu erhöhter N-Cadherin Expression und verminderter Migration in HER2VE-Zellen

Um Aufschluss über den Anteil und den Einfluss der einzelnen Rezeptoren an der Regulation der N-Cadherin Expression und Lokalisation, und den Änderungen im Migrationsverhalten der HER2-Einzelklone zu erhalten, wurden sowohl der EGF als auch der HER2 Rezeptor mit verschiedenen Tyrosinkinase Inhibitoren (TKIs) blockiert. Die Blockierung wurde in HER2VE-Zellen entweder monospezifisch für EGF Rezeptor mit Tyrphostin AG1478 und für HER2 mit Tyrphostin AG825, oder bispezifisch für EGF und HER2 Rezeptor mit AEE788 für 24 Stunden durchgeführt (Osherov et al., 1993; Traxler et al., 2004).

Western Blot Analysen mit Lysaten aus Inhibitor-behandelten HER2VE-Zellen zeigten, dass nur die bispezifische Blockierung mit AEE788 zu einem Anstieg der N-Cadherin Proteinexpression führte, die mit der in HER2VEKA-Zellen vergleichbar war. Blockierung von nur einem der beiden Rezeptoren alleine, also entweder EGF oder HER2 Rezeptor, ließ keinen Anstieg der N-Cadherin Proteinexpression im Vergleich zu unbehandelten HER2VE-Zellen erkennen (Abb 33).

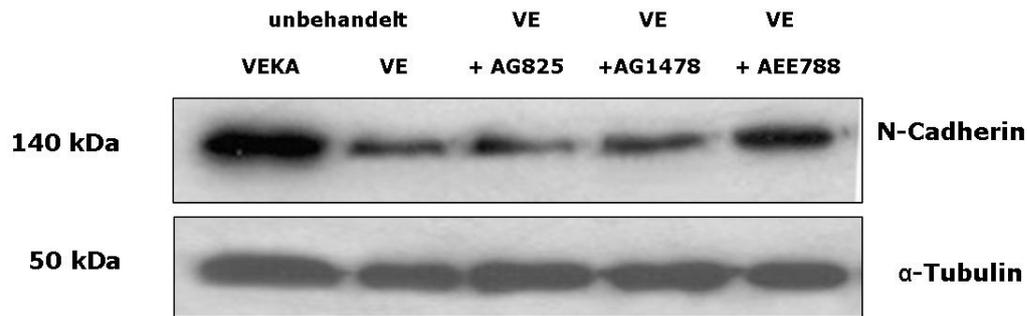


Abb 33: N-Cadherin Expression in Tyrosinkinase Inhibitor behandelten HER2VE-Zellen

HER2VE-Zellen wurden für 24 h mit den TKIs Tyrphostin AG1478 (10 μ M), AG825 (350 nM) und AEE788 (5 μ M) behandelt. Anschließend erfolgte nach Herstellung von Proteinlysaten die Detektion von N-Cadherin mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers. Als Kontrollen dienten DMSO-behandelte HER2VE- und HER2VEKA-Zellen. Als Ladekontrolle wurde die Expression von α -Tubulin überprüft.

Des Weiteren führte in HER2VE-Zellen nur die Behandlung mit dem bispezifischen Inhibitor AEE788 zur Rekrutierung von N-Cadherin an die Zell-Zell-Kontakte, die mit der Lokalisation in unbehandelten HER2VEKA-Zellen vergleichbar war (Abb 34).

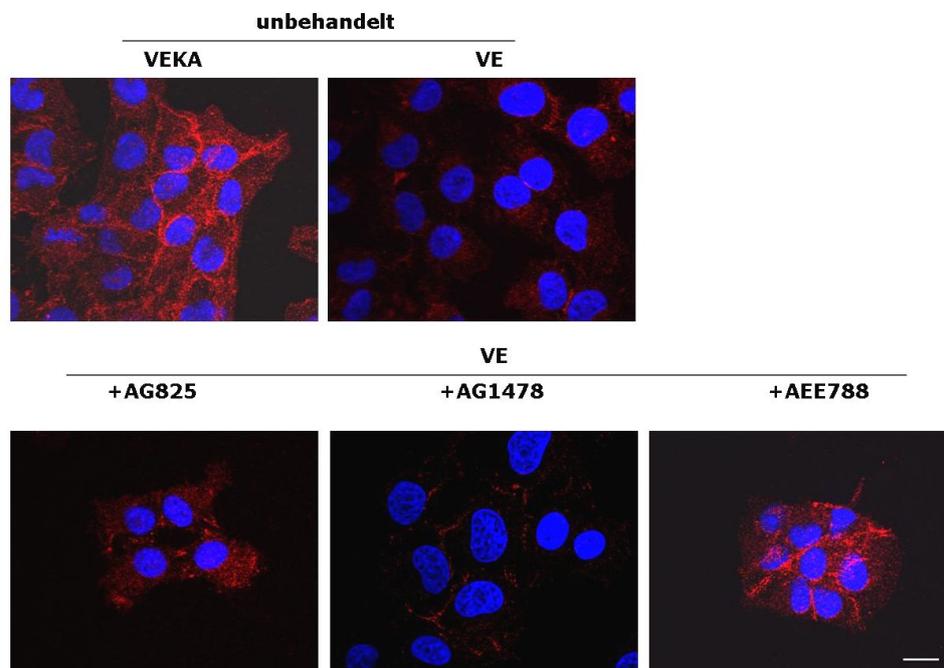


Abb 34: Immunfluoreszenzfarbung für N-Cadherin nach Inhibitorbehandlung für 24h in HER2VE-Zellen

HER2VE-Zellen wurden für 24 h mit den entsprechenden TKIs auf Deckgläschen inkubiert. Als Kontrollen dienten DMSO-behandelte HER2VE- und HER2VEKA-Zellen. N-Cadherin wurde unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers und eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers (rot) in einem Immunfluoreszenzexperiment detektiert und unter einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop mit 63 facher Objektivvergrößerung fotografiert. Die Kernfärbung erfolgte durch DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Die Ergebnisse der proteinbiochemischen Analysen konnten auch in zellbiologischen Assays bestätigt werden. In Woundhealing Assays wurde das Migrationsverhalten der HER2VE-Zellen nach Inhibitorbehandlung untersucht. Dabei konnte nach bispezifischer Blockade der Rezeptoren mit AEE788 ein vollkommener Migrationsstop der Zellen beobachtet werden. Die HER2VE-Zellen zeigten dabei die gleiche kolonienartige Morphologie und den festen Zellverband von unbehandelten HER2VEKA-Zellen. Im Falle einer monospezifischen Inhibition eines der beiden Rezeptoren mit AG1478 oder AG825, lag die Migrationsfähigkeit der Zellen im Bereich der unbehandelten und DMSO-behandelten HER2VE-Kontrollzellen (Abb 35).

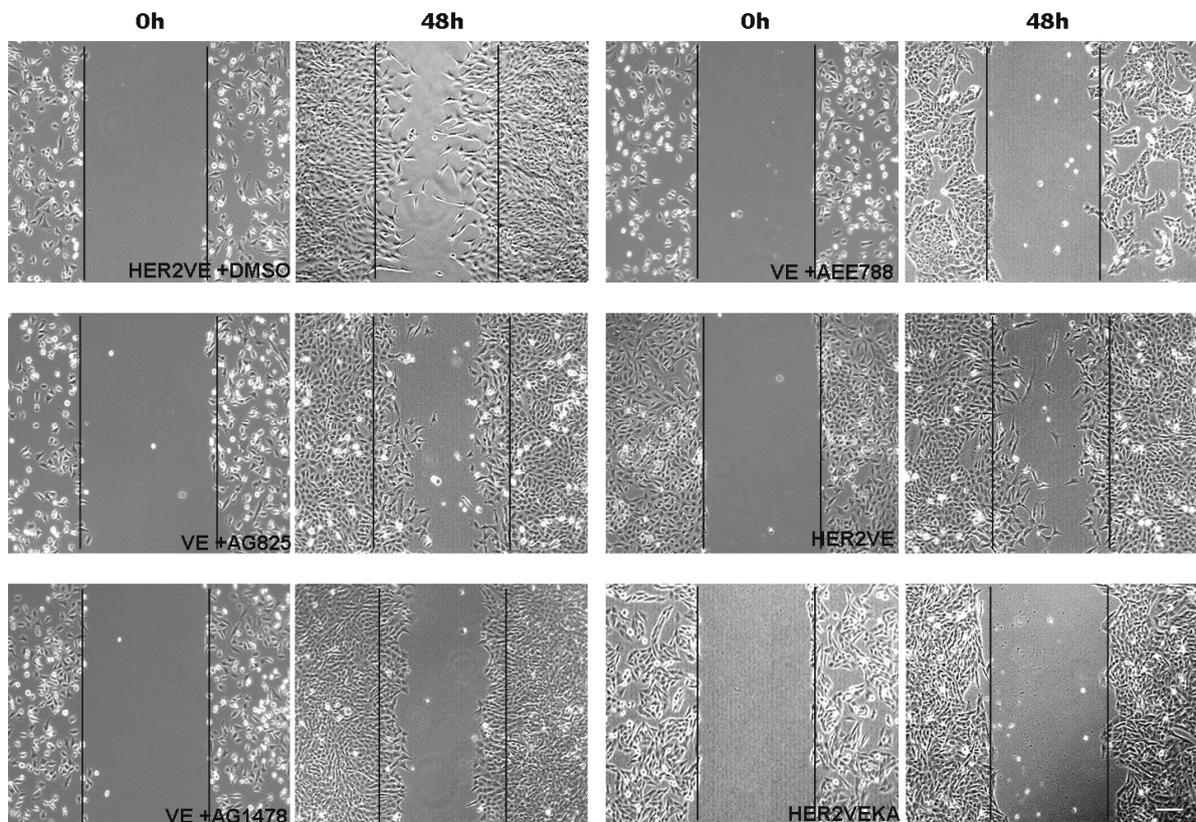


Abb 35: Woundhealing Assay zur Messung des Migrationsverhaltens von HER2VE und HER2VEKA transfizierten LN18 Zellen nach Inhibitorbehandlung

Die Zellen wurden für 48 h mit 10 μ M AG1478, 350 nM AG825 oder 5 μ M AEE788 unter Standardbedingungen kultiviert. Als Kontrollen dienten DMSO-behandelte und unbehandelte HER2VE-Zellen, sowie unbehandelte HER2VEKA-Zellen. Alle Zellen wurden jeweils zum Zeitpunkt des initialen Scratches (linke Spalte) sowie 48 h danach (rechte Spalte) mit einem inversen Mikroskop mit 10 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Dabei wurde jeweils dieselbe Stelle der Kulturschale fotografiert. Kontrast und Helligkeit wurden mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.5 von Zeiss reguliert. Die Linien bezeichnen die ursprünglichen Wundränder. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

4. Bestätigung der Ergebnisse in alternativen LN18 HER2N-, HER2VE- und HER2VEKA-Klonen und den Glioblastomzelllinien LN229 und G139

Um die Ergebnisse bezüglich der N-Cadherin Proteinexpression und der Unterschiede im Migrationverhalten, mit und ohne Inhibitorbehandlung als glaubhaft einstufen zu können, wurden die grundlegenden proteinbiochemischen und zellbiologischen Untersuchungen an alternativen LN18 HER2-Klonen (HER2N_2, HER2VE_2, HER2VEKA_2), sowie in anderen permanenten Glioblastomzelllinien erneut durchgeführt. Dafür wurden die Zelllinien LN229 und G139 gewählt, da in diesen Zelllinien sowohl der EGF Rezeptor als auch HER2 endogen ausreichend stark exprimiert werden (Abb 36).

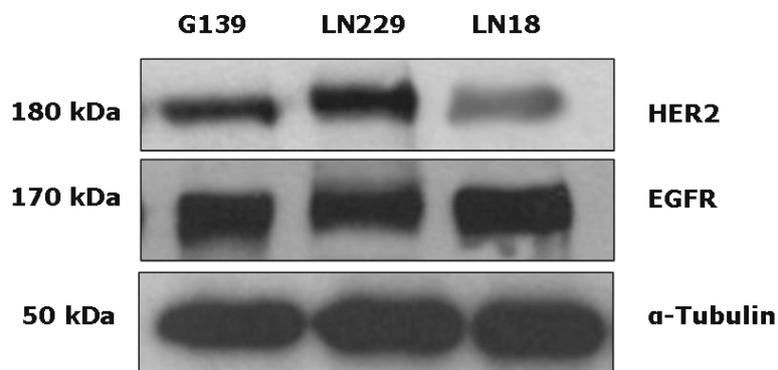


Abb 36: EGF Rezeptor und HER2 Rezeptor Expression in verschiedenen Glioblastomzelllinien

Sie sollen als Vergleichszelllinien für LN18 HER2VE-Zellen in den oben beschriebenen Inhibitor Experimenten dienen, da entweder EGFR oder HER2, oder beide gemeinsam inhibiert werden müssen. Auf diese Weise soll ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse ein Transfektions-Artefakt darstellen und allgemeine Gültigkeit besitzen.

Als alternative LN18 HER2-Klone wurden erneut Klone mit mittelstarker HER2 Expression ausgewählt (Abb 37). Es wurde mittels Western Blot die Aktivierungsstärke des EGF Rezeptors und HER2 mit prinzipiell gleicher Signalverteilung wie in den zunächst untersuchten Klonen bestätigt; HER2N_2- und HER2VE_2-Zellen zeigten ein stärkeres pEGFR (pY 1086) Signal als HER2VEKA_2- und Parentalzellen. Im Falle der HER2 Aktivierung (pY 1248) zeigte sich im Allgemeinen ein schwächeres Signal, aber auch hier war eine konstitutive Aktivierung des HER2VE_2 Rezeptors deutlich erkennbar. Allerdings war außerdem eine konstitutive Aktivierung des HER2N_2 Rezeptors nachweisbar. Parentalzellen und HER2VEKA_2-Zellen zeigten in keinem Fall eine HER2 Phosphorylierung (Abb 37). Im Rahmen der Untersuchung der EGF Rezeptor abhängigen Signalweiterleitung wurden der PI3K/Akt und der MAPK Signalweg in den alternativen

HER2-Einzelklonen untersucht. Auch hier zeigte die Tendenz zu einer geringeren Akt bzw MAPK Aktivierung in HER2VEKA_2- und einer stärkeren Aktivierung in HER2VE_2-Zellen. Eine konstitutive Aktivierung der MAPK in unstimulierten Zellen war nur in HER2VE_2-Zellen detektierbar, konstitutive Aktivierung von Akt ohne Stimulierung war in allen Klonen außer HER2VEKA_2 nachweisbar (Abb 37).

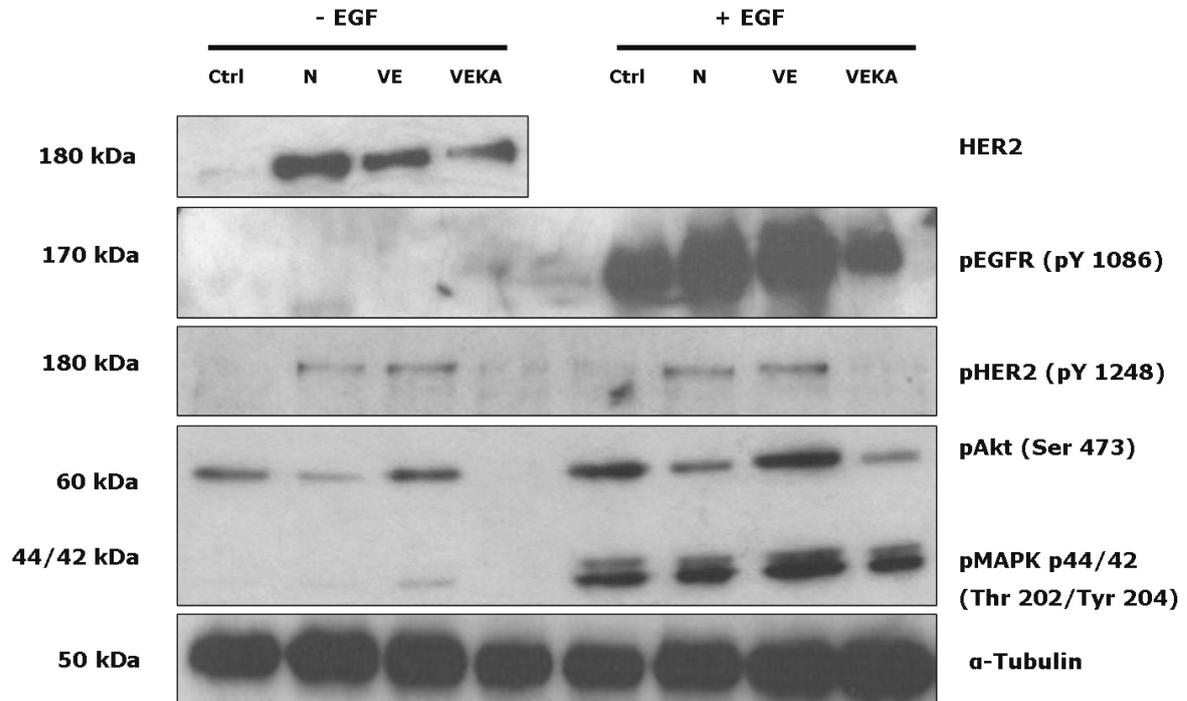


Abb 37: Expression und Aktivierung des EGF bzw. HER2 Rezeptors, sowie der Signalmoleküle Akt und MAPK in alternativen LN18 HER2-Einzelklonen

Die alternativ ausgewählten HER2-Klone wurden bezüglich Expression und Aktivierung des EGFR (pY 1086) bzw. HER2 (pY 1248), sowie Akt (pSer 473) und MAPK (pThr 202/ Tyr 204) mittels Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper untersucht. Dafür wurden die Zellen nach 24 h in serumfreier Kultur für 5 Minuten mit 100 ng/ml EGF stimuliert und anschließend lysiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

Auch die Analyse der N-Cadherin Proteinexpression konnte die ersten Untersuchungen bestätigen. HER2N_2- und HER2VE_2- Zellen zeigten eine geringere N-Cadherin Expression als HER2VEKA_2- und Parentalzellen (Abb 38 A). Nicht nur das Expressionsmuster blieb identisch, auch die Lokalisation des N-Cadherin an der Membran war erneut nur bei HER2VEKA_2 vorzufinden. Alle anderen Zellklone zeigten eine zytoplasmatische N-Cadherin Verteilung (Abb 38 B).

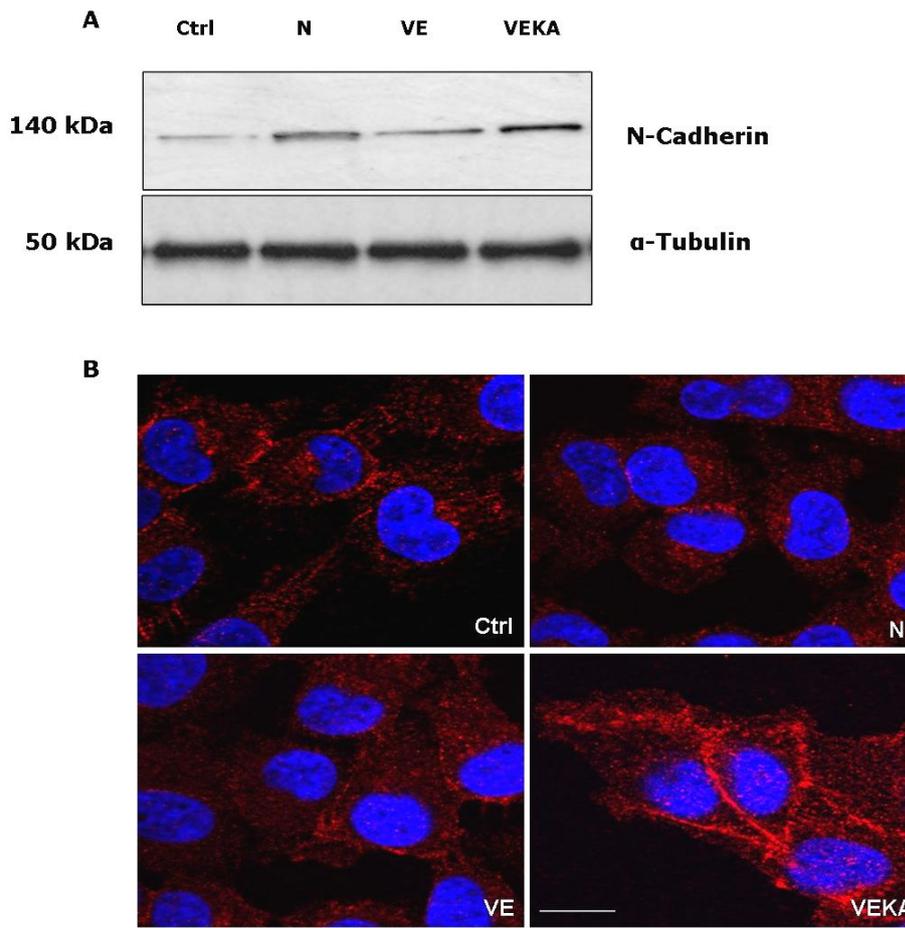


Abb 38: Expression und Lokalisation von N-Cadherin in LN18 Kontrollzellen sowie alternativen HER2 Rezeptor transfizierten Klonen HER2N_2, HER2VE_2 und HER2VEKA_2

(A) Die Expression des N-Cadherins wurde mittels Western Blot Analyse in den einzelnen HER2-Klonen unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers ermittelt. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. (B) Die Lokalisation des N-Cadherins wurde mittels Immunfluoreszenz durch Inkubation mit einem spezifischen Anti-N-Cadherin Antikörper ermittelt. Ein Cy3-gekoppelter Sekundärantikörper diente der Detektion durch ein Fluoreszenzmikroskop mit 63 facher Objektivvergrößerung. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Darüber hinaus wurde das Migrationsverhalten der alternativen LN18 HER2-Klonen mittels Woundhealing Assay unter serumfreien Bedingungen untersucht; hierbei zeigten HER2VEKA_2-Zellen erneut keinerlei Migration, während HER2VE_2-Zellen im Vergleich zu HER2N_2- und Parentalzellen eine Zunahme der Migration aufzeigen konnten (Abb 39).

Die grundlegenden Experimente wurden unter Verwendung alternativer HER2 transfizierter LN18- Einzelzellklone wiederholt. Die erhaltenen Ergebnisse konnten damit verifiziert werden, da die Tendenzen bezüglich Proteinexpression, –aktivierung und -lokalisierung, sowie des Migrationsverhaltens in die gleiche Richtung wiesen.

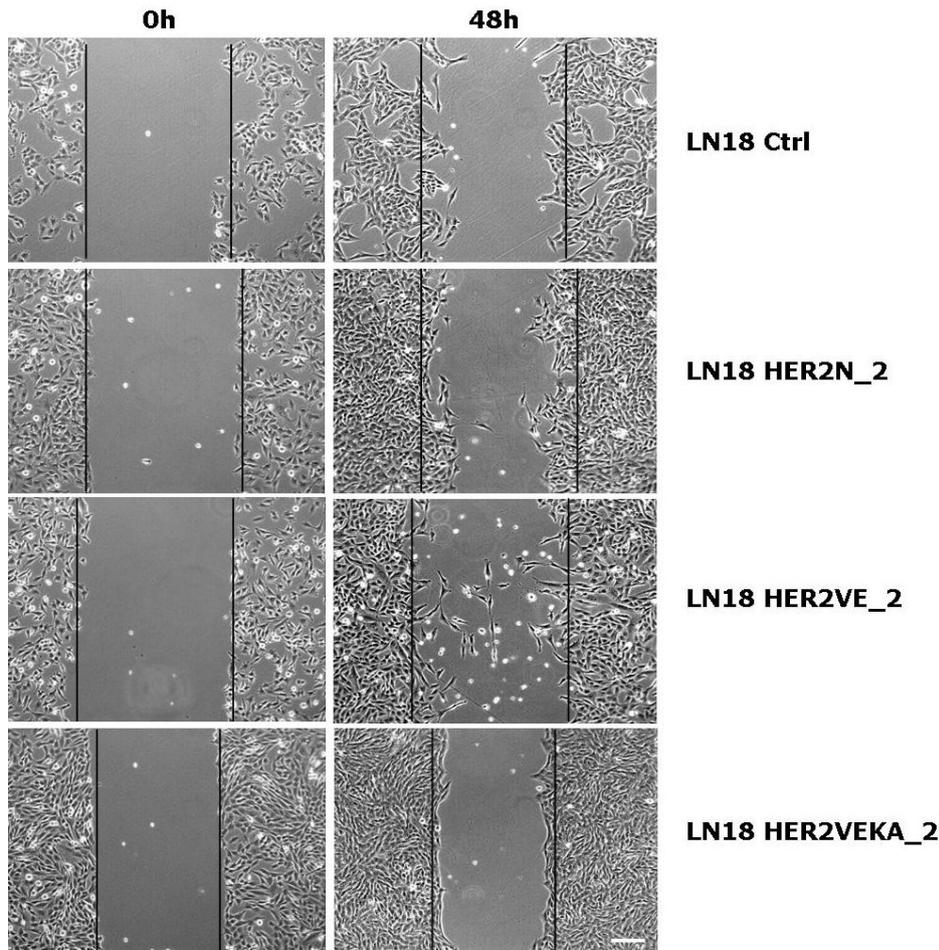


Abb 39: Woundhealing Assay zur Messung des Migrationsverhaltens von LN18 Parentalzellen (Ctrl) und den alternativen Transfektanten HER2N_2, HER2VE_2 und HER2VEKA_2

Die Zellen wurden jeweils zum Zeitpunkt des initialen Scratches (linke Spalte) und 48 h danach (rechte Spalte) mit einem inversen Mikroskop mit 10 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Dabei wurde jeweils dieselbe Stelle der Kulturschale fotografiert. Während der Durchführung des Woundhealing Assays wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Kontrast und Helligkeit wurden mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.5 von Zeiss reguliert. Die Linien bezeichnen die ursprünglichen Wundränder. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Die Glioblastomzelllinien LN229 und G139 wurden hinsichtlich ihrer N-Cadherin Expression, und die Reaktion auf Behandlung mit den TKIs, AG1478, AG825 und AEE788 getestet.

LN229 zeigte endogen eine höhere N-Cadherin Expression als LN18, in G139 hingegen war die schwächste Immunreaktion aller drei Zelllinien im Western Blot detektierbar. Nach Behandlung mit unterschiedlichen Inhibitoren zeigte die AG1478- sowie die AG825-Behandlung keinerlei Effekt auf die N-Cadherin Expression, wie auch schon in LN18 HER2VE-Zellen gezeigt werden konnte. Es genügte somit auch in LN229 und G139 nicht, eine monospezifische Blockierung der Rezeptoren, also entweder EGFR oder HER2, durchzuführen. Nur die bispezifische Behandlung mit AEE788 führte zu einer leichten

Erhöhung der N-Cadherin Expression, wobei die Unterschiede in LN229 und G139 nicht so stark waren wie in LN18 HER2VE (Abb 40).

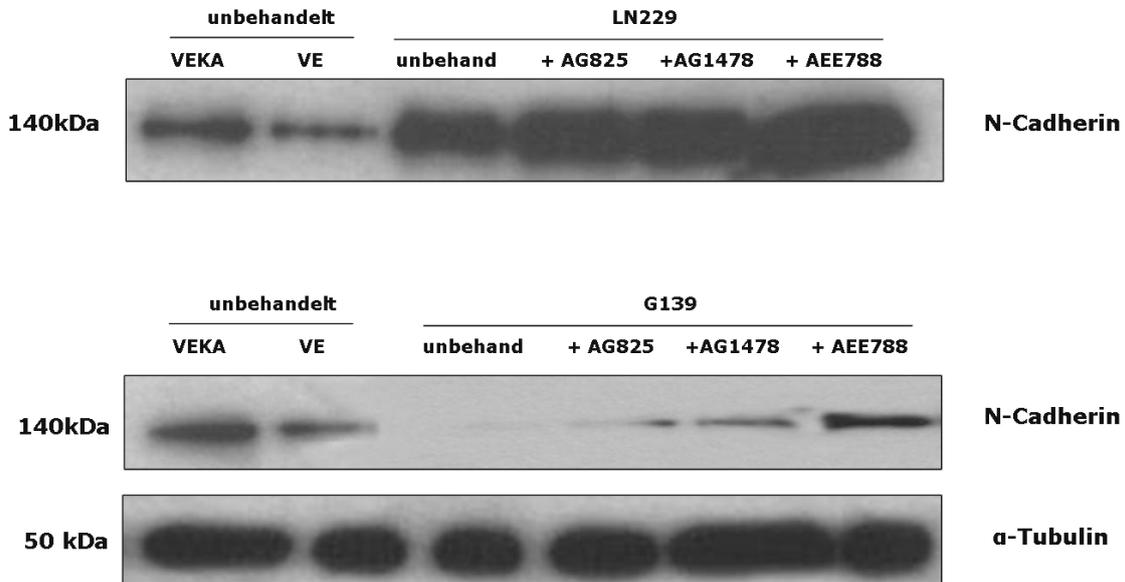


Abb 40: N-Cadherin Expression in den Glioblastomzelllinien LN229 und G139 nach TKI Behandlung

Zellen der Linien LN229 und G139 wurden für 24 h mit den TKIs Tyrphostin AG1478 (10 μ M), AG825 (350 nM) und AEE788 (5 μ M) behandelt. Anschließend erfolgte nach Herstellung von Proteinlysaten die Detektion von N-Cadherin mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers. Als Kontrollen dienten DMSO-behandelte LN18 HER2VE- und HER2VEKA-Zellen, sowie DMSO-behandelte Zellen der jeweiligen Zelllinie. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

In LN229 und G139 wurde die Lokalisation des N-Cadherin nach Inhibitorbehandlung mittels Immunfluoreszenz bestimmt. Es zeigte sich sowohl in LN229 als auch in G139 Zellen nur in den mit AEE788 behandelten Proben eine massive membranständige Lokalisation des N-Cadherin. In Abbildung 41 wurde das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinie LN229 exemplarisch dargestellt (Abb 41).

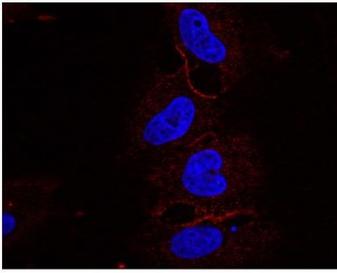
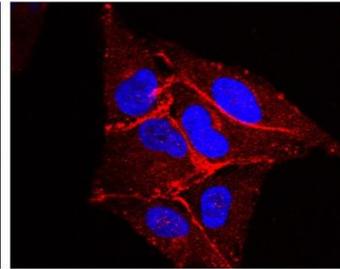
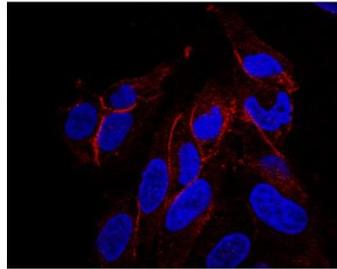
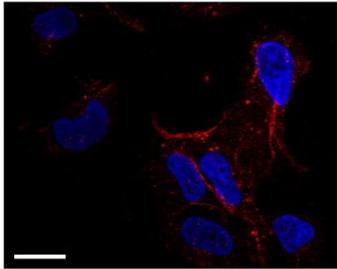
LN229unbehandelt**LN229****+AG825****+AG1478****+AEE788**

Abb 41: Immunfluoreszenzfärbung für N-Cadherin nach Inhibitorbehandlung für 24 h in der Glioblastomzelllinie LN229

LN229 Zellen wurden für 24 h mit den entsprechenden TKIs auf Deckgläschen inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte LN229 Zellen. N-Cadherin wurde unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers und eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers (rot) in einem Immunfluoreszenzexperiment detektiert und unter einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop mit 63 facher Objektivvergrößerung fotografiert. Die Kernfärbung erfolgte durch DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Des Weiteren ließen sich auch die Ergebnisse bezüglich des Migrationsverhaltens nach Inhibitorbehandlung verifizieren. Somit konnte lediglich durch bispezifische Blockierung beider Rezeptoren mit AEE788, die Migration sowohl in LN229, als auch in G139 verringert werden. Durch monospezifische Blockierung war kein inhibierender Effekt bezüglich der Migration messbar. Es wurde die Zelllinie G139 exemplarisch dargestellt (Abb 42).

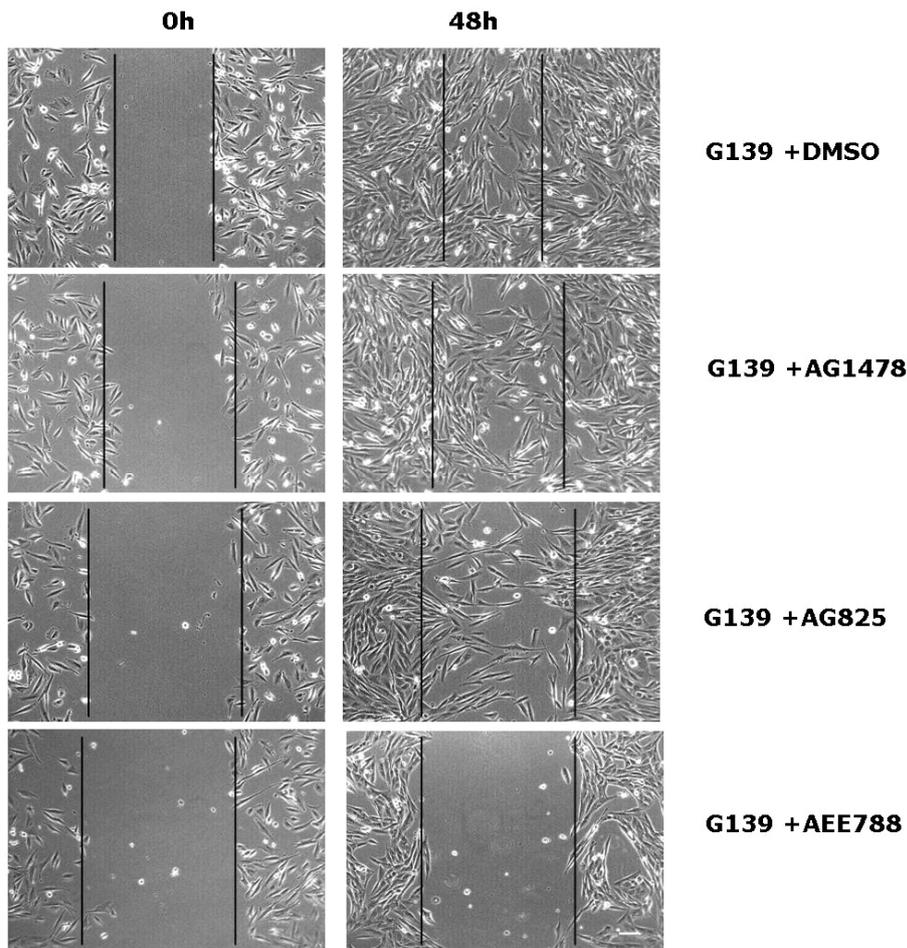


Abb 42: Woundhealing Assay zur Messung des Migrationsverhaltens der Zelllinie G139 nach Inhibitorbehandlung

Die Zellen wurden für 48 h mit 10 μM AG1478, 350 nM AG825 oder 5 μM AEE788 unter Standardbedingungen kultiviert. Als Kontrollen dienten DMSO-behandelte G139 Zellen. Alle Zellen wurden jeweils zum Zeitpunkt des initialen Scratches (linke Spalte) sowie 48 h danach (rechte Spalte) mit einem inversen Mikroskop mit 10 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Dabei wurde jeweils dieselbe Stelle der Kulturschale fotografiert. Kontrast und Helligkeit wurden mit der Bildverarbeitungssoftware AxioVision 4.5 von Zeiss reguliert. Die Linien bezeichnen die ursprünglichen Wundränder. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Die Ergebnisse deuten an, dass die in LN18 gefundenen Phänomene bezüglich N-Cadherin Proteinexpression, Migrationsverhalten und Beteiligung der einzelnen Rezeptoren an diesen Prozessen, in Glioblastomzellen allgemeine Gültigkeit besitzen könnten.

III. N-Cadherin Expression und Lokalisation in humanem glialen Tumorgewebe lässt eine Unterscheidung von Tumorzentrum und Infiltrationszone zu

N-Cadherin spielt offenbar bei der Tumorigenese und Progression von Glioblastomen eine große Rolle, wobei genauere Mechanismen nicht bekannt sind. Es existieren einige z. T. immunhistochemische Studien zu diesem Themengebiet, wobei die Stärke der N-Cadherin Expression im Gewebe mit dem Tumorgrad in Verbindung gebracht wird und direkt korreliert. In anderen Studien hingegen konnte keinerlei Verbindung zwischen der N-Cadherin Expression und dem Tumorgrad in glialen Tumoren gefunden werden. Eine *in vitro* Studie, in der die Ratten Gliomzelllinie C6 verwendet wurde, sieht einen Zusammenhang von N-Cadherin Expression mit verstärkter Adhäsion der Zellen. Die bisher gefundenen Ergebnisse sind also widersprüchlich und werden kontrovers diskutiert (Barami et al., 2006).

1. Expression und Lokalisation von N-Cadherin im Glioblastom *in situ*

In den oben dargestellten Ergebnissen wurde *in vitro* ein Zusammenhang zwischen N-Cadherin Expression, membranständiger Lokalisation und verminderter Zellmigration gefunden. Daher war es im Rahmen einer biologischen Fragestellung interessant, die N-Cadherin Expression gemeinsam mit der Lokalisation in humanem Tumorgewebe *in situ* zu untersuchen und zu beurteilen. Dabei wurden Gewebelöcke ausgewählt, die sowohl Tumorzentrum, sowie Tumorrand, als auch Infiltrationszone enthielten. Dabei ging es weniger um eine quantitative Aussage, als vielmehr darum, die *in vitro* gefundenen Ergebnisse auch im Tumor qualitativ verifizieren zu können.

Es wurden 26 Glioblastomfälle ausgewählt, immunhistochemisch aufgearbeitet und die N-Cadherin Expression mittels eines spezifischen Anti-N-Cadherin Antikörpers detektiert.

Dabei wurde deutlich, dass innerhalb eines Präparates Unterschiede in der N-Cadherin Expression und Lokalisation nachzuweisen waren. Im Tumorzentrum war die Expression in 65 % der Fälle stark bis sehr stark, nahm dann im Randbereich bereits auf 50 % ab, während in der Infiltrationszone nur noch bei 11 % aller Fälle eine hohe N-Cadherin Expressionsstärke vorzufinden war.

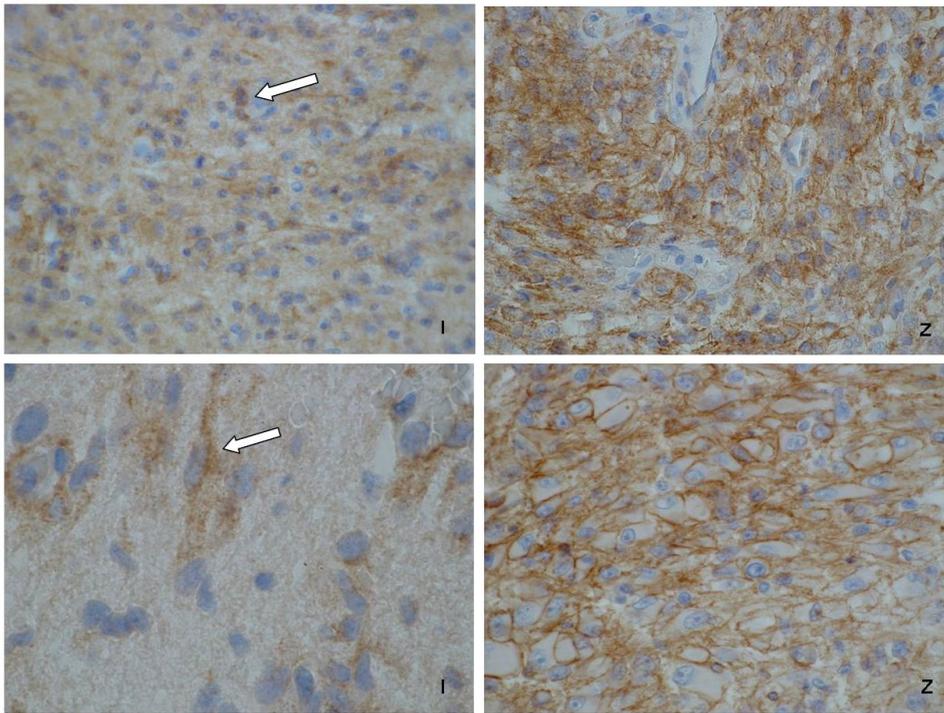
Des Weiteren wurde die Lokalisation von N-Cadherin innerhalb der positiven Zellen, in den verschiedenen Tumorbereichen von einem Neuropathologen beurteilt. Es wurde der prozentuale Anteil an Tumorzellen pro Gesichtsfeld ermittelt, der eine membranständige N-Cadherin-Färbung aufwies (Tabelle 5).

Tabelle 5: Prozentuale Anteile zytoplasmatischer bzw. membranständiger N-Cadherin Lokalisation in den untersuchten Tumorbereichen

Fall	Tumorzentrum (%)		Tumorrand (%)		Infiltrationszone (%)	
	zytoplasm.	membranös	zytoplasm.	membranös	zytoplasm.	membranös
1	90	10	90	10	100	0
2	40	60	60	40	80	20
3	30	70	70	30	90	10
4	10	90	50	50		
5	20	80	20	80		
6	30	70	60	40	100	0
7	30	70	90	10	90	10
8	80	20	80	20	80	20
9	30	70	60	40	80	20
10			90	10	100	0
11	25	75	50	50	60	40
12	20	80	35	65	80	20
13	5	95	50	50	75	25
14	30	70	60	40	80	20
15	10	90	40	60		
16	20	80	80	20	80	20
17	50	50	70	30	80	20
18	40	60				
19	40	60	80	20	100	0
20	40	60	70	30		
21	40	60	60	40	80	20
22	20	80	50	50	70	30
23	70	30	90	10	100	0
24	30	70	70	30	80	20
25	40	60	60	40	80	20
26	60	40	80	20	100	0

Während N-Cadherin im Tumorzentrum weitgehend membranständig und mit einer kräftigen Expression lokalisiert war, zeigte sich in der Infiltrationszone fast ausschließlich eine zytoplasmatische Verteilung des Proteins, die mit einer schwächeren Proteinexpression einherging. Der Tumorrand stellte hierbei, wie auch bei der Proteinexpression, einen Übergangsbereich aus zytoplasmatischen und membranständigen Anteilen dar (Abb 43 A, B).

A



B

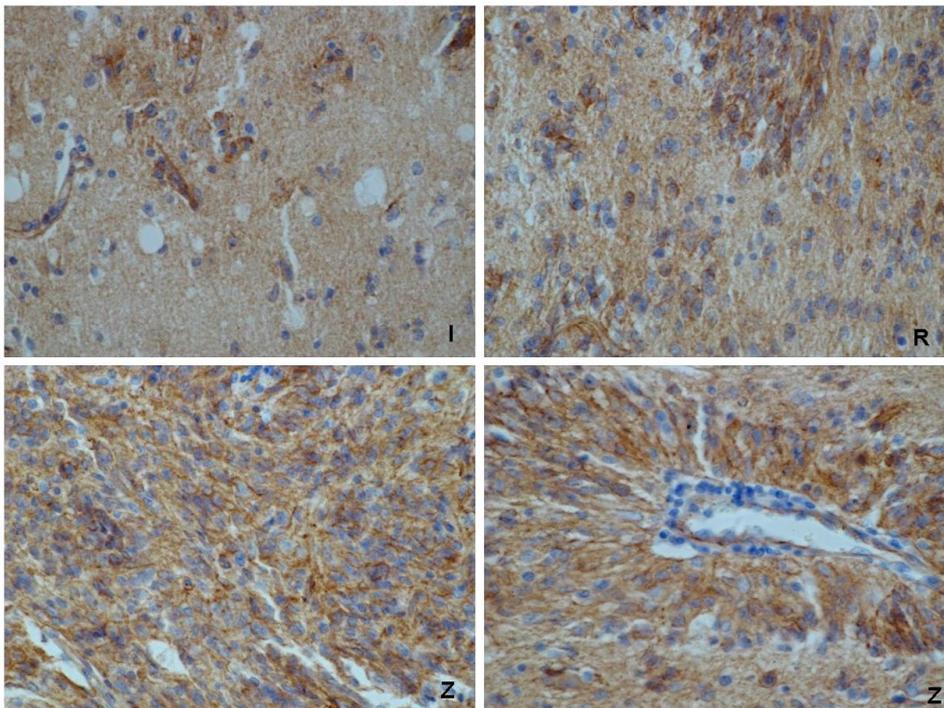


Abb 43: N-Cadherin Lokalisation in verschiedenen Tumorbereichen des Glioblastoms

Immunhistochemie der N-Cadherin Expression in zwei exemplarischen Fällen. (A) Darstellung zweier Bereiche desselben Tumors, in zwei verschiedenen Objektivvergrößerungen fotografiert. In den linken Bildern sind Ausschnitte der Infiltrationszone (I), in den rechten Bildern Auschnitte des Tumorzentrums (Z) dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen zytoplasmatisch gefärbte Tumorzellen der Infiltrationszone. (B) Darstellung der drei Bereiche Infiltrationszone (I), Tumorrand (R) und Tumorzentrum (Z) eines Falles. Die Abbildung rechts unten stellt eine Sonderform, das Astroblastom dar.

Zur weiteren Verdeutlichung der Unterschiede zwischen Tumorzentrum und Infiltrationszone bezüglich der N-Cadherin Lokalisation, wurden in Abbildung 44 die prozentualen Anteile an membranständiger, bzw. zytoplasmatischer Lokalisation aus Tabelle 5 als Grafik dargestellt und zudem mit Hilfe des Wilcoxon signed ranks Test statistisch ausgewertet.

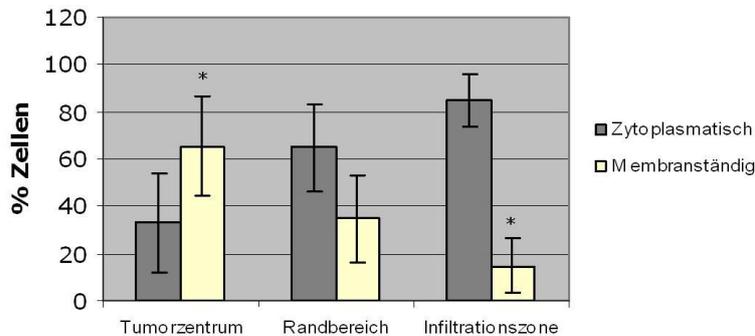


Abb. 44: Grafische Darstellung der zytoplasmatischen und membranständigen Anteile der N-Cadherin Lokalisation in den verschiedenen Tumorbereichen

Für die Darstellung wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Werte nach Lokalisation und Tumorbereich gemittelt und \pm der Standardabweichung aufgetragen. Der statistische Vergleich membranständiger Zellen in Tumorzentrum und Infiltrationszone wurde mit dem Wilcoxon signed ranks Test durchgeführt. * $p \leq 0,001$.

Das Glioblastom ist ein sehr stark infiltrativ wachsender Tumor. Dies bedeutet, dass die Zellen im Tumorzentrum nicht motil sein müssen, im Randbereich und v. a. in der Infiltrationzone jedoch schon. Es konnte hier somit gezeigt werden, dass migrierende Zellen eine geringere N-Cadherin Proteinexpression, und zudem eine vorwiegend zytoplasmatische Verteilung innerhalb der Zelle aufweisen. In nicht-migrierende Zellen jedoch, wurde eine stärkere N-Cadherin Expression und außerdem eine hauptsächlich membranständige Lokalisation gefunden. Dies bestätigt die in der Zellkultur gewonnenen Ergebnisse, da dort auch nur die nicht-migrierenden HER2VEKA-Zellen sowohl eine starke N-Cadherin Expression, als auch eine hohe membranständige Verteilung des Proteins aufzeigten. In den hoch motilen HER2VE-Zellen hingegen lag eine schwache und zugleich zytoplasmatische Proteinverteilung zugrunde.

2. N-Cadherin und pEGFR (pY1086) Coimmunfluoreszenz an Glioblastom Gewebeschnitten

In den Zellkulturexperimenten wurde ein Zusammenhang zwischen dem EGF/HER2 Rezeptor Aktivierungsstatus und einer veränderten N-Cadherin Expression bzw. Lokalisation gesehen. Um auch in den Tumoren Einblicke in diese Zusammenhänge bekommen zu können, wurden Gewebeschnitte gewählt die einen hohen Anteil an membranständigem N-Cadherin im Tumorzentrum, sowie einen hohen Anteil an zytoplasmatisch lokalisiertem N-Cadherin in der Infiltrationszone des jeweiligen Tumors enthielten. Die Schnitte wurden mittels Doppel-Immunfluoreszenz hingehend ihrer N-Cadherin bzw. pEGFR (pY 1086) Expression bzw. Aktivierung untersucht. Dabei konnte wiederum eine Unterscheidung in Tumorzentrum und Infiltrationszone gemacht werden. Im Tumorzentrum war ein, wie schon in der Immunhistochemie ermittelt, membranständiges N-Cadherin Signal (Cy3, rot) detektierbar. Gleichzeitig war in diesem Bereich kaum EGF Rezeptor Aktivierung (FITC, grün) nachweisbar. In der Infiltrationszone war kaum membranständiges N-Cadherin, jedoch ein erhöhter Anteil an membranständigem, aktiviertem EGF Rezeptor im Vergleich zum Tumorzentrum vorzufinden (Abb 45).

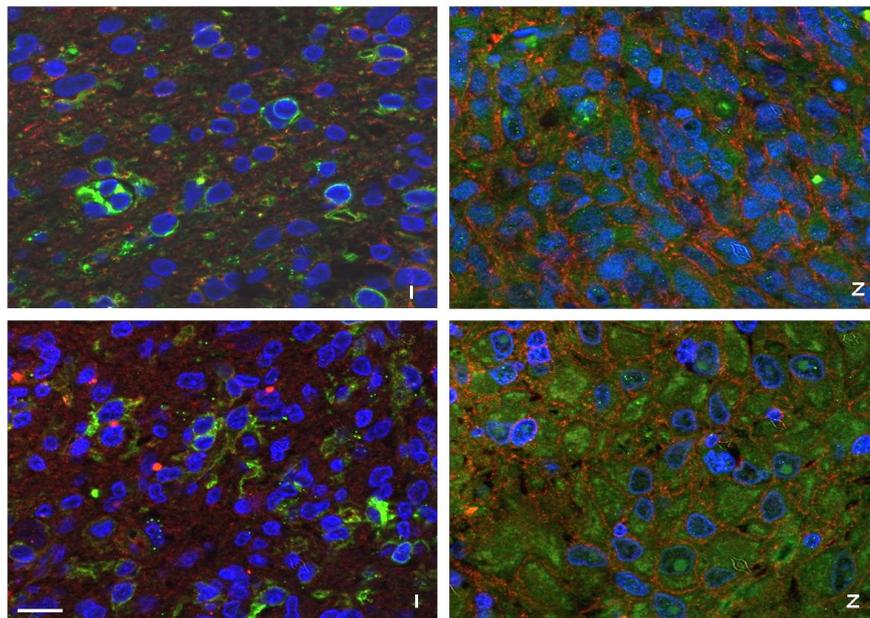


Abb 45: Coimmunfluoreszenz von N-Cadherin und pEGFR (pY1086) an Glioblastom Gewebeschnitten

Immunfluoreszenzfärbung am Gewebeschnitt gegen N-Cadherin und pEGFR (pY1086) in zwei exemplarischen Fällen. Die linke Seite zeigt jeweils die Infiltrationszone (I) des Tumors, die rechte Seite das Tumorzentrum (Z). N-Cadherin wurde mittels eines Cy3-gekoppelten (rot) Sekundärantikörpers detektiert, pEGFR mittels eines FITC-gekoppelten (grün). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einer digitalen Kamera, in 40 facher Objektivvergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

D. Diskussion

Das Glioblastom ist mit 60-75 % aller astrozytärer Tumoren die häufigste primäre Neoplasie des ZNS (Ohgaki and Kleihues, 2005). Das diffuse und infiltrierende Wachstum dieser Tumoren in umliegende Hirnstrukturen ist das größte Problem in der Neuroonkologie, da weder durch Resektion noch durch Bestrahlung alle Tumorzellen entfernt und erfasst werden können. Trotz optimierter Therapieansätze in Kombination mit Chemotherapie ist das Auftreten von Rezidiven die Regel, da diese Tumoren eine hohe Strahlen- und Chemoresistenz aufweisen (Hofer and Herrmann, 2001).

Überexpression des EGF Rezeptors und damit eine fehlregulierte Signaltransduktion, sind in vielen Krebserkrankungen zu finden. Die Mechanismen und weitere Signalmoleküle im EGF Rezeptor Netzwerk, die zur Transformation und somit zu maligner Entartung der Zellen führen, sind nicht vollständig geklärt. Die EGF Rezeptor Signaltransduktion ist in Prozesse wie Proliferation, Anti-Apoptose, Angiogenese, Migration und Invasion involviert, wobei es auf die Dimerisierungspartner der jeweiligen Rezeptoren ankommt, welche Signalwege aktiviert werden (Holbro et al., 2003; Jorissen et al., 2003).

In über 40 % aller primären Glioblastome ist das *EGFR* Gen amplifiziert, häufig auch in Kombination mit strukturellen Abberationen des Rezeptors, z. B. EGFR vIII (Ekstrand et al., 1994; Schlegel et al., 1994a). Die tumorbiologische Bedeutung dieses Charakteristikums konnte jedoch bis heute nicht geklärt werden.

In vielen Tumorerkrankungen spielt die Überexpression des HER2 Rezeptors v. a. für Invasion und Migrationsprozesse eine große Rolle (Yarden, 2001) und auch für das Glioblastom wird ein Zusammenhang von HER2 Expression mit schlechter Prognose und erhöhter Mortalität angenommen (Koka et al., 2003; Mineo et al., 2007; Potti et al., 2004; Schwechheimer et al., 1998), wobei hier keine einheitliche Meinung herrscht und auch Studien existieren, die keinen Zusammenhang zwischen HER2 Expression und der Pathogenese des Glioblastoms sehen (Haynik et al., 2007).

In vorliegender Arbeit sollte der Einfluss und die Signifikanz des HER2 Rezeptors im EGF Rezeptor Netzwerk und auf die dadurch aktivierten Signalkaskaden im Zusammenhang mit Migrationsverhalten und Invasion in humanen glialen Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurde die, den EGF Rezeptor überexprimierende, Glioblastomzelllinie LN18 (Diserens et al., 1981) mit unterschiedlichen HER2 Rezeptor Konstrukten (HER2N, HER2VE und HER2VEKA) (Messerle et al., 1994) transfiziert und anschließend charakterisiert. Die HER2 Rezeptor Konstrukte beinhalten Mutationen, die den HER2 Rezeptor entweder konstitutiv aktivieren (HER2VE), oder in dominant-negativer Weise inaktivieren (HER2VEKA). Desweiteren wurde der wildtyp Rezeptor HER2N transfiziert. Die Mutationen wurden generiert und kommen in humanen Tumoren natürlicherweise nicht vor. Diese Rezeptorkonstrukte dienten in vorliegender Arbeit als Hilfsmittel und

Instrument, um die Aktivierung des EGF Rezeptors in HER2 abhängiger Weise zu modulieren und die EGF Rezeptor vermittelte Signaltransduktion zu modifizieren. Dadurch sollte der Einfluss von HER2 auf die Signalkaskaden im EGF Rezeptor Netzwerk und die Relevanz dessen für gliale Tumorzellmigration und Invasion, v. a. als Heterodimere mit dem EGF Rezeptor, näher beleuchtet und besser verstanden werden. Aus diesem Grund wurde für diesen Ansatz die etablierte Glioblastomzelllinie LN18 ausgewählt, da dort eine EGF Rezeptor Überexpression vorliegt, jedoch kaum endogener HER2 Rezeptor nachweisbar ist.

Bislang liegen in glialen Tumoren auf diesem Gebiet noch keine ausreichenden Untersuchungen vor. Durch die Überexpression sowohl des EGF als auch des HER2 Rezeptors in diesen Tumoren könnte diesem Sachverhalt jedoch therapeutische Relevanz zukommen. Es ist von größter Wichtigkeit, die molekularen Grundlagen der EGF Rezeptor vermittelten Signalübertragung in humanen Gliomen hinsichtlich molekularer Therapieansätze und -strategien besser beurteilen zu können.

Ursprünglich sollten die verschiedenen Transfektanten auf HER2 vermittelte Unterschiede im Internalisierungs- und Degradierungsverhalten der Rezeptorkomplexe untersucht werden, um auf diesem Weg Rückschlüsse auf die Zellmigration und Invasion in EGF Rezeptor überexprimierenden Zellen erhalten zu können.

Es stellte sich jedoch ein starker Zusammenhang des EGFR/HER2 vermittelten Migrationsverhaltens mit N-Cadherin heraus. Die weiteren Untersuchungen wurden dann eher in Richtung Zell-Zell- und Zell-Matrix Adhäsionssystem ausgerichtet.

So konnte in HER2VE exprimierenden Zellen verstärkte Migration beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte eine Blockierung der EGFR/HER2 Signaltransduktion durch dominant-negativen HER2VEKA Rezeptor zu kompletter Inhibierung der Migration in LN18 Zellen. Diese Daten wurden durch die Behandlung mit spezifischen Tyrosinkinase Inhibitoren untermauert. Nur die bispezifische Blockierung von EGF und HER2 Rezeptor (AEE788) führte in HER2VE-Zellen zu einem Migrationsstop, der mit dem in HER2VEKA-Zellen vergleichbar war.

Das unterschiedliche Migrationsverhalten der LN18 HER2-Klone wurde durch N-Cadherin vermittelt. In HER2N- und HER2VE-Zellen war eine Herunterregulierung der N-Cadherin Expression zu verzeichnen, während in HER2VEKA-Zellen eine erhöhte N-Cadherin Expression im Vergleich zu untransfizierten LN18 Parentalzellen nachzuweisen war. Weiterhin wurde N-Cadherin nur in nicht-migrierenden HER2VEKA-Zellen an die Zellmembran rekrutiert, während in LN18 Parentalzellen eine diffuse, nur z. T. membranständige Färbung detektierbar war, die in HER2N- und HER2VE-Zellen ausschließlich zytoplasmatisch ausgeprägt war. Kontrollexperimente mit siRNA gegen N-Cadherin in HER2VEKA-Zellen bestätigten die Beteiligung dieses Moleküls am Migrationsverhalten der unterschiedlichen HER2-Klone, da durch die Herunterregulation

von N-Cadherin der migrierende Phänotyp der HER2VE-Zellen wiederhergestellt werden konnte. Die Annahme, dass die Expression, und die Lokalisation des N-Cadherins für Unterschiede im Migrationsverhalten glialer Tumorzellen verantwortlich sein könnten, wurde durch immunhistochemische Experimente an humanen Glioblastom Gewebeschnitten verifiziert. Hier fanden sich in verschiedenen Bereichen des Tumors unterschiedliche Lokalisationen des N-Cadherins, wobei die migrierenden Zellen der Infiltrationszone eine zytoplasmatische Immunreaktion zeigten.

Im Folgenden sollen die hier kurz zusammengefassten Ergebnisse noch einmal im Einzelnen diskutiert werden.

1. HER2 moduliert die EGF Rezeptor Aktivierung und Internalisierung in LN18 Gliomzellen

Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass HER2 in humanen malignen Gliomen exprimiert wird und dass dies mit schlechter Prognose korreliert (Koka et al., 2003; Mineo et al., 2007; Potti et al., 2004). Die Rolle von HER2 in der glialen Tumorbilogie konnte jedoch auf molekularer Ebene noch nicht geklärt werden. Es gibt in glialen Tumoren eine starke Korrelation von HER2 mit EGF Rezeptor Expression, die bisher als Coexpression angesehen wurde und ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen EGF und HER2 Rezeptor ist (Dietzmann and von Bossanyi, 1994; Schlegel et al., 1994b). Dieser Standpunkt konnte auch durch die Ergebnisse in vorliegender Arbeit bekräftigt werden.

Die verschiedenen HER2 Rezeptor Mutanten wurden in allen ausgewählten Klonen gleichmäßig exprimiert. Dabei war eine hohe konstitutive Aktivierung des HER2VE an Y1248 ohne EGF Stimulierung zu beobachten. Nach EGF Zugabe konnte dort keine nennenswerte Steigerung mehr verzeichnet werden, in wildtyp HER2N-Zellen jedoch schon. Untransfizierte Parental- und dominant-negative HER2VEKA-Zellen zeigten erwartungsgemäß keinerlei HER2 Aktivierung. Die endogene EGF Rezeptor Expression blieb von der HER2 Transfektion unbeeinflusst. Ohne EGF Stimulierung zeigte jedoch nur HER2VE eine leichte Aktivierung des EGF Rezeptors an Y1086, was auf die Bildung von EGFR/HER2 Heterodimeren hindeutet, da nur in HER2VE-Zellen ohne Stimulierung sowohl EGF, als auch HER2 Rezeptor Aktivierung nachweisbar war.

Nach Stimulierung mit EGF war in allen Klonen EGF Rezeptor Aktivierung detektierbar, doch nur die Transfektion mit HER2N sowie HER2VE führte zu einer stark erhöhten EGF Rezeptor Aktivierung. Somit ist ein funktional aktiver HER2 Rezeptor für die viel höhere Aktivierung des EGF Rezeptors in diesen Zellklonen verantwortlich. Da im Falle der HER2VEKA-Zellen weder eine höhere, noch eine niedrigere EGF Rezeptor Aktivierung

nachweisbar war als in LN18 Parentalzellen, sind hier wohl EGF Rezeptor Homodimere für die Signalstärke verantwortlich.

Daraus resultiert, dass in HER2VE-Zellen ohne EGF Stimulierung mehr HER2VE Homodimere vorliegen, da zwar eine hohe HER2 Aktivierung detektierbar war, jedoch nur eine leichte konstitutive EGF Rezeptor Aktivierung. Nach Stimulierung mit EGF scheint sich das Gleichgewicht in Richtung EGFR/HER2 Heterodimere zu verschieben, da die Phosphorylierung von HER2 nicht mehr weiter zunimmt, die des EGF Rezeptors jedoch noch weit über das Aktivierungslevel der Parentalzellen hinaus ansteigt. In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Heterodimerisierung bei Koexpression von EGF und HER2 Rezeptor, v. a. nach EGF Stimulierung, favorisiert wird und für stärkere und länger andauernde Signaltransduktion verantwortlich ist (Graus-Porta et al., 1997; Qian et al., 2004; Tzahar et al., 1996; Wada et al., 1990). Dies deckt sich mit den hier gemachten Beobachtungen, wobei hier noch Bedarf an alternativen Nachweismethoden herrscht. Es konnte jedoch der Nachweis erbracht werden, dass die unterschiedlichen HER2-Mutanten in der erwarteten Art und Weise innerhalb der Zellen wirken und interagieren.

Weiterhin ist nicht nur die Signalintensität in den HER2-Klonen unterschiedlich, sondern auch die Aktivierungsdauer. HER2N- und HER2VE-Zellen zeigten demnach eine länger andauernde Phosphorylierung des EGF Rezeptors nach EGF Stimulierung, als LN18 Parentalzellen und HER2VEKA-Zellen. Auch noch 60 Minuten nach EGF Zugabe war dort ein Signal detektierbar. Somit ist ein funktional aktiver HER2 Rezeptor nicht nur für stärkere, sondern auch für längere intrazelluläre Signalweiterleitung in glialen Tumorzellen verantwortlich. Dieser Sachverhalt konnte in mehreren Arbeiten im Zusammenhang mit anderen Zellsystemen nachgewiesen werden (Beerli et al., 1995; Graus-Porta et al., 1995). HER2VEKA hingegen scheint die Signaldauer, auch im Vergleich zu Parentalzellen, zu verkürzen. EGF und HER2 Rezeptor interagieren somit in glialen LN18 Zellen und scheinen sich gegenseitig in ihrer Aktivierungsstärke und -dauer zu beeinflussen.

Die Intensität und Dauer der Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren hat auch mit Unterschieden in Internalisierungs- und Recyclingprozessen zu tun. So konnte von Lenferink und Kollegen gezeigt werden, dass ligandengebundene Rezeptoren in frühen Endosomen internalisiert und nach Abspaltung des Liganden entweder im Lysosom degradiert oder zurück an die Oberfläche transportiert (Recycling) werden. Dabei werden EGF Rezeptor Homodimere v. a. degradiert, während EGFR/HER2 Heterodimere vorwiegend an die Zellmembran zurücktransportiert werden (Lenferink et al., 1998). Die Recyclingprozesse verlängern die EGF Rezeptor Aktivierung und die Dauer der

Signaltransduktion und spielen damit eine Rolle bei der Tumorigenese (Graus-Porta et al., 1995; Waterman et al., 1998).

In vorliegender Arbeit konnten ebenfalls Unterschiede im Internalisierungsverhalten und der räumlichen und zeitlichen Verteilung der Rezeptoren zwischen den untersuchten LN18 HER2-Klone gesehen werden. In LN18 Parentalzellen, wo nur EGF Rezeptor exprimiert wird, war eine schnellere Internalisierung des EGF Rezeptors zu beobachten, als in den HER2 exprimierenden Klonen, wie auch bei Hendriks und Kollegen beschrieben (Hendriks et al., 2003b). Die in den HER2N- und HER2VE-Klonen vorliegenden Heterodimere werden langsamer internalisiert und wieder recycled. Somit ist jederzeit ein Signal sowohl an der Membran, als auch in perinukleärer, endosomaler Lokalisation detektierbar. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Hendriks et al..

Damit nimmt der HER2 Rezeptor Einfluss auf EGF Rezeptor Internalisierung und Degradierung in humanen Glioblastomzellen.

Es ergibt sich hieraus eine weitere Erklärung für die erhöhte EGF Rezeptor Aktivierung in HER2N- und HER2VE-Zellen nach EGF-Stimulierung. In der Literatur konnte für Mammakarzinomzellen gezeigt werden, dass HER2 die Aktivierung des membranständigen EGF Rezeptors durch verringerte Degradierung und erhöhten Rücktransport an die Membran verstärkt (Hendriks et al., 2003a). Dies könnte auch in den hier verwendeten Glioblastomzellen die Erklärung für die erhöhte EGF Rezeptor Aktivierung und Lokalisation an der Membran bei Vorhandensein eines aktiven HER2 Rezeptors sein.

2. Die EGF Rezeptor vermittelte Signaltransduktion in LN18 Glioblastomzellen wird durch HER2 Rezeptor Konstrukte beeinflusst

Nicht nur die Aktivierung, sowie die räumliche und zeitliche Verteilung der EGF und HER2 Rezeptoren wurden durch die Transfektion der Glioblastomzelllinie LN18 beeinflusst, sondern auch die im EGF Rezeptor Netzwerk involvierten Signalkaskaden.

Die leichte konstitutive Aktivierung von Akt in HER2N- und HER2VE-Zellen deutete schon auf eine vermehrte Signalweiterleitung im Falle des Akt/PI3K Signalweges hin. Nach Stimulierung mit EGF war eine verstärkte Akt Aktivierung in HER2VE-Zellen im Vergleich zu Parental- und HER2N-Zellen detektierbar, was Hinweise liefert, dass die Expression von HER2VE für eine verstärkte Signalweiterleitung verantwortlich ist. Da in HER2VEKA-Zellen eine stark abgeschwächte Akt Aktivierung zu beobachten war, scheint dieser Signalweg in starkem Maß von der Expression der unterschiedlichen HER2-Mutanten betroffen zu sein. Dieser Signalweg wird unter anderem im Zusammenhang mit Migration und Adhäsion gesehen (Demuth and Berens, 2004; Jorissen et al., 2003), und

ist damit ein Faktor, der bei der Untersuchung des Migrationsverhaltens der HER2-Klone sehr wahrscheinlich eine Rolle spielt.

Im Zusammenhang mit dem Akt/PI3K Signalweg soll an dieser Stelle auch die Rolle von PTEN erörtert werden, einem wichtigen Mediator in einem Netzwerk komplexer Interaktionen zwischen verschiedenen Signalwegen. In HER2VEKA-Zellen, wo eine sehr schwache Akt Aktivierung nachweisbar war, war gleichzeitig eine hohe PTEN Expression detektierbar. Umgekehrt war in stark Akt phosphorylierten HER2VE-Zellen eine niedrige PTEN Expression zu finden. Dies deutet darauf hin, dass PTEN seiner Funktion als negativer Regulator der Akt Phosphorylierung, wie in der Literatur u. a. für das Glioblastom beschrieben, nachkommt (Knobbe et al., 2002). Die hier verwendete Glioblastomzelllinie LN18 trägt wildtyp PTEN (Schlegel et al., 2000) und somit ist eine Regulation von Akt durch PTEN denkbar. Von Nagata und Kollegen wurde ein Zusammenhang zwischen PTEN und HER2 über Src Kinase für Mammakarzinomzellen beschrieben. Dabei wurden Zellen mit Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen HER2, behandelt, und somit der HER2 Rezeptor inaktiviert. Dies führte zu einer erhöhten PTEN Expression und damit verbunden konnte eine abgeschwächte Akt Aktivierung detektiert werden. Es wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung von PTEN, die dessen Degradierung einleitet, von phosphorylierter Src Kinase durchgeführt wird, welche wiederum nur durch einen aktiven HER2 Rezeptor aktiviert werden kann (Nagata et al., 2004). Da auch in vorliegender Arbeit ein Zusammenhang zwischen aktivem (HER2VE) versus dominant-negativem (HER2VEKA) HER2 Rezeptor und unterschiedlicher PTEN Expression gesehen wurde, könnte auch hier eine gewisse Regulation über Src Kinase mediiert werden. Dies erfordert allerdings weitere Untersuchungen, wobei erste Experimente in diese Richtung wiesen.

PTEN spielt aber nicht nur im Akt/PI3K Signalweg eine Rolle, sondern ist in diversen die Migration und Adhäsion betreffende Signalwege involviert und wird an anderer Stelle erneut diskutiert werden.

Die Aktivierung der MAPKinasen Erk1/2 zeigt ein ähnliches Muster, wie die von Akt. Auch in diesem Fall ist in HER2VEKA-Zellen die schwächste Aktivierung nachweisbar, in HER2N- und HER2VE-Zellen hingegen die stärkste. In Studien wurde belegt, dass im Glioblastom die EGF induzierte Aktivierung des MAPK Signalweges mit schlechter Prognose korreliert (Feldkamp et al., 1999) und einen wichtigen Signalweg für die Induktion von Migrationsprozessen darstellt. Da HER2 beinhaltende Heterodimere für starke Aktivierung der MAPK verantwortlich sind (Graus-Porta et al., 1995), liegen die erhaltenen Ergebnisse durchaus im erwarteten Bereich. Es war weiterhin ein Unterschied in der Aktivierungsstärke zwischen Erk1 und Erk2 feststellbar, wobei Erk2 in HER2VE-Zellen auch ohne Stimulierung mit EGF stärker aktiviert war als Erk1. Wolf-Yadlin und

Kollegen konnten zeigen, dass als Effekt einer HER2 Überexpression u. a. eine verstärkte Erk2 Aktivierung für erhöhte Migration verantwortlich ist (Wolf-Yadlin et al., 2006).

3. Expression des dominant-negativen HER2VEKA Rezeptors verhindert Migration in transfizierten LN18 Glioblastomzellen

Der Einfluss der verschiedenen heterodimeren EGFR/HER2 Rezeptorkomplexe auf spezifische zelluläre Reaktionen konnte in glialen Zellen bisher nicht geklärt werden. In Tumorzellen allgemein mediiert HER2 u. a. zelluläre Motilität und Invasion (Wolf-Yadlin et al., 2006; Yarden, 2001). In vorliegender Arbeit konnten morphologische Veränderungen zwischen den unterschiedlich transfizierten LN18 HER2-Klonen festgestellt werden, die auf Alterationen im Zelladhäsionssystem der Zellen hindeuten. HER2VE-Zellen zeigten Verlust von Zell-Zell Verbindungen und einen fibroblasten-ähnlichen Phänotyp, während HER2VEKA-Zellen als enge Zellkolonien mit starken Zell-Zell Adhäsionen und einem epithelalem Phänotyp wuchsen. Diese HER2 vermittelten Veränderungen der Morphologie gingen mit Änderungen im Migrationsverhalten der unterschiedlichen Zellklone einher.

Expression des konstitutiv aktivierten HER2VE Rezeptors resultierte in verstärkter Migration, während Expression des dominant-negativen HER2VEKA Rezeptors für eine Inhibierung der Migration verantwortlich war.

In Bezug auf die in den beiden vorhergehenden Abschnitten diskutierten Ergebnisse bezüglich der durch HER2 modulierten Rezeptor Aktivierung und Signaltransduktion kann man Änderungen im Migrationsverhalten durchaus erwarten.

HER2VE-Zellen zeigten die stärkste Migration, und gleichzeitig die stärkste HER2 und EGF Rezeptor Aktivierung, sowie die am deutlichsten ausgeprägte Akt und MAPK Phosphorylierung. Dittmar und Kollegen konnten zeigen, dass die Phosphorylierungsstelle Y1248 des HER2 Rezeptors, die auch in vorliegender Arbeit untersucht wurde, für die Induktion von Migration eine große Rolle spielt (Dittmar et al., 2002). In HER2VEKA konnte keine Phosphorylierung an diesem Tyrosinrest nachgewiesen werden, wohingegen HER2VE-Zellen selbst in unstimuliertem Zustand ein starkes Signal für pY1248 aufwiesen. Im Gegensatz dazu war in HER2VE der Tyrosinrest Y877 nicht so stark phosphoryliert (Daten nicht aufgeführt), was auch zum Ausschluß der Untersuchung dieses Tyrosinrestes für vorliegende Arbeit führte. HER2N-Zellen nehmen eine gewisse Sonderstellung bei der Beurteilung der Rezeptor Aktivierung und Signaltransduktion ein. Dieser Zellklon exprimiert den wildtyp HER2 Rezeptor und verhält sich ähnlich dem HER2VE-Klon, was die Rezeptor Aktivierung und Signaltransduktion betrifft. Auch hier waren nach EGF Stimulierung sehr starke HER2 und EGF Rezeptor Phosphorylierung, sowie hohe Akt und MAPK Aktivierungslevel zu beobachten, so dass man in diesen Zellen

eine gesteigerte Migration ähnlich den HER2VE-Zellen erwarten würde. Dies ist jedoch nicht der Fall. HER2N-Zellen verhalten sich sowohl bezüglich der Morphologie, als auch bezüglich der Migrationseffizienz eher wie untransfizierte LN18 Parentalzellen, die kaum endogenen HER2 Rezeptor exprimieren, und nehmen so eine Mittelstellung bei der Beurteilung der Migration ein. Eine Erklärung für diese Tatsache könnten die Unterschiede in der Aktivierungsintensität von Akt und MAPK ohne EGF Stimulierung sein. In diesem Fall zeigten weder LN18 Parentalzellen, noch HER2VEKA-Zellen Akt oder MAPK Aktivierung. Bei Vergleich von HER2N- und HER2VE-Zellen zeigte sich sowohl im Falle von Akt, als auch bei Aktivierung von MAPK, eine leicht, aber eindeutig erhöhte Aktivierung in HER2VE-Zellen. Da im stimulierten Zustand die Unterschiede nicht sehr groß sind, scheint die geringe Aktivierungszunahme in HER2VE aber dennoch auszureichen, um eine stark erhöhte Migration auszulösen. Wahrscheinlich ist die stärkere Grundaktivierung (ohne EGF Zugabe) schon ausreichend für die erhöhte Migration, da die zur Beurteilung herangezogenen Woundhealing Assays in Medium ohne FCS, und damit ohne EGF, durchgeführt wurden. So könnte u. a. die konstitutive Grundaktivierung für die verstärkte Zellmotilität in HER2VE-Zellen verantwortlich sein, die wiederum auf die verstärkte HER2 Aktivierung zurückzuführen ist.

Da es sich bei den untersuchten Signalmolekülen Akt und MAPK um Mediatoren in großen Netzwerken handelt (Cantley, 2002; Murphy and Blenis, 2006), ist es wahrscheinlich, dass durch weitere Vernetzungen noch andere Signalwege, die die Migration und Adhäsion steuern können, reguliert und beeinflusst werden. Zudem können durch EGF und HER2 Rezeptor, unabhängig von Akt/PI3K und MAPK Signalweg, noch weitere Signalkaskaden aktiviert werden, wie z. B. der Wnt/ β -Catenin Signalweg, der für Adhäsion und Migration eine Rolle spielt (Holbro et al., 2003; Jorissen et al., 2003).

4. Die Unterschiede im Migrationsverhalten der HER2-Klone werden durch Reorganisation von N-Cadherin vermittelt

Die Unterschiede der Zellmorphologie und des Migrationsverhaltens der stabilen LN18 HER2-Klone lassen auf Alterationen und Veränderungen im Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionssystem schließen.

Die Funktion von E-Cadherin geht in den meisten epithelialen Tumoren während der Tumorprogression verloren und resultiert im Verlust von Zell-Zell-Adhäsion. Dieser Prozess löst Signale aus, die zu verstärkter Zellmigration und Invasion führen (Cavallaro and Christofori, 2004).

Im Gehirn spielt E-Cadherin während der Embryonalentwicklung eine Rolle, wobei eine starke Expression bei der initialen Entwicklung des Ektoderms beobachtet werden kann. E-Cadherin Expression verschwindet dann während der Neuralrohrentwicklung, persistiert

aber in den dorsalen Wurzelganglien, wo es auch postnatal weiterhin exprimiert wird (Shimamura and Takeichi, 1992).

In vorliegender Arbeit konnte in HER2VEKA-Zellen erhöhte E-Cadherin Expression detektiert werden. In HER2N- HER2VE- und Parentalzellen war eine kaum nachweisbare Expression gegeben. Da aber die Lokalisation des E-Cadherin in HER2VEKA-Zellen nicht membranständig, sondern diffus zytoplasmatisch war, scheint es für die Zell-Zell-Adhäsion in Glioblastomzellen keine Rolle zu spielen. In den immunhistochemischen Arbeiten von Utsuki et al. und Asano und Kollegen, konnte ebenfalls keine E-Cadherin Expression in den Gewebeschnitten von Glioblastomen und anaplastischen Astrozytomen nachgewiesen werden (Asano et al., 2000; Utsuki et al., 2002). Dies steht im Einklang mit einer weiteren Studie von Schwechheimer und Kollegen, wobei hier E-Cadherin Expression in Meningeomen nachgewiesen werden konnte (Schwechheimer et al., 1998).

N-Cadherin ist stark an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt und wird außerhalb des ZNS auch in anderen Organen, wie Myokard oder Hoden exprimiert (Asano et al., 2000). Der Einfluss und die Rolle von N-Cadherin während der Tumorigenese verschiedenster Tumorerkrankungen werden kontrovers diskutiert. Je nach Zellart und –kontext kann N-Cadherin entweder Zelladhäsion oder Migration und Invasion vermitteln (Hazan et al., 2000; Kashima et al., 2003). Oft geht der Verlust der E-Cadherin Funktion mit einer Expression von N-Cadherin einher, was als *epithelial mesenchymal transition* (EMT) beschrieben wird und zu erhöhter Zellmigration führt (Cavallaro et al., 2002). Der Zusammenhang zwischen N-Cadherin Expression und Migration/Invasion, sowie Malignitätsgrad wurde auch für hirneigene Tumoren in diversen Studien untersucht, wobei keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden konnten und die Rolle der Cadherine bei der Glioblastomentstehung zum jetzigen Zeitpunkt weitgehend unverstanden ist (Barami et al., 2006).

In vorliegender Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen N-Cadherin Expression und membranständiger Lokalisation, einhergehend mit einer verstärkten Zell-Zell-Adhäsion und somit stark verringerter Migration, in Abhängigkeit vom EGF/HER2 Rezeptorstatus in Glioblastomzellen gesehen werden. Nicht-migrierende HER2VEKA-Zellen zeigten die stärkste N-Cadherin Expression und als einziger Zellklon eine membranständige Lokalisation des Moleküls. Parentalzellen zeigten im Vergleich zu HER2N- und HER2VE-Zellen zwar auch eine etwas erhöhte Expression, aber es konnte keine membranständige Lokalisation des N-Cadherins detektiert werden. Kontrollexperimente mit siRNA gegen N-Cadherin bestätigten die tragende Rolle des N-Cadherin bei der Migration von Glioblastomzellen, da bei einer Herunterregulation des N-Cadherins von 80 %, die Migrationsrate der HER2VEKA-Zellen nahezu der von HER2VE-Zellen angeglichen werden konnte. Darüberhinaus konnte eine Abnahme der membranständigen Lokalisation beobachtet werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus vorliegender Arbeit konnten Asano und Kollegen in einer immunhistochemischen Studie zeigen, dass im Glioblastom zum Zeitpunkt des Rezidivs eine niedrige N-Cadherin Expression mit verstärkter Tumorinvasion korreliert. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte den Zusammenhang von N-Cadherin Expression mit Invasion *in vitro*, indem N-Cadherin in der Rattengliomzelllinie C6 überexprimiert wurde. Eine verstärkte Expression von N-Cadherin führte dort zu stark verringerter Invasion, was eine positive Korrelation zwischen N-Cadherin und Adhäsion zulässt (Asano et al., 2004; Asano et al., 2000).

Perego und Kollegen beschrieben ebenfalls einen Zusammenhang von N-Cadherin Expression mit Adhäsion in Glioblastomzelllinien. Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht so sehr die Expression der Cadherine, sondern die Instabilität und Unreife der Adhäsionskomplexe, für Tumorinvasion verantwortlich ist (Perego et al., 2002). Dies lässt eine Parallele zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen zu, da auch hier nicht nur die Expression, sondern v. a. auch die Lokalisation entlang der Zellmembran von Wichtigkeit für die Funktionalität des N-Cadherin als Adhäsionsmolekül ist und in dieser Kombination nur in HER2VEKA-Zellen gegeben war.

Shinoura und Kollegen hingegen untersuchten N-Cadherin im Zusammenhang mit dem Malignitätsgrad glialer Tumoren. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen N-Cadherin Expression und Tumorgrad und damit Invasion hergestellt werden (Shinoura et al., 1995).

Konträr zu den in vorliegender Arbeit gemachten Ergebnissen konnten Utsuki und Kollegen einen Anstieg der N-Cadherin Expression mit steigendem Tumorgrad in Verbindung bringen, was bedeutet, dass eine erhöhte N-Cadherin Expression mit erhöhter Invasion korrelieren würde (Utsuki et al., 2002).

Ausgehend von den Ergebnissen *in vitro*, war es interessant, die N-Cadherin Expression gemeinsam mit der Lokalisation in humanem Tumorgewebe *in situ* zu untersuchen und zu beurteilen. Das Glioblastom ist ein sehr stark infiltrativ wachsender Tumor. Dies bedeutet, dass die Zellen im Tumorzentrum nicht motil sein müssen, im Randbereich, und v. a. in der Infiltrationszone, jedoch schon. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass migrierende Zellen der Infiltrationszone eine geringere N-Cadherin Proteinexpression, und zudem eine vorwiegend zytoplasmatische Verteilung innerhalb der Zelle aufwiesen. In nicht-migrierende Zellen des Tumorzentrums wurde jedoch eine stärkere N-Cadherin Expression und außerdem eine vorwiegend membranständige Lokalisation gefunden. Dies bestätigt die in der Zellkultur gewonnenen Ergebnisse, da dort auch ausschließlich die nicht-migrierenden HER2VEKA-Zellen sowohl eine starke N-Cadherin Expression, als auch eine hohe membranständige Verteilung des Proteins aufzeigten. In den hoch motilen HER2VE-Zellen hingegen lag eine schwache und zugleich zytoplasmatische Proteinverteilung vor.

Somit scheint die N-Cadherin Lokalisation bei Prozessen der glialen Tumorinvasion eine enorme Rolle zu spielen. In der Arbeit von Utsuki et al., konnte zwar ein Anstieg der N-Cadherin Expression mit dem Malignitätsgrad glialer Tumoren in Verbindung gebracht werden, es wurde jedoch nicht auf die unterschiedliche Lokalisation des N-Cadherins innerhalb des Tumors eingegangen, was sich hier von großer Wichtigkeit erwies (Utsuki et al., 2002). Auch die anderen immunhistochemischen Arbeiten, die sich mit diesem Themengebiet befassen und schon im Zusammenhang mit den *in vitro* Ergebnissen genannt wurden, gehen nicht explizit auf die unterschiedlichen Zelllokalisationen in den verschiedenen Tumorarealen ein; der Tumor wird vielmehr als eine Einheit betrachtet (Asano et al., 2000; Shinoura et al., 1995).

Die Koexpression von N-Cadherin mit EGF bzw. HER2 Rezeptor erwies sich in immunhistochemischen Färbungen als sehr schwer beurteilbar. Es ist bekannt, dass die Lokalisation der beiden Rezeptoren im Glioblastom sehr heterogen sein kann.

Es sollte jedoch der Nachweis erbracht werden, dass die *in vitro* gefundenen Ergebnisse bezüglich der HER2 abhängigen EGF Rezeptor Aktivierung und der Zusammenhang mit der Lokalisation und Expression von N-Cadherin übereinstimmen. Glioblastom Tumormaterial wurde mittels Doppel-Immunfluoreszenz hingehend der N-Cadherin bzw. pEGFR (pY 1086) Expression bzw. Aktivierung untersucht. Dabei konnte wiederum eine Unterscheidung in Tumorzentrum und Infiltrationszone gemacht werden. Im Tumorzentrum war ein, wie schon in der Immunhistochemie ermittelt, membranständiges N-Cadherin Signal detektierbar. Gleichzeitig war in diesem Bereich kaum EGF Rezeptor Aktivierung nachweisbar. In der Infiltrationszone verhielt es sich so, dass kaum membranständiges N-Cadherin, jedoch ein erhöhter Anteil an membranständigem und aktiviertem EGF Rezeptor vorzufinden war.

Dies korreliert mit den Zellkulturergebnissen, da dort eine hohe EGF Rezeptor Phosphorylierung in motilen HER2VE-Zellen gefunden werden konnte. Dieser Zellklon wies gleichzeitig eine geringe N-Cadherin Expression auf und zeigte keinerlei membranständige Lokalisation des Proteins. HER2VEKA-Zellen spiegelten hingegen die Ergebnisse für das Tumorzentrum wieder.

Damit konnte sowohl der Zusammenhang zwischen membranständiger N-Cadherin Lokalisation und Adhäsion *in situ* bestätigt werden, sowie eine inverse Korrelation zur EGF Rezeptor Aktivierung hergestellt werden.

5. EGF und HER2 Rezeptor beeinflussen N-Cadherin Reorganisation und Integrin Signaltransduktion in LN18 Glioblastomzellen

Die Mechanismen, die in den LN18 HER2-Klonen zu Unterschieden in der N-Cadherin Expression und Lokalisation führen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden.

Die beobachteten Alterationen im Zell-Zell-Adhäsionssystem scheinen aber auf die unterschiedlichen Expressions- und Aktivierungslevel des EGF und HER2 Rezeptors zurückzuführen zu sein. Monospezifische Blockierung des EGF (AG1478) bzw. HER2 (AG825) Rezeptors alleine führte zu keiner Änderung des N-Cadherin Expressionslevels, wohingegen die bispezifische Blockade beider Rezeptoren (AEE788) gleichzeitig zu einem Anstieg der N-Cadherin Expression in migrierenden HER2VE-Zellen führte. Des Weiteren war die Lokalisation des N-Cadherins auch nur bei bispezifischer Inhibition entlang der Zelloberfläche vorzufinden. Eine vergleichende Beurteilung der Migration erbrachte ebenfalls nur bei bispezifischer Inhibierung eine deutliche Abnahme der Migrationseffizienz der HER2VE-Zellen auf ein Niveau der HER2VEKA-Zellen. Diese Daten, sowie die Effekte der dominant-negativen HER2VEKA Rezeptormutante weisen darauf hin, dass v. a. die heterodimere EGFR/HER2 Signaltransduktion die Expression und räumliche Verteilung von N-Cadherin reguliert und somit die potenteste Konfiguration bei der Modulation von Migrationsprozessen innerhalb des hier untersuchten Zellsystems darstellt.

Der Vergleich mit den Glioblastomzelllinien LN229 und G139 bekräftigten die für LN18 erhaltenen Ergebnisse. Sowohl LN229, als auch G139 zeigten eine mittlere bis hohe endogene EGF und HER2 Rezeptor Expression. Beide Zelllinien waren hochmotil und zeigten lediglich eine schwache membranständige N-Cadherin Lokalisation. Bispezifische Blockierung mit AEE788 führte in beiden Zelllinien zu einem Anstieg der N-Cadherin Expression und Lokalisation an der Zellmembran, sowie zum kompletten Verlust des Migrationsvermögens.

Die rezeptorvermittelte Modulation der Migration betrifft nicht nur das Zell-Zell-Adhäsionssystem, sondern auch Zell-Matrix-Interaktionen, die Proteine des Integrin Signalkomplexes sowie FAK assoziierte Proteine beinhalten.

Bei Vergleich der HER2VE- und HER2VEKA-Zellen konnte eine erhöhte Expression der Integrine $\beta 1$ und $\beta 4$ in HER2VEKA-Zellen detektiert werden. Dieses Expressionsmuster reflektiert jenes epithelialer Zellen, wo eine erhöhte Integrin $\beta 1$ und $\beta 4$ Expression zu stärkerer Adhäsion an die EZM führt und Migration inhibiert (Fuchs et al., 1997; Kippenberger et al., 2004). In diversen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass v. a. Integrin $\beta 1$ im Zusammenhang mit Invasion in glialen Tumorzellen steht. Dabei ist, anders als in vorliegender Arbeit, eine erhöhte Integrin $\beta 1$ Expression mit erhöhter Invasion korreliert (Demuth and Berens, 2004; Uhm et al., 1999). Andererseits konnte in anderen Zellsystemen für $\beta 1$ Integrin, v. a. in Kombination mit der α_v Untereinheit, eine indirekte Korrelation mit Tumorigenität festgestellt werden (Giancotti and Ruoslahti, 1990; Schreiner et al., 1991; Varner et al., 1995). Integrin $\beta 4$ scheint nach den Untersuchungen von Belot und Kollegen in astroglialen Tumoren keine tragende Rolle für

Migrationsprozesse zu spielen, und ist stärker in Oligodendroglomen exprimiert (Belot et al., 2001). In vorliegender Arbeit konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen $\beta 1$ bzw. $\beta 4$ Integrin Expression und verstärkter Adhäsion gesehen werden.

Die Aktivierung von FAK und Paxillin, zweier Komponenten der Integrin medierten Signaltransduktion die als Mediatoren zwischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion agieren, wurde ebenfalls durch Expression des HER2VE bzw. HER2VEKA Rezeptors reguliert. Dabei war sowohl im Falle von FAK, als auch im Falle von Paxillin, die Phosphorylierung in HER2VEKA exprimierenden LN18 Zellen höher als in HER2VE-Zellen. Dies stimmt mit der verstärkten Integrin Expression überein, da FAK direkt an Integrin $\beta 1$ binden kann und somit autophosphoryliert wird (Demuth and Berens, 2004).

Für viele Zellsysteme, u. a. für gliale Tumorzellen, konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteine positive Regulatoren für Zellmigration und Invasion sind, so dass eine Aktivierung, z. B. durch Integrine, zu biologischen Zellantworten in Richtung Migration führt (Demuth and Berens, 2004; Hehlgans et al., 2007).

In vorliegender Arbeit war jedoch die höchste Aktivierung in nicht-migrierenden HER2VEKA-Zellen zu beobachten, die eine hohe N-Cadherin Expression aufwiesen. Yano und Kollegen beschreiben eine Rolle für FAK und Paxillin, die mit den hier gemachten Beobachtungen übereinstimmt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine in die Kontrolle der Formierung und Stabilität von N-Cadherin Zell-Zell-Adhäsionen beteiligt sind. Des Weiteren scheint eine Herunterregulierung von FAK die Zellmigration zu steigern. Die untersuchten Moleküle sind folglich je nach Kontext in der Lage, Migrationsprozesse sowohl positiv als auch negativ zu kontrollieren und zu regulieren. Welche Voraussetzungen für das Einschlagen des einen oder des anderen Wegs gegeben sein müssen, konnte bisher nicht geklärt werden (Yano et al., 2004).

Passend zu den Ergebnissen bezüglich des Migrationsverhaltens in HER2VE- bzw. HER2VEKA-Zellen, konnte in migrierenden HER2VE transfizierten Zellen eine verstärkte Expression von Fibronektin nachgewiesen werden. Im Gegenzug dazu konnte in dominant-negativen HER2VEKA exprimierenden LN18 Zellen kaum eine Fibronektin Expression detektiert werden. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass dieser Bestandteil der EZM von Glioblastomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* exprimiert und in die EZM sezerniert wird. Fibronektin stellt einen wichtigen Faktor bei der Regulation von Migration und Invasion der Tumorzellen dar. Weiterhin begünstigt das von den Tumorzellen selbst sezernierte Fibronektin die gliale Tumorzellmigration (Chintala et al., 1996; Ohnishi et al., 1998).

Der HER2N-Klon verhält sich bezüglich der Expressionsmuster der Integrine $\beta 1$ und $\beta 4$, pFAK, pPaxillin sowie Fibronektin sehr ähnlich dem HER2VE-Klon. LN18 Parentalzellen

hingegen exprimieren die beschriebenen Moleküle vergleichbar zu HER2VEKA-Zellen; somit ähneln sich die LN18 HER2-Klone, die einen funktionell aktiven HER2 Rezeptor exprimieren, und jene die inaktiven bzw. kaum endogenen HER2 Rezeptor tragen.

HER2 scheint somit auch Integrine und weitere in Zell-Matrix Interaktionen involvierte Moleküle in ihrer Expression und Aktivierung zu beeinflussen. Dabei führt die Expression eines aktiven HER2 Rezeptors, die mit verringerter N-Cadherin Expression sowie verstärkter Migration einhergeht, zu einer abgeschwächten Integrin Expression und damit zu schwächerer Aktivierung nachgeschalteter Signalmoleküle.

In diesem Zusammenhang soll erneut das Tumorsuppressormolekül PTEN erwähnt werden. PTEN war sowohl in HER2N- als auch in HER2VE-Zellen schwächer exprimiert, als in HER2VEKA-Zellen und LN18 Parentalzellen.

Es besteht Grund zur Annahme, dass PTEN nicht nur Invasion und Migration via PI3K/Akt inhibieren kann, sondern zudem regulierend in den Aufbau und die Stabilisierung von Zell-Zell-Verbindungen eingreift und damit die Tumorzellmigration negativ beeinflusst.

Überexpression von exogenem PTEN in Gliomzellen mit PTEN Mutation, führte dabei zu Suppression von Migration, Invasion und Zellwachstum (Tamura et al., 1999).

PTEN ist in Signalwege wie beispielsweise die Integrin Signaltransduktion involviert, und in diesem Zusammenhang mit der Stabilisierung von Zell-Zell-Verbindungen via Src Kinase und damit verbundener Abnahme an Invasivität beteiligt. Bei dieser Regulation spielt auch die Aktivierung von HER2 eine Rolle, da in Zellen (beschrieben für Mammakarzinom) mit aktivem HER2 Rezeptor, PTEN phosphoryliert und somit degradiert werden kann. Kotelevets und Kollegen beschreiben zudem eine Bindung von PTEN an den Cadherin-Catenin Komplex über das Adaptormolekül MAGI-1b, was Cadherin abhängige Zell-Zell Aggregation fördert (Knobbe et al., 2002; Kotelevets et al., 2001; Kotelevets et al., 2005; Nagata et al., 2004).

PTEN ist weiterhin in der Lage FAK zu dephosphorylieren; diess führt wiederum zu einer Abnahme der Invasivität der Tumorzellen.

In vorliegender Arbeit ist jedoch sowohl eine hohe PTEN Expression, als auch eine hohe FAK Phosphorylierung nachweisbar. Somit scheinen PTEN und FAK hier eher eine Stabilisierungsfunktion der Zell-Zell Kontakte auszuführen, wie bereits oben diskutiert wurde.

PTEN vermag zudem die Aktivität des Wnt-Signalweges zu regulieren, indem es β -Catenin Anreicherung im Zellkern, und die damit verbundene transkriptionelle Aktivität, verhindert (Persad et al., 2001). In HER2VEKA-Zellen mit stabilen Zell-Zell Kontakten und hoher PTEN Expression bleibt β -Catenin somit stabil im Cadherin-Catenin Komplex an der Membran gebunden. Mit den Ergebnissen einer aktuellen Arbeit von Fang und Kollegen könnte dieser Sachverhalt Bestätigung finden. Denn es konnte gezeigt werden,

dass β -Catenin durch Akt phosphoryliert werden kann. Dadurch wird es von den Zell-Zell Kontakten abgezogen und transkriptionell aktiviert (Fang et al., 2007). Migrierende HER2VE-Zellen zeigten im Zusammenhang mit der HER2 Rezeptor Aktivierung eine abgeschwächte PTEN Expression, was wiederum zu erhöhter Akt Aktivierung führte. Akt könnte daraufhin β -Catenin phosphorylieren und so den Cadherin-Catenin Komplex und die bestehenden Zell-Zell Kontakte zerstören. Gleichzeitig würde die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin erhöht werden, und somit Migration und Invasion gefördert werden.

6. Ausblick

Vorliegende Arbeit hat dazu beigetragen, einen Zusammenhang zwischen abberanter EGF bzw. HER2 Rezeptor Expression und Unterschieden im Migrationsverhalten von Glioblastomzellen herstellen zu können.

Die Mechanismen, die der Tatsache zugrunde liegen, dass eine EGF/HER2 Rezeptor Überexpression die Migrations- und Invasionsmechanismen glialer Tumorzellen reguliert und steuert, konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden und sind zudem recht komplex.

Die Bedeutung von N-Cadherin für die Invasion glialer Tumoren wurde zwar in einigen Arbeiten erkannt, es herrscht jedoch keine einheitliche Meinung über die Relevanz und die Funktion des N-Cadherins in glialer Tumorigenese und damit ist auch die Bedeutung für den Tumorgrad und damit für die Malignität nicht vollständig klar.

Die Ergebnisse aus vorliegender Arbeit zeigen sowohl *in vitro*, als auch *in situ* einen eindeutigen direkten Zusammenhang zwischen EGFR/HER2 Aktivierungsstatus, N-Cadherin Expression und Lokalisation sowie damit verbundenen Unterschieden bei der Zellmigration.

Auf dieser Grundlage könnten neue, interessante Therapieansätze entwickelt werden.

Die Mechanismen, die der Kommunikation zwischen RTKs und Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsionssystem zugrunde liegen, konnten im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr vollständig erarbeitet und aufgeklärt werden.

PTEN und seine regulatorische Funktion in diversen Signalwegen, die bei den Vorgängen der Migration und Invasion beteiligt sind, scheint nach ersten Ergebnissen ein mögliches Signalmolekül zu sein, das hierbei eine Rolle spielt. Zumal ist seine Funktion als Tumorsuppressor bekannt und seine Beteiligung an der Entstehung von Gliomen konnte bereits bewiesen werden. Im Zusammenspiel mit β -Catenin und Akt zeigten sich erste Zusammenhänge bezüglich der RTK vermittelten Migration über N-Cadherin Reorganisation. Damit ist dieses Molekül ein geeigneter Kandidat, um die Unterschiede im Migrationsverhalten der hier untersuchten LN18 HER2-Klone erklären zu können. In Abbildung 46 ist ein hypothetisches, stark vereinfachtes Modell für die Regulation der

Migration durch PTEN, in den verschiedenen HER2-Klonen dargestellt. Dabei wurde nur ein Teil der Moleküle und Signalkomplexe aufgeführt, die hierbei eine Rolle spielen könnten.

Es ist von großer Wichtigkeit weitere Untersuchungen durchzuführen, um die Mechanismen hinter den hier erarbeiteten biologischen Zellantworten zu identifizieren.

Die Therapie des Glioblastoms verläuft bisher leider enttäuschend und nahezu wirkungslos, was zum größten Teil auf das hochinfiltrative Wachstum dieser Tumoren zurückzuführen ist.

Die Mechanismen der glialen Tumorzellmigration und -invasion müssen daher genauer verstanden werden, um therapeutisch interessante Zielmoleküle zu identifizieren, und neue Strategien zur Tumorbekämpfung entwickeln zu können.

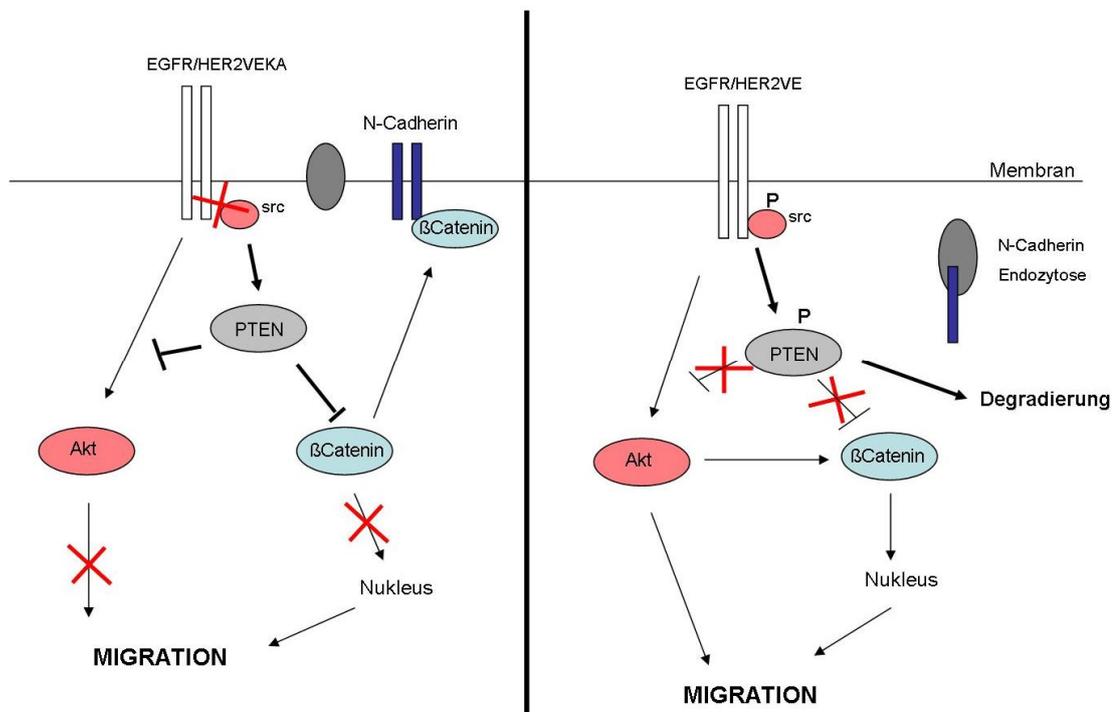


Abb 46 : Hypothetisches Modell der PTEN gesteuerten Migration in LN18 HER2-Klonen

Links: Dominant-negativer HER2VEKA Rezeptor führt zu verminderter Signaltransduktion und somit kann Src nicht phosphoryliert werden. Dadurch ist PTEN stabilisiert und blockiert einerseits die Aktivierung von Akt und andererseits die Phosphorylierung und nukleäre Akkumulation von β-Catenin. U. a. durch diese Prozesse wird Migration verhindert und β-Catenin bleibt im stabilen Cadherin-Catenin Komplex an der Membran.

Rechts: Konstitutiv-aktivierter HER2VE Rezeptor führt zu verstärkter Signaltransduktion und somit zu verstärkter Phosphorylierung von Src. Src phosphoryliert wiederum PTEN, das damit zum Abbau markiert ist und degradiert wird. Dadurch ist PTEN nicht mehr in der Lage, Akt und β-Catenin Phosphorylierung zu blockieren. Es kommt zu verstärkter Aktivierung weiterer downstream Signalmoleküle, sowie Akkumulation von β-Catenin im Nucleus. Migration wird verstärkt. Durch Phosphorylierung von β-Catenin, das auch direkt durch aktiviertes Akt phosphoryliert werden kann, kommt es zum Zerfall stabiler Zell-Zell Kontakte und Degradierung des Cadherin-Catenin Komplexes.

E. Zusammenfassung

Das Glioblastom ist ein hirneigener Tumor mit verheerender Prognose und macht etwa 40 % aller glialen Tumoren aus (Preston-Martin, 1996).

Trotz optimierter Therapie ist das Auftreten von Rezidiven die Regel, welches auf das hoch infiltrative Wachstum dieser Tumoren zurückzuführen ist (Hofer and Herrmann, 2001).

Für die Entwicklung effektiver Strategien gegen die hochmalignen Tumoren ist es von großer Wichtigkeit, die Migrations- und Invasionsmechanismen der Tumorzellen zu identifizieren.

Überexpression des EGF Rezeptors und damit eine fehlregulierte Signaltransduktion, sind in vielen Krebserkrankungen zu finden. Die Mechanismen und weitere Signalmoleküle im EGF Rezeptor Netzwerk, die zur Transformation und somit zur malignen Entartung der Zellen führen, sind nicht vollständig geklärt. Die EGF Rezeptor Signaltransduktion ist in Prozesse wie Proliferation, Anti-Apoptose, Angiogenese, Migration und Invasion involviert, wobei es auf die Dimerisierungspartner der jeweiligen Rezeptoren ankommt, welche Signalwege aktiviert werden (Holbro et al., 2003; Jorissen et al., 2003).

In über 40 % aller primären Glioblastome ist das *EGFR* Gen amplifiziert, häufig auch in Kombination mit strukturellen Abberationen des Rezeptors, z. B. EGFR vIII (Ekstrand et al., 1994; Schlegel et al., 1994a). Die tumorbiologische Bedeutung dieses Charakteristikums konnte jedoch bis heute nicht geklärt werden.

In vielen Tumorerkrankungen spielt die Überexpression des HER2 Rezeptors v. a. für Invasions- und Migrationsprozesse eine große Rolle (Yarden, 2001) und auch für das Glioblastom wird ein Zusammenhang von HER2 Expression mit schlechter Prognose und erhöhter Mortalität angenommen (Koka et al., 2003; Mineo et al., 2007; Potti et al., 2004; Schwechheimer et al., 1998).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen der Tumorzellmigration im Glioblastom, im Zusammenhang mit Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK) der EGF Rezeptor Familie (EGFR und HER2) und der zugehörigen Signaltransduktion.

Es sollte der Einfluss und die Signifikanz des HER2 Rezeptors im EGF Rezeptor Netzwerk im Zusammenhang mit Migrationsverhalten und Invasion humaner glialer Tumorzellen untersucht werden.

Es wurden verschiedene HER2 Rezeptormutanten, der wildtyp HER2 Rezeptor HER2N, konstitutiv aktiver HER2VE sowie dominant-negativer HER2VEKA Rezeptor, in die EGF Rezeptor überexprimierende Glioblastomzelllinie LN18 stabil transfiziert. Diese Rezeptorkonstrukte dienten in vorliegender Arbeit als Hilfsmittel und Instrument, um die Aktivierung des EGF Rezeptors zu modulieren und die EGF Rezeptor vermittelte Signaltransduktion in HER2 abhängiger Weise zu modifizieren.

Es stellte sich ein Zusammenhang des EGFR/HER2 vermittelten Migrationsverhaltens mit dem Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin heraus. So konnte in HER2VE exprimierenden Zellen verstärkte Migration beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte eine Blockierung der EGFR/HER2 Signaltransduktion durch dominant-negativen HER2VEKA Rezeptor zu vollständiger Inhibierung der Migration in LN18 HER2VEKA-Zellen. Die Daten wurden durch die Behandlung mit spezifischen Tyrosinkinase Inhibitoren untermauert. Nur die bispezifische Blockierung von EGF und HER2 Rezeptor (AEE788) führte in HER2VE-Zellen zu einem Migrationsstop, der mit dem in unbehandelten HER2VEKA-Zellen vergleichbar war.

Das unterschiedliche Migrationsverhalten der LN18 HER2-Klone wurde durch N-Cadherin vermittelt. In HER2N- und HER2VE-Zellen war eine Herunterregulierung der N-Cadherin Expression zu verzeichnen, während in HER2VEKA-Zellen eine erhöhte N-Cadherin Expression im Vergleich zu untransfizierten LN18 Parentalzellen nachzuweisen war. Weiterhin wurde N-Cadherin nur in nicht-migrierenden HER2VEKA-Zellen an die Zellmembran rekrutiert, während in LN18 Parentalzellen eine diffuse, nur z. T. membranständige Färbung detektierbar war, die in HER2N- und HER2VE-Zellen ausschließlich zytoplasmatisch ausgeprägt war.

Kontrollexperimente mit siRNA gegen N-Cadherin in HER2VEKA-Zellen bestätigten die Beteiligung dieses Moleküls am Migrationsverhalten der unterschiedlichen HER2-Klone, da durch die Herunterregulation von N-Cadherin der migrierende Phänotyp der HER2VE-Zellen wiederhergestellt werden konnte. Die Annahme, dass die Expression, und die Lokalisation des N-Cadherins für Unterschiede im Migrationsverhalten glialer Tumorzellen verantwortlich sein könnten, wurde durch immunhistochemische Experimente an humanen Glioblastom Gewebeschnitten verifiziert.

Es konnte somit gezeigt werden, dass HER2 Rezeptor Expression die gliale Tumorzell Migration beeinflusst. Dies geschieht durch Modulation der EGF Rezeptor vermittelten Signaltransduktion und dadurch bedingte Reorganisation des Zelladhäsionsmoleküls N-Cadherin.

F. Literaturverzeichnis

- Alexander, V. 1991. Brain tumor risk among United States nuclear workers. *Occup Med.* 6:695-714.
- Angst, B.D., C. Marcozzi, and A.I. Magee. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 114:629-41.
- Asano, K., C.D. Duntsch, Q. Zhou, J.D. Weimar, D. Bordelon, J.H. Robertson, and T. Pourmotabbed. 2004. Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion. *J Neurooncol.* 70:3-15.
- Asano, K., O. Kubo, Y. Tajika, K. Takakura, and S. Suzuki. 2000. Expression of cadherin and CSF dissemination in malignant astrocytic tumors. *Neurosurg Rev.* 23:39-44.
- Back, M.F., E.L. Ang, W.H. Ng, S.J. See, C.C. Lim, S.P. Chan, and T.T. Yeo. 2007. Improved median survival for glioblastoma multiforme following introduction of adjuvant temozolomide chemotherapy. *Ann Acad Med Singapore.* 36:338-42.
- Barami, K., L. Lewis-Tuffin, and P.Z. Anastasiadis. 2006. The role of cadherins and catenins in gliomagenesis. *Neurosurg Focus.* 21:E13.
- Batzer, A.G., D. Rotin, J.M. Urena, E.Y. Skolnik, and J. Schlessinger. 1994. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol.* 14:5192-201.
- Baulida, J., M.H. Kraus, M. Alimandi, P.P. Di Fiore, and G. Carpenter. 1996. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem.* 271:5251-7.
- Bazley, L.A., and W.J. Gullick. 2005. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer.* 12 Suppl 1:S17-27.
- Beerli, R.R., D. Graus-Porta, K. Woods-Cook, X. Chen, Y. Yarden, and N.E. Hynes. 1995. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol.* 15:6496-505.
- Belot, N., S. Rorive, I. Doyen, F. Lefranc, E. Bruyneel, R. Dedecker, S. Micik, J. Brotchi, C. Decaestecker, I. Salmon, R. Kiss, and I. Camby. 2001. Molecular

- characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features. *Glia*. 36:375-90.
- Biernat, W., P. Kleihues, Y. Yonekawa, and H. Ohgaki. 1997a. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 56:180-5.
- Biernat, W., Y. Tohma, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki. 1997b. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)*. 94:303-9.
- Birchmeier, W., and J. Behrens. 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1198:11-26.
- Bishop, A.L., and A. Hall. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 348 Pt 2:241-55.
- Bohnen, N.I., and L.T. Kurland. 1995. Brain tumor and exposure to pesticides in humans: a review of the epidemiologic data. *J Neurol Sci*. 132:110-21.
- Brakebusch, C., and R. Fassler. 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *Embo J*. 22:2324-33.
- Brazil, D.P., Z.Z. Yang, and B.A. Hemmings. 2004. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 29:233-42.
- Cantley, L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296:1655-7.
- Cavallaro, U., and G. Christofori. 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 4:118-32.
- Cavallaro, U., S. Liebner, and E. Dejana. 2006. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res*. 312:659-67.
- Cavallaro, U., B. Schaffhauser, and G. Christofori. 2002. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett*. 176:123-8.

- Chintala, S.K., R. Sawaya, Z.L. Gokaslan, G. Fuller, and J.S. Rao. 1996. Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in human glioma, both in vivo and in vitro. *Cancer Lett.* 101:107-14.
- Collins, A.R. 1998. Molecular epidemiology in cancer research. *Mol Aspects Med.* 19:359-432.
- Cordier, S., M.L. Mousel, C. Le Goaster, G. Gachelin, N. Le Moual, L. Mandereau, F. Carrat, G. Michaud, and D. Hemon. 1995. Cancer risk among workers in biomedical research. *Scand J Work Environ Health.* 21:450-9.
- Daly, L., B. Herity, and G.J. Bourke. 1994. An investigation of brain tumours and other malignancies in an agricultural research institute. *Occup Environ Med.* 51:295-8.
- Demuth, T., and M.E. Berens. 2004. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol.* 70:217-28.
- Derycke, L.D., and M.E. Bracke. 2004. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol.* 48:463-76.
- Dietzmann, K., and P. von Bossanyi. 1994. Coexpression of epidermal growth factor receptor protein and c-erbB-2 oncoprotein in human astrocytic tumors. An immunohistochemical study. *Zentralbl Pathol.* 140:335-41.
- Diserens, A.C., N. de Tribolet, A. Martin-Achard, A.C. Gaide, J.F. Schnegg, and S. Carrel. 1981. Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta Neuropathol (Berl).* 53:21-8.
- Dittmar, T., A. Husemann, Y. Schewe, J.R. Nofer, B. Niggemann, K.S. Zanker, and B.H. Brandt. 2002. Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of c-erbB-2 receptor via EGFR. *Faseb J.* 16:1823-5.
- Dropcho, E.J., and S.J. Soong. 1996. The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology.* 47:684-90.
- Ekstrand, A.J., N. Longo, M.L. Hamid, J.J. Olson, L. Liu, V.P. Collins, and C.D. James. 1994. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular

- domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene*. 9:2313-20.
- Fang, D., D. Hawke, Y. Zheng, Y. Xia, J. Meisenhelder, H. Nika, G.B. Mills, R. Kobayashi, T. Hunter, and Z. Lu. 2007. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem*. 282:11221-9.
- Fearon, E.R., and B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61:759-67.
- Fedor-Chaiken, M., T.E. Meigs, D.D. Kaplan, and R. Brackenbury. 2003. Two regions of cadherin cytoplasmic domains are involved in suppressing motility of a mammary carcinoma cell line. *J Biol Chem*. 278:52371-8.
- Feldkamp, M.M., P. Lala, N. Lau, L. Roncari, and A. Guha. 1999. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery*. 45:1442-53.
- Fuchs, E., J. Dowling, J. Segre, S.H. Lo, and Q.C. Yu. 1997. Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for beta 1 and beta 4 integrins. *Curr Opin Genet Dev*. 7:672-82.
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1990. Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell*. 60:849-59.
- Graus-Porta, D., R.R. Beerli, J.M. Daly, and N.E. Hynes. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J*. 16:1647-55.
- Graus-Porta, D., R.R. Beerli, and N.E. Hynes. 1995. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol*. 15:1182-91.
- Hardell, L., M. Carlberg, F. Soderqvist, K.H. Mild, and L.L. Morgan. 2007. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occup Environ Med*. 64:626-32.

- Haroun, R.I., R.E. Clatterbuck, M.C. Gibbons, P.C. Burger, R. Parker, J.P. Fruehauf, and H. Brem. 2002. Extreme drug resistance in primary brain tumors: in vitro analysis of 64 resection specimens. *J Neurooncol.* 58:115-23.
- Haynik, D.M., A.A. Roma, and R.A. Prayson. 2007. HER-2/neu expression in glioblastoma multiforme. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 15:56-8.
- Hazan, R.B., G.R. Phillips, R.F. Qiao, L. Norton, and S.A. Aaronson. 2000. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol.* 148:779-90.
- Hegi, M.E., A.C. Diserens, T. Gorlia, M.F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, and R. Stupp. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 352:997-1003.
- Hehlgans, S., M. Haase, and N. Cordes. 2007. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta.* 1775:163-80.
- Hendriks, B.S., L.K. Opresko, H.S. Wiley, and D. Lauffenburger. 2003a. Coregulation of epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels and locations: quantitative analysis of HER2 overexpression effects. *Cancer Res.* 63:1130-7.
- Hendriks, B.S., L.K. Opresko, H.S. Wiley, and D. Lauffenburger. 2003b. Quantitative analysis of HER2-mediated effects on HER2 and epidermal growth factor receptor endocytosis: distribution of homo- and heterodimers depends on relative HER2 levels. *J Biol Chem.* 278:23343-51.
- Hochberg, F., P. Toniolo, and P. Cole. 1984. Head trauma and seizures as risk factors of glioblastoma. *Neurology.* 34:1511-4.
- Hofer, S., and R. Herrmann. 2001. Chemotherapy for malignant brain tumors of astrocytic and oligodendroglial lineage. *J Cancer Res Clin Oncol.* 127:91-5.
- Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes. 2003. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.* 284:99-110.

- Holbro, T., and N.E. Hynes. 2004. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:195-217.
- Holland, E.C. 2000. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6242-4.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Ishii, N., D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A.C. Diserens, and E.G. Van Meir. 1999. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol.* 9:469-79.
- Jorissen, R.N., F. Walker, N. Pouliot, T.P. Garrett, C.W. Ward, and A.W. Burgess. 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* 284:31-53.
- Kashima, T., K. Nakamura, J. Kawaguchi, M. Takanashi, T. Ishida, H. Aburatani, A. Kudo, M. Fukayama, and A.E. Grigoriadis. 2003. Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer.* 104:147-54.
- Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciano, S. Wennstrom, P.H. Warne, and J. Downward. 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J.* 16:2783-93.
- Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 87:159-70.
- Kippenberger, S., S. Loitsch, J. Muller, M. Guschel, R. Kaufmann, and A. Bernd. 2004. Ligation of the beta4 integrin triggers adhesion behavior of human keratinocytes by an "inside-out" mechanism. *J Invest Dermatol.* 123:444-51.
- Kleihues, P., and H. Ohgaki. 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1:44-51.
- Kleihues, W.K.C. 2000. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press, Lyon

- Knobbe, C.B., A. Merlo, and G. Reifenberger. 2002. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol.* 4:196-211.
- Koka, V., A. Potti, S.E. Forseen, H. Pervez, G.N. Fraiman, M. Koch, and R. Levitt. 2003. Role of Her-2/neu overexpression and clinical determinants of early mortality in glioblastoma multiforme. *Am J Clin Oncol.* 26:332-5.
- Kotelevets, L., J. van Hengel, E. Bruyneel, M. Mareel, F. van Roy, and E. Chastre. 2001. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for stabilizing intercellular junctions and reverting invasiveness. *J Cell Biol.* 155:1129-35.
- Kotelevets, L., J. van Hengel, E. Bruyneel, M. Mareel, F. van Roy, and E. Chastre. 2005. Implication of the MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness. *Faseb J.* 19:115-7.
- Lenferink, A.E., R. Pinkas-Kramarski, M.L. van de Poll, M.J. van Vugt, L.N. Klapper, E. Tzahar, H. Waterman, M. Sela, E.J. van Zoelen, and Y. Yarden. 1998. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *Embo J.* 17:3385-97.
- Li, Y.J., M. Sanson, K. Hoang-Xuan, J.Y. Delattre, M. Poisson, G. Thomas, and R. Hamelin. 1995. Incidence of germ-line p53 mutations in patients with gliomas. *Int J Cancer.* 64:383-7.
- Linggi, B., and G. Carpenter. 2006. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 16:649-56.
- Louis, D.N. 2006. Molecular Pathology of Malignant Gliomas. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 1:97-117.
- Louis, D.N., Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavenee (Eds.). 2007. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC Press, Lyon.
- Lowes, V.L., N.Y. Ip, and Y.H. Wong. 2002. Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors. *Neurosignals.* 11:5-19.
- Mawrin, C., S. Diете, T. Treuheit, S. Kropf, C.K. Vorwerk, C. Boltze, E. Kirches, R. Firsching, and K. Dietzmann. 2003. Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. *Int J Oncol.* 23:641-8.

- Messerle, K., J. Schlegel, N.E. Hynes, and B. Groner. 1994. NIH/3T3 cells transformed with the activated erbB-2 oncogene can be phenotypically reverted by a kinase deficient, dominant negative erbB-2 variant. *Mol Cell Endocrinol.* 105:1-10.
- Miller, C.R., and A. Perry. 2007. Glioblastoma. *Arch Pathol Lab Med.* 131:397-406.
- Mineo, J.F., A. Bordron, M. Baroncini, C.A. Maurage, C. Ramirez, R.M. Siminski, C. Berthou, and P. Dam Hieu. 2007. Low HER2-expressing glioblastomas are more often secondary to anaplastic transformation of low-grade glioma. *J Neurooncol.* 85:281-7.
- Murphy, L.O., and J. Blenis. 2006. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci.* 31:268-75.
- Nagata, Y., K.H. Lan, X. Zhou, M. Tan, F.J. Esteva, A.A. Sahin, K.S. Klos, P. Li, B.P. Monia, N.T. Nguyen, G.N. Hortobagyi, M.C. Hung, and D. Yu. 2004. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 6:117-27.
- Nakashima, T., C. Huang, D. Liu, K. Kameyama, D. Masuya, S. Kobayashi, M. Kinoshita, and H. Yokomise. 2003. Neural-cadherin expression associated with angiogenesis in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer.* 88:1727-33.
- Nicholas, M.K., R.V. Lukas, N.F. Jafri, L. Faoro, and R. Salgia. 2006. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res.* 12:7261-70.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. 2005. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64:479-89.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 170:1445-53.
- Ohnishi, T., S. Hiraga, S. Izumoto, H. Matsumura, Y. Kanemura, N. Arita, and T. Hayakawa. 1998. Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues. *Clin Exp Metastasis.* 16:729-41.

- Osherov, N., A. Gazit, C. Gilon, and A. Levitzki. 1993. Selective inhibition of the epidermal growth factor and HER2/neu receptors by tyrphostins. *J Biol Chem.* 268:11134-42.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M.H. Cobb. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22:153-83.
- Pedersen, M.W., M. Meltorn, L. Damstrup, and H.S. Poulsen. 2001. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol.* 12:745-60.
- Peiffer, J., and P. Kleihues. 1999. Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathol.* 9:241-5.
- Perego, C., C. Vanoni, S. Massari, A. Raimondi, S. Pola, M.G. Cattaneo, M. Francolini, L.M. Vicentini, and G. Pietrini. 2002. Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organisation of the cadherin-catenin adhesion system. *J Cell Sci.* 115:3331-40.
- Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell.* 112:535-48.
- Persad, S., A.A. Troussard, T.R. McPhee, D.J. Mulholland, and S. Dedhar. 2001. Tumor suppressor PTEN inhibits nuclear accumulation of beta-catenin and T cell/lymphoid enhancer factor 1-mediated transcriptional activation. *J Cell Biol.* 153:1161-74.
- Picksley, S.M., and D.P. Lane. 1993. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays.* 15:689-90.
- Potti, A., S.E. Forseen, V.K. Koka, H. Pervez, M. Koch, G. Fraiman, S.A. Mehdi, and R. Levitt. 2004. Determination of HER-2/neu overexpression and clinical predictors of survival in a cohort of 347 patients with primary malignant brain tumors. *Cancer Invest.* 22:537-44.
- Prados, M.D., and V. Levin. 2000. Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol.* 27:1-10.

- Preston-Martin, S. 1996. Epidemiology of primary CNS neoplasms. *Neurol Clin.* 14:273-90.
- Prives, C. 1998. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell.* 95:5-8.
- Qian, X., T. Karpova, A.M. Sheppard, J. McNally, and D.R. Lowy. 2004. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *Embo J.* 23:1739-48.
- Reifenberger, G., L. Liu, K. Ichimura, E.E. Schmidt, and V.P. Collins. 1993. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.* 53:2736-9.
- Ries, L., Kosary CL, Hankey BF, Harras A, Miller BA, Edwards BK,. 1996. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1993: tables and graphs, National Cancer Institute, Bethesda, MD.
- Rosales, C., V. O'Brien, L. Kornberg, and R. Juliano. 1995. Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1242:77-98.
- Ruder, A.M., M.A. Waters, M.A. Butler, T. Carreon, G.M. Calvert, K.E. Davis-King, P.A. Schulte, W.T. Sanderson, E.M. Ward, L.B. Connally, E.F. Heineman, J.S. Mandel, R.F. Morton, D.J. Reding, K.D. Rosenman, and G. Talaska. 2004. Gliomas and farm pesticide exposure in men: the upper midwest health study. *Arch Environ Health.* 59:650-7.
- Ryan, P., M.W. Lee, B. North, and A.J. McMichael. 1992. Risk factors for tumors of the brain and meninges: results from the Adelaide Adult Brain Tumor Study. *Int J Cancer.* 51:20-7.
- Sasaoka, T., W.J. Langlois, J.W. Leitner, B. Draznin, and J.M. Olefsky. 1994. The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J Biol Chem.* 269:32621-5.
- Schlegel, J., A. Merdes, G. Stumm, F.K. Albert, M. Forsting, N. Hynes, and M. Kiessling. 1994a. Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma. *Int J Cancer.* 56:72-7.

- Schlegel, J., G. Piontek, B. Budde, F. Neff, and A. Kraus. 2000. The Akt/protein kinase B-dependent anti-apoptotic pathway and the mitogen-activated protein kinase cascade are alternatively activated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Lett.* 158:103-8.
- Schlegel, J., G. Stumm, K. Brandle, A. Merdes, G. Mechtersheimer, N.E. Hynes, and M. Kiessling. 1994b. Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. *J Neurooncol.* 22:201-7.
- Schreiner, C., M. Fisher, S. Hussein, and R.L. Juliano. 1991. Increased tumorigenicity of fibronectin receptor deficient Chinese hamster ovary cell variants. *Cancer Res.* 51:1738-40.
- Schwechheimer, K., L. Zhou, and W. Birchmeier. 1998. E-Cadherin in human brain tumours: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas. *Virchows Arch.* 432:163-7.
- Shimamura, K., and M. Takeichi. 1992. Local and transient expression of E-cadherin involved in mouse embryonic brain morphogenesis. *Development.* 116:1011-9.
- Shinoura, N., N.E. Paradies, R.E. Warnick, H. Chen, J.J. Larson, J.J. Tew, M. Simon, R.A. Lynch, Y. Kanai, S. Hirohashi, and et al. 1995. Expression of N-cadherin and alpha-catenin in astrocytomas and glioblastomas. *Br J Cancer.* 72:627-33.
- Sieg, D.J., C.R. Hauck, D. Ilic, C.K. Klingbeil, E. Schaefer, C.H. Damsky, and D.D. Schlaepfer. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2:249-56.
- Stupp, R., W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R.O. Mirimanoff. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 352:987-96.
- Tamura, M., J. Gu, K. Matsumoto, S. Aota, R. Parsons, and K.M. Yamada. 1998. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science.* 280:1614-7.

- Tamura, M., J. Gu, T. Takino, and K.M. Yamada. 1999. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res.* 59:442-9.
- Terasaki, M., E. Ogo, S. Fukushima, K. Sakata, N. Miyagi, T. Abe, and M. Shigemori. 2007. Impact of combination therapy with repeat surgery and temozolomide for recurrent or progressive glioblastoma multiforme: a prospective trial. *Surg Neurol.* 68:250-4.
- Tomatis, L. 1994. Transgeneration carcinogenesis: a review of the experimental and epidemiological evidence. *Jpn J Cancer Res.* 85:443-54.
- Traxler, P., P.R. Allegrini, R. Brandt, J. Brueggen, R. Cozens, D. Fabbro, K. Grosios, H.A. Lane, P. McSheehy, J. Mestan, T. Meyer, C. Tang, M. Wartmann, J. Wood, and G. Caravatti. 2004. AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res.* 64:4931-41.
- Tzahar, E., H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunagaran, S. Lavi, B.J. Ratzkin, and Y. Yarden. 1996. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 16:5276-87.
- Ueki, K., Y. Ono, J.W. Henson, J.T. Efrid, A. von Deimling, and D.N. Louis. 1996. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 56:150-3.
- Uhm, J.H., C.L. Gladson, and J.S. Rao. 1999. The role of integrins in the malignant phenotype of gliomas. *Front Biosci.* 4:D188-99.
- Ullrich, A., and J. Schlessinger. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61:203-12.
- Utsuki, S., Y. Sato, H. Oka, B. Tsuchiya, S. Suzuki, and K. Fujii. 2002. Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *J Neurooncol.* 57:187-92.
- Van Aken, E., O. De Wever, A.S. Correia da Rocha, and M. Mareel. 2001. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch.* 439:725-51.

- Van Aken, E.H., O. De Wever, L. Van Hoorde, E. Bruyneel, J.J. De Laey, and M.M. Mareel. 2003. Invasion of retinal pigment epithelial cells: N-cadherin, hepatocyte growth factor, and focal adhesion kinase. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:463-72.
- Varner, J.A., D.A. Emerson, and R.L. Juliano. 1995. Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell.* 6:725-40.
- Wada, T., X.L. Qian, and M.I. Greene. 1990. Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function. *Cell.* 61:1339-47.
- Waterman, H., I. Sabanai, B. Geiger, and Y. Yarden. 1998. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem.* 273:13819-27.
- Watt, F.M. 2002. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J.* 21:3919-26.
- Weinberg, R.A. 1996. How cancer arises. *Sci Am.* 275:62-70.
- Wells, A. 1999. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 31:637-43.
- Wolf-Yadlin, A., N. Kumar, Y. Zhang, S. Hautaniemi, M. Zaman, H.D. Kim, V. Grantcharova, D.A. Lauffenburger, and F.M. White. 2006. Effects of HER2 overexpression on cell signaling networks governing proliferation and migration. *Mol Syst Biol.* 2:54.
- Yano, H., Y. Mazaki, K. Kurokawa, S.K. Hanks, M. Matsuda, and H. Sabe. 2004. Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 166:283-95.
- Yarden, Y. 2001. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology.* 61 Suppl 2:1-13.
- Zwick, E., J. Bange, and A. Ullrich. 2002. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med.* 8:17-23.

G. Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien, Proteine und Enzyme

Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
Cy3	Cyanin 3
DAB	3,3' Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2- Phenylindoldihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growthfactor</i>
EGFR	<i>epidermal growthfactor receptor</i>
Erk	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
HCl	Salzsäure
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor-2</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O bidest.	Destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LB	<i>lysogeny broth</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MEK	MAPK/Erk Kinase
Mg ²⁺	Magnesium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Poymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositol 3 Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase

s. a.	siehe auch
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s. o.	siehe oben
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
TM	Transmembran Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Nukleinsäuren/Aminosäuren

A	Alanin
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
cDNA	Komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang DNA
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Glutamin
K	Lysin
P	Phosphat
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
pY	phospho Tyrosin
RNA	Ribonukleinsäure
Ser	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
V	Valin
Y	Tyrosin

Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm

Abkürzungsverzeichnis

nM	Nanomolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
OD	Optische Dichte
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
u	Enzymaktivität (unit)
sek	Sekunden
v/v	Volumen/Volumen
V	Volt
w/v	Gewicht/Volumen

H. Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Anne Rappl, Guido Piontek and Jürgen Schlegel; Modulation of EGF receptor signaling by HER2 leads to changes in glial cell migration by reorganization of N-cadherin; *JCS submitted*

Anne Rappl, Guido Piontek, Frauke Neff and Jürgen Schlegel; N-cadherin is downregulated and processed to the cytoplasm in the infiltration zone of human glioblastoma; *J Pathol submitted*

Kongresse

- | | |
|-------------------------|--|
| 20.09.2006 – 24.09.2006 | Neurowoche 2006, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie, Mannheim
A. Rappl, G. Piontek and J. Schlegel
Poster: The ErbB2 receptor modulates EGFR-mediated signals and regulates migration of human glioma cells |
| 02.11.2006 – 04.11.2006 | 10 th Joint Meeting, Signal Transduction Society (STS) Signaltransduction, Receptors, Mediators and Genes, Weimar
A. Rappl, G. Piontek and J. Schlegel
Poster: The ErbB2 receptor modulates EGFR-mediated signals and regulates migration of human glioma cells by reorganization of N-cadherin |

Herzlich und aufrichtig möchte ich mich bei Herrn Prof. Jürgen Schlegel bedanken, der es mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe ein wirklich interessantes Forschungsgebiet, in einem hervorragend ausgestatteten Labor, zu bearbeiten. Ich danke ihm weiterhin für die stets angenehme und familiäre Arbeitsatmosphäre, gute Betreuung in der Arbeitsgruppe und für anregende Gespräche und Diskussionen, die dieser Arbeit sehr zugute gekommen sind.

Bei Herrn Prof. Wolfgang Wurst möchte ich mich bedanken, dass er sich als Betreuer bei der Fakultät WZW zur Verfügung gestellt hat.

Mein besonderer Dank gilt dem Graduiertenkolleg 333 der DFG für die Finanzierung des Projekts und damit stellvertretend Dr. Karen Schmidt-Bäse, für die tollen Seminare, Workshops und Exkursionen, die von ihr organisiert wurden.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Arbeitsgruppenmitgliedern bedanken, bei Guido, Ingrid, Jenny und Frauke, die mich von Anfang an freundlich aufgenommen haben und mir immer und zu jeder Zeit kompetent mit Rat und Tat zur Seite standen. Es hat großen Spaß gemacht in dieser AG zu arbeiten und die Diskussionen, lustigen Gespräche und das gemeinsame Frühstück werden mir sehr fehlen. Jenny und Guido sind außerdem die besten Büro-Mitbewohner, die man sich wünschen kann und ich danke beiden sehr für die Durchsicht des Manuskripts.

Der AG Luber und der AG Becker, deren Mitglieder ich hier nicht alle namentlich erwähnen kann, möchte ich ganz herzlich danken, für fachlichen Rat und Unterstützung in jeder Lebenslage und natürlich für die Kaffeepausen und vielen lustigen Momente innerhalb und außerhalb des Institutes. Dies gilt v. a. für Anja, Kareen, Susi und Joelle. Dr. Monika Balzer, dem wandelnden Protokollbuch, gilt mein besonderer Dank, da sie immer einen guten Tip und wirklich kompetente Ratschläge für die Behebung sämtlicher Probleme in petto hat.

In tiefer Dankbarkeit und Respekt möchte ich hier noch meine Familie erwähnen, die mich immer unterstützt hat und mir alles was ich erreicht habe erst ermöglicht hat.

Mein spezieller Dank gilt dabei Matthias, der mich in den letzten zwei Monaten vor Abgabe der Arbeit ertragen mußte.