

Technische Universität München

Aus dem Fachgebiet für Neuropathologie

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel)

des

**Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der
Technischen Universität München**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

Charakterisierung der intrazellulären Signaltransduktion und Nachweis von Tumorstammzellen in humanen, malignen Gliomen nach experimenteller Strahlentherapie

Andreas Beringer

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

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel
2. Priv.-Doz. Dr. H. C.-W. E. Geinitz

Die Dissertation wurde am 19.10.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.06.2010 angenommen.

Für Resl

Inhaltsverzeichnis

1.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
2.	Abkürzungsverzeichnis	8
3.	Problemstellung	11
4.	Glioblastoma multiforme	11
4.1	Klassifikation glialer Tumoren	11
4.2	Pathologie des Glioblastoms	12
4.3	Ätiologie, Epidemiologie, Klinik und Risikofaktoren	13
4.4	Molekularpathologie astroglialer Tumoren	14
4.5	Therapiestandards	16
5.	Strahlentherapie astroglialer Tumoren	16
6.	Tyrosinkinase und Signaltransduktion	17
6.1	Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	17
6.2	PI3-Kinase / Akt / Proteinkinase B (PKB)	21
6.3	MAP-Kinase (MAPK)	24
6.4	Mammalian Target-of-Rapamycin (mTOR)	26
7.	Tumorstammzellen	29
7.1	Einleitung	29
7.2	Identifikationstechniken	31
7.2.1	<i>Neurosphärenkultur</i>	31
7.2.2	<i>Neuronale Differenzierung</i>	31
7.2.3	<i>Prominin 1/CD133 Proteinexpression</i>	32
7.2.4	<i>Nachweis einer Side Population mittels FACS-Analyse</i>	34

8.	Zielsetzung der Arbeit	36
9.	Material und Methoden	37
9.1	Material	37
9.1.1	<i>Geräte</i>	37
9.1.2	<i>Zellkultur: Zelllinien, Kultivierungs- und Arbeitsmaterialien</i>	38
9.1.3	<i>Lösungen, Puffer und Reagenzien</i>	39
9.1.4	<i>Primär- und Sekundärantikörper</i>	41
9.1.5	<i>Größenstandard</i>	42
9.1.6	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	42
9.2	Methoden	43
9.2.1	<i>Zellkultur</i>	43
9.2.2	<i>Versuchsmodalitäten</i>	44
9.2.3	<i>Colony formation assays (colony assays)</i>	45
9.2.4	<i>Zellvitalitätsassays</i>	46
9.2.5	<i>Gewinnung von Proteinlysaten</i>	47
9.2.6	<i>Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford</i>	47
9.2.7	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	48
9.2.8	<i>Western Blot Analysen</i>	49
9.2.9	<i>Neurosphärenkultur</i>	49
9.3	Neuronale Differenzierung	50
9.3.1	<i>Immunfluoreszenz</i>	51
9.3.2	<i>Prominin 1/CD133 Proteinexpression</i>	52
9.3.3	<i>Nachweis einer Side Population mittels FACS-Analyse</i>	52
9.3.4	<i>Statistik</i>	53
10.	Ergebnisse	54
10.1	Colony formation assays	54
10.2	Zellvitalitätsassays	61
10.3	Western Blot Analysen	67
10.4	Neurosphärenkultur	75
10.5	Neuronale Differenzierung	77
10.6	Immunfluoreszenz Nestin	77

10.7	Prominin 1/CD133 Proteinexpression	78
10.8	Nachweis einer Side Population mittels FACS-Analyse	78
10.9	Colony formation assay Side Population LN 18	80
11.0	Zellvitalitätsassay Side Population LN 18	81
12.	Diskussion	83
12.1	Einleitung	83
12.2	Beurteilung der Methodik	84
12.3	Zusammenfassende Beurteilung der eigenen Ergebnisse	87
12.3.1	<i>Bestrahlung</i>	88
12.3.2	<i>Chemoinhibitoren und Bestrahlung in den colony formation assays</i>	89
12.3.3	<i>Chemoinhibitoren und Bestrahlung in den Zellvitalitätsassays und Western Blot Analysen</i>	91
12.3.4	<i>Tumorstammzellen</i>	94
13.	Zusammenfassung	95
13.1	Klinische Bedeutung und Ausblick	97
14.	Literaturverzeichnis	99
15.	Erklärung	123
16.	Danksagung	124

1. **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abb. 1: Die ErbB- / HER-Familie und der EGF-Rezeptor	21
Abb. 2: Der PI3-Kinase / Akt-Signalweg	24
Abb. 3: Der MAP-Kinase-Signalweg	26
Abb. 4: Der mammalian Target-of-Rapamycin-Signalweg	28
Tab. 1: Vergleichende Übersicht: Eigenschaften adulter, neuraler Stammzellen und Tumorstammzellen	30
Abb. 5: FACS-Analyse Side Population	35
Tab. 2: Primär- und Sekundärantikörper	41
Tab. 3: Zelllinien und Eigenschaften	43
Tab. 4: Bradford-Ansatz	47
Tab. 5: Zusammensetzungen Sammelgel und Trenngel für SDS-PAGE	48
Tab. 6: Neurobasal-Medium (N2-Medium)	50
Tab. 7: Neuronales Differenzierungsmedium	51
Abb. 6: Beispielbilder Zellkulturschalen colony formation assays	54
Tab. 8: Ergebnisse des colony assays der Zelllinie LN 18	55
Abb. 7: Grafische Darstellung des colony assays der Zelllinie LN 18	55
Abb. 8: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse für LN 18	56
Tab. 9: Ergebnisse des colony assays der Zelllinie LN 229	56
Abb. 9: Grafische Darstellung des colony assays der Zelllinie LN 229	57
Abb. 10: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse für LN 229	57
Tab. 10: Ergebnisse des colony assays der Zelllinie G 139	58
Abb. 11: Grafische Darstellung des colony assays der Zelllinie G 139	58
Abb. 12: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse für G 139	59
Tab. 11: Ergebnisse des colony assays der Zelllinie LNZ 308	59
Abb. 13: Grafische Darstellung des colony assays der Zelllinie LNZ 308	60
Abb. 14: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse für LNZ 308	60
Tab. 12: Extinktionsmesswerte LN 18	61
Abb. 15: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 16	62
Tab. 13: Extinktionsmesswerte LN 229	63
Abb. 16: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 17	63
Tab. 14: Extinktionsmesswerte G 139	64

Abb. 17: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 18	65
Tab. 15: Extinktionsmesswerte LNZ 308	66
Abb. 18: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 19	66
Abb. 19: Western Blot der Zelllinien LN18, LN 229, G 139 und LNZ 308 für EGFR, PTEN, p53 und Phospho-Akt	67
Abb. 20: Übersicht p-Akt Zelllinie LN 18	68
Abb. 21: Übersicht p-Akt Zelllinie LN 229	69
Abb. 22: Übersicht p-Akt Zelllinie G 139	70
Abb. 23: Übersicht p-Akt Zelllinie LNZ 308	71
Abb. 24: Übersicht p-p 44/42-MAPK Zelllinie LN 18	72
Abb. 25: Übersicht p-p 44/42-MAPK Zelllinie LN 229	73
Abb. 26: Übersicht p-p 44/42-MAPK Zelllinie G 139	74
Abb. 27: Übersicht p-p-44/42-MAPK Zelllinie LNZ 308	75
Abb. 28: Zellmorphologie nach 2-4, 6-10 und 14 Tagen Inkubation in N2-Medium	76
Abb. 29: β III-Tubulin Immunfluoreszenz LN 18	77
Abb. 30: Immunfluoreszenz Nestin LN 18	77
Abb. 31: Prominin 1/CD133 Immunfluoreszenz LN 18	78
Abb. 32: Zweiparametrische FACS-Analyse	79
Tab. 16: Ergebnisse des colony assays zur Side Population der Zelllinie LN 18	80
Abb. 33: Grafische Darstellung des colony assays der LN 18 Side Population	80
Abb. 34: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse zur LN 18 Side Population	81
Tab. 17: Extinktionsmesswerte der LN 18 Side Population	81
Abb. 35: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 21	82

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid
Cy3	Cyanin 3
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growthfactor
EGFR	Epidermal Growthfactor Receptor
EGFRvIII	Epidermal Growthfactor Receptor variant III
ELF4EBP1	Eukaryotic translation initiation Factor 4E Binding Protein 1
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HER	Human Epidermal Growth Factor receptor
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HRP	Horseradish Peroxidase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O bidest.	Destilliertes Wasser
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
JAK	Janus Kinase
kDa	Kilodalton

kV	Kilovolt
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MEK	MAPK/Erk Kinase
Mg ²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
p-	phospho
p	statistischer p-Wert
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCV	Procarbazin, Lomustin, Vincristin
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha
pH	pondus Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositol 3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
%	Prozent
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	Rat sarcoma
Raf	Rapidly growing Fibrosarcoma
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shc	Src homology 2 domain containing
sog.	sogenannt(e/s)
Src	Abkürzung für ‚sarcoma‘ – Protoonkogen
S6K1/2	p70 ribosomal protein S6 kinase 1/2
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription protein
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem / unter anderen
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
Vol%	Volumen Prozent
vs.	versus
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
wt oder WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

3. Problemstellung

Unter den Neoplasien des Zentralen Nervensystems sind Glioblastome (GBM) die absolut häufigsten und unter den malignen Gliomen die relativ häufigsten bösartigen Missbildungen. Ihre Prognose ist stets verheerend. GBM führen unabhängig von einer Therapie aufgrund ihres infiltrativen Wachstums und ihrer ausgeprägten Therapieresistenz zur kürzesten Lebenserwartung unter den cerebralen Tumoren.

Ungeachtet dessen konnte in den letzten Jahren durch den Einsatz neuer Behandlungsmodalitäten eine beachtliche Therapieverbesserung erreicht werden. Nach wie vor stellt die möglichst vollständige, jedoch bezüglich relevanter Hirnstrukturen limitierte chirurgische Intervention die primäre Behandlungsmöglichkeit dar. Adjuvante Radio- und oder Radiochemotherapie (z.B.: stereotaktisch/interstitiell) ergänzen die operativen Maßnahmen (Stupp et al. 2009 und 2005 / Grossman und Batara 2004 / McDermott et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollten in einem Zellkulturmodell an Glioblastomzelllinien intrazelluläre und Rezeptortyrosinkinasen-vermittelte (EGF-Rezeptor) Signalwege unter dem Gesichtspunkt der experimentellen Bestrahlung untersucht werden. Überdies bestand der Anspruch, das Vorhandensein einer Subpopulation von Zellen mit stammzellartigen Eigenschaften innerhalb dieser Glioblastomzellen nachweisen zu können und diese in ihrem biologischen Verhalten auf experimentelle Bestrahlung zu untersuchen.

4. Glioblastoma multiforme

4.1 Klassifikation glialer Tumoren

Das Glioblastom ist astrozytären, neuroepithelialen Ursprungs und der häufigste, hirneigene Tumor. Es macht ca. 60% aller astrozytären Tumoren aus.

Je höher der Malignitätsgrad (Stufen I bis IV nach WHO) des glialen Tumors eingestuft wird, umso deutlicher ist der Grad der Entdifferenzierung ausgeprägt.

Astrozytäre Tumoren werden gemäss World Health Organization, WHO, (auszugsweise; Stand 2007 nach Louis, Kleihues und Cavenee) eingeteilt in:

Umschriebenes Wachstum und fehlende Tendenz zur Tumorprogression:

- Pilozytisches Astrozytom (WHO Grad I)
- Subependymales Riesenzellastrozytom (WHO Grad I)
- Pleomorphes Xanthoastrozytom (WHO Grad II)

Diffuses Wachstum und regelmäßige Tendenz zur Tumorprogression:

- Diffuses Astrozytom (WHO Grad II, niedrigmaligne)
- Anaplastisches Astrozytom (WHO Grad III, hochmaligne)
- **Glioblastom (WHO Grad IV, hochmaligne)**

4.2 Pathologie des Glioblastoms

Das Wachstum ist stets infiltrierend, die histopathologische Differenzierung erfasst Zell- und Kernpolymorphie, eine erhöhte Mitoserate und das Vorkommen pathologischer Mitosen, mikrovaskulärer Proliferate, eine erhöhte Zelldichte sowie flächenhafte und strichförmige Tumornekrosen.

Als immunhistochemische Methoden kommen der Nachweis des GFAP (Gliales saures Faserprotein), des S100-Proteins und des Proliferationsmarkers Ki-67 zur Anwendung. Proinflammatorische und immunsuppressive Zytokine der malignen Gliomzellen bestimmen das durch sie erreichte Mikromilieu ebenso wie angiogenetische Faktoren. Dies führt zur Ödembildung des umgebenden Hirngewebes, einer Anergie zytotoxischer Lymphozyten und NK-Zellen sowie zu einer überschüssenden, malignen Gefässversorgung des Tumors. Glioblastome sind überwiegend in temporalen und parietalen Hirnarealen lokalisiert, andere Gebiete wie z.B. hirstamm- oder olfaktoriusnahe Regionen können aber ebenso in seltenen Fällen betroffen sein. Ein Wachstum über das Corpus callosum manifestiert sich als sog. Schmetterlingsgliom. Histologische Varianten sind z.B. das Gliosarkom oder das Riesenzellglioblastom sowie auch das kleinzellige Glioblastom (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2008 / Louis et al., 2007 / Burnet et al., 2007 / Miller und Perry, 2007 / Strojnik et al., 2006).

4.3 Ätiologie, Epidemiologie, Klinik und Risikofaktoren des Glioblastoms

Entsprechend den Informationen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie beträgt die Inzidenz des Glioblastoms in Deutschland ca. 3-4/100000 Einwohner pro Jahr, wobei Männer doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Glioblastome können in jedem Lebensalter auftreten, bevorzugt allerdings in der 5. und 6. Lebensdekade mit einem Manifestationsgipfel bei ca. 62 Jahren. Ihr Anteil an allen Hirntumoren macht ca. 15-20% aus und der Anteil an glialen Tumoren beträgt ca. 40% (Preston-Martin, 1996). Etwa 90% aller GBM kehren nach Therapie wieder sehr nahe an ihrer ursprünglichen, cerebralen Lokalisierung auf (Hofer et al., 2001). Die Prognose ist abhängig von Alter, Karnofsky-Index, Tumorgrading, Resektionsausmaß- und zeitpunkt, Ansprechen auf Radio- bzw. Radiochemotherapie, Lokalisation des Tumors, Rezidivsituation, Anzahl der Tumormanifestationen und radiotherapeutischem Vorgehen. Die 2-Jahres-Überlebensrate beträgt um 25% unter perioperativer Radiochemotherapie, Einzelfälle von mehreren Jahren Überlebenszeit sind beschreiben. (Stupp et al., 2009 / Stummer et al., 2008 / Pichlmeier et al., 2008 / Tait et al., 2007).

Die grundlegenden Ursachen der malignen astrozytären Entartung sind bis heute ungeklärt. Für die Entstehung von Tumoren im Allgemeinen wird ein Zusammenkommen verschiedener Faktoren als ursächlich erachtet, obgleich verschiedene Hypothesen zur Tumorgenese existieren. Zu einer mehr oder weniger ausgeprägten genetischen Disposition kommt eine Anhäufung im Laufe des Lebens erworbener Mutationen, die wiederum durch chemische, physikalische, biologische oder durch den Lebensstil geprägte Noxen zustande kommen (Bondy et al., 2008). GBM manifestieren sich klinisch oft in einer diffusen Kopfschmerzsymptomatik, Übelkeit, Erbrechen, Vigilanzstörungen, Apathie, Wesensveränderungen und sich rasch entwickelnder, neurologischer Ausfallserscheinungen bzw. Krampfanfälle, meist mit kurzer Anamnese. Sie können innerhalb weniger Wochen raumfordernd wachsen und eine damit verbundene Symptomatik bis hin zu akuten Blutungen aus neoplastisch veränderten Gefäßen bedingen.

Prädispositionsfaktoren sind bisher wenige bekannt. Hierzu gehören ionisierende Strahlung, männliches Geschlecht und familiäre Tumorsyndrome wie etwa das Li-Fraumeni- oder das Turcot-Syndrom. Assoziationen zu Viren (z.B. Cytomegalievirus)

oder neurokarzinogenen Substanzen sowie Metallen (z.B. Cadmium) sind ebenso beschrieben wie ein inverses Verhältnis bei atopischer Veranlagung (Bondy et al., 2008 / Leitlinien Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Kapitel Gliome, 2008).

4.4 Molekularpathologie astroglialer Tumoren

Es lassen sich primäre und sekundäre Glioblastome unterscheiden. Primäre sind all diejenigen, die de-novo entstehen und sich bei älteren Patienten mit schlechterer Prognose finden. Sekundäre GBM sind sich in Folge einer Tumorprogression aus niedriggradigeren Astrozytomen entwickelnde Tumore. Die Patienten sind hier jünger, die Prognose ist besser. Die primären de-novo-Glioblastome machen ca. 90-95% aller GBM aus, der Rest (ca. 5-10%) entfällt auf die sekundären Glioblastome (Ohgaki und Kleihues, 2005).

In primären GBM sind PTEN-Verluste zusammen mit EGFR-Überexpressionen bzw. Amplifikationen die am häufigsten anzutreffenden Konstitutionsänderungen (Tohma et al., 1998). Der PTEN-Verlust (Chromosom 10) führt auch in vielen weiteren Tumorentitäten zu maligner Entartung (Hopkin, 1998 / von Deimling, 1993). Ein Verlust des Chromosoms 10 (Loss of heterozygosity, LOH auf Chromosom 10q23) und damit verbunden des PTEN-Gens (Phosphatase- und TENsin homolog, auch als MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers 1) bezeichnet) sowie EGF-Rezeptor- (Epidermal Growth Factor) und MDM2- (murine double minute 2) Amplifikationen kennzeichnen die primären Glioblastome (Ohgaki et al. 2004 / Besson et al. 1999 / Tohma et al. 1998 / von Deimling et al. 1993). PTEN ist der biologische Gegenspieler der PI3-Kinase, da es PIP3 zu PIP2 (Phosphatidylinositol 3 bzw. 2) dephosphoryliert. Es besitzt eine negativ regulatorische Funktion auf den der PI3-Kinase nachgeschalteten Signalweg über PKB (Proteinkinase B) / Akt, die ihrerseits zelluläre Mediatoren des Zellüberlebens, der Proliferation und der Anti-Apoptose sind (Vazquez und Sellers 2000 / Besson et al., 1999).

Astrozytäre Tumorzellen, die eine konstitutive Aktivierung von Akt aufwiesen und in Mäuse implantiert wurden, konnten dort Tumoren entwickeln, die an Glioblastome erinnerten. Tumorzellen ohne diese Akt-Aktivierung induzierten lediglich niedriggradigere Tumore (Sonoda et al. 2001). Eine erhöhte Invasivität und

Gelatinase-Aktivität in Zusammenhang mit einer verstärkten PI3-Kinase- und Akt-Aktivierung konnte von Kubiakowski et al. 2001 gezeigt werden.

Vazquez und Sellers veröffentlichten im Jahr 2000 tierexperimentelle Versuche, bei denen PTEN-Knockout Mäuse mit einer konstitutiven PI3-Kinase Aktivierung als Phänotypen einer homozygoten Deletion embryonal letal waren und deren Gewebe Merkmale gesteigerter Proliferation zeigten. Heterozygote Tiere waren von deutlich mehr Tumoren befallen, Fibroblasten dieser Mäuse waren ausgesprochen resistent gegenüber zytotoxischer Behandlung.

Kao et al. beschrieben 2001, wie der EGF-Rezeptor als transmembranäre Rezeptortyrosinkinase an wachstumsfaktor-vermittelten Aktivierungen intrazellulärer Signaltransduktionswege beteiligt ist. Amplifikationen des EGFR-Gens sind in ca. der Hälfte aller GBM identifizierbar und gehören ebenfalls zu den häufigsten Alterationen (Schlegel et al., 1994). Der mutierte, konstitutiv aktivierte EGFR-Subtyp EGFRvIII (EGFR variant III), bei dem die Deletion der Exone 2 bis 7 in der Folge zum Verlust von 267 Aminosäuren der extrazellulären Domäne führt, wird in nahezu der Hälfte aller EGFR überexprimierenden Glioblastome koexprimiert (Loew et al., 2009) und fördert deren tumorigene Signalwege (Gan et al., 2009).

Sekundäre Glioblastome sind überwiegend durch Mutationen im TP53-Tumorsuppressorgen auf Chromosom 17 geprägt (Tohma et al. 1998 / von Deimling et al. 1993). Als Produkt des Gens TP53 spielt p53 eine fundamentale Rolle in der zellulär-genomischen Integrität verschiedenster Zelltypen. Physiologisch sind der Aktivitätsgrad des p53-Proteins und des p53-Inhibitors MDM2 (murine double minute 2 oncogene) über einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert. Von zentraler Bedeutung ist das p53-abhängige, zytologische Kontrollsystem bei der Regulation der Zellzyklus-Blockade für DNA-Reparaturmechanismen, u.a. über Aktivierung des CDK (cyclin dependent kinase) Inhibitors p21 oder Bindung von p53 an den Promoter von hMSH2 (human mutS homolog-2) (Scherer et al. 1996 / Kastan et al. 1991), beispielsweise im Rahmen der Apoptose (Lowe et al. 1993).

Gemeinsame, genetische Aberrationen in GBM sind beschrieben. Loss of heterozygosity (LOH) 10q 25qter kennzeichnet in ca. 70% primäre und sekundäre Glioblastome und MGMT-Promotermethylierungen wurden zu 75% in sekundären und zu 25% in primären GBM dokumentiert (Ohgaki und Kleihues, 2007).

4.5 Therapiestandards

Nahezu weltweit orientieren sich Behandlungsregime an den durch die EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) und das NCIC (National Cancer Institute of Canada) vorgelegten Daten (Stupp et al., 2005). Neben der initialen und primären neurochirurgischen und möglichst kompletten Tumorresektion kommt eine Kombinationstherapie aus Radio- und Chemotherapie mit der Bestrahlung begleitender und anschließend erhaltender Temozolomid-Applikation bei Erstbehandlung zur Anwendung. Regime im Rezidiv gründen ebenso auf Temozolomid bzw. anderen Chemotherapeutika. Bestrahlung und erneute chirurgische Tumorresektion, auch in Kombination mit einer Chemotherapie, werden im Rückfall durchgeführt und sind aufgrund laufender Forschung in ihrer Applikationsform unterschiedlich, weswegen verschiedene Therapiemodalitäten existieren. Zahlreiche Variationen dieses Standards sind Gegenstand aktueller klinischer oder wissenschaftlicher Forschung. Auszugsweise sind dies Modalitäten, die neben Temozolomid, PCV-Triplet, BCNU, Irinotecan und anderen Chemotherapeutika auf die Kombination und Variation mit Substanzen setzen, die etwa die Angiogenese, den EGF-Rezeptor und dessen Varianten, Wachstumsfaktoren, intrazelluläre Signalstoffe, das Invasionsverhalten, das Immunsystem sowie die Gentherapie als Parameter miteinbeziehen (auszugsweise: Yoon et al., 2009 / Dresemann et al., 2009 / Matsuda et al., 2009). Ein Beispiel ist die multizentrische CENTRIC-study, bei der Cilengitid, ein Angiogenesehemmer, gegen die Standardbehandlung bei neu-diagnostiziertem und MGMT-(O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) Promoter methyliertem Glioblastom (Merck Serono, 2009) verglichen wird. Der Verlust der MGMT-Expression durch epigenetische Promotermethylierung führt zu verminderter Reparatur alkylierter DNA. Patienten, die ein solches Merkmal tragen, profitieren deutlicher von einer Temozolomid-Therapie (Hegi et al., 2005).

5. Strahlentherapie astroglialer Tumoren

Als Basisstandard gilt gegenwärtig die im Rahmen der kombinierten Radiochemotherapie mit Temozolomid durchgeführte konventionelle, stereotaktische,

fraktionierte und perkutane Bestrahlung mit Einzeldosen zwischen 1,8 und 2Gy (Gray) bei einer Gesamtdosis von 54 bis 60Gy innerhalb von 6 Wochen, entsprechend einer Toleranzdosis von 5/5 (5%iges Nebenwirkungsrisiko innerhalb der nächsten 5 Jahre) (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Kapitel Gliome, 2008 / Stupp et al., 2005). Eine Dosisescalation, etwa bei Einzeldosen zur Verkürzung der Gesambehandlungszeit, bedingt eine Verminderung der Gesamtdosis, um die Strahlentoleranz des physiologischen Hirngewebes nicht zu überschreiten. Im Rezidiv wird gegenwärtig eine hypofraktionierte stereotaktische Bestrahlung mit 4x 5Gy oder 10-12x 3Gy empfohlen. Bei älteren Patienten und bei solchen mit schlechten prognostischen Faktoren kann eine akzelerierte Therapie mit 30-45Gy mit 3Gy-Fraktionen angewendet werden. Für Patienten über 70 Jahre wirkt sich die Strahlentherapie ebenfalls günstig auf das mediane Überleben aus.

Strahlentherapeutische Variationen sind u.a. die intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT) oder die Radiochirurgie. Die prä- und postoperative Schnittbilddiagnostik ist maßgeblich für das strahlentherapeutische Vorgehen, wobei im Allgemeinen ein ca. 2cm starker Sicherheitsabstand um das eigentliche Tumolvolumen in die Bestrahlungsplanung miteinbezogen wird. Neben Linearbeschleunigern wird auch das sogenannte Gamma-Knife verwendet. Interstitielle strahlentherapeutische Maßnahmen sind auf bestimmte Indikationen beschränkt und deren Wertigkeit steht in der Diskussion, wobei diese im Rezidiv nicht mehr empfohlen werden. Ganzhirnbestrahlungen sind obsolet. (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Kapitel Gliome, 2008).

6. Tyrosinkinase und Signaltransduktion

6.1 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor gehört zur Superfamilie der allosterischen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), von denen bis heute mehr als 30 Subfamilien identifiziert werden konnten (z.B. RTK Klasse 1: EGFR-Familie, RTK Klasse 5: VEGFR-Familie etc..).

Der EGFR als Rezeptortyrosinkinase gehört der sog. ErbB-Familie an und kann sowohl mit sich als auch mit anderen Rezeptoren aus dieser Familie dimerisieren. Synonym wird der EGFR als ErbB1 oder HER 1 bezeichnet, der Ligand EGF wurde 1962 von Stanley Cohen anhand eines Mausmodells erstmalig beschrieben, wofür Cohen 1986 der Nobelpreis in Medizin verliehen wurde (Cohen, 1962). Die ErbB-Familie besteht aus vier unterschiedlichen Mitgliedern: ErbB1 / HER1, ErbB2 / HER2/neu, ErbB3 / HER3 und ErbB4 / HER4. ErbB2 fehlt bisher der entsprechende Ligand, während ErbB3 eine funktionelle Kinasendomäne fehlt. Die ErbB-Rezeptoren induzieren Zellproliferation, Migration, Apoptose, Zelladhäsion und Motilität sowie zelluläre Differenzierung und gehören zu den am besten untersuchten Signalsystemen überhaupt. Die verschiedenen Rezeptoren können untereinander dimerisieren, wobei bestimmte Bindungspartner bevorzugt werden (ErbB2) und manche nur durch Heterodimerisierungen mit anderen ErbB-Rezeptoren aktiviert werden können (z.B. ErbB2 oder ErbB4, etwa in Kombination mit ErbB1 / EGFR).

ErbB1, ErbB2 und ErbB3 sind in einer Vielzahl unterschiedlichster Tumoren amplifiziert, mutiert oder überexprimiert, während Polymorphismen bei ErbB4 mit Schizophrenie in Verbindung stehen. Eine regelmäßige Überexpression des EGFR wurde für Lungen-, Blasen-, Pankreas-, Nieren- und zahlreiche weitere Tumoren nachgewiesen (Fontanini et al., 1998 / Grandis et al., 1996 / Salomon et al., 1995). Für Glioblastome wurde in nahezu 50% aller Fälle eine EGFR-Genamplifikation nachgewiesen (Schlegel et al., 1994 / Libermann et al., 1984).

Eine Überexpression des EGFR wird in primären und sekundären GBM zusammen in 60 bis 70% der Fälle angegeben, wobei die Häufigkeit in primären GBM mit ca. 60% um ein Vielfaches höher liegt (Watanabe et al., 1996). In glialen Neoplasien findet sich oft eine kombinierte Überexpression von Liganden, die an EGFR und andere Rezeptortyrosinkinasen binden können, beispielsweise TGF α (Tissue Growth Factor α), der zusammen mit EGF über eine Feedbackschleife die RT-Kinasen und damit das Tumorwachstum positiv beeinflussen kann (Nicholas et al., 2006). EGFR-Aberrationen sind für hochgradige, astrozytäre Tumoren charakteristischer als für niedriggradigere Tumoren, was in GBM auch mit einer erhöhten Proteinexpression einhergeht (Ohgaki und Kleihues, 2005 / Frederick et al., 2000). Mutationen oder Amplifikationen des EGFR-Gens liegen sehr häufig kombiniert vor und EGFR-Amplifikationen können eine Vielzahl funktionell unterschiedlicher EGF-Rezeptoren hervorrufen (Frederick et al., 2000). Die in malignen Gliomen ebenfalls häufig

anzutreffende Deletion des PTEN-Gens, einhergehend mit einer gestörten PTEN-Funktion, kann die Aktivierung des Proteinkinase B-Signalpfades ungeachtet des EGFR-Status modulieren (Liu et al., 1997).

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen haben zahlreiche zellhomöostatische Funktionen, die der grundlegenden, physiologischen Steuerung gesunder Zellen dienen. Hierzu gehören Proliferation und zelluläres Wachstum, Stoffwechsel und Differenzierung beeinflussende und steuernde sowie interzelluläre Prozesse. Strukturell ähneln sich die jeweiligen Subgruppen und bestehen prinzipiell aus einer extrazellulären Domäne, an die spezifische Liganden binden können, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären, namensgebenden Tyrosinkinase-Domäne, wobei RT-Kinasen als Monomere (z.B. EGFR) oder als Dimere (z.B. Insulin-like Growth Factor) vorliegen können.

Für die Vermittlung eines extrazellulären Signals in den Zellkern zur Steuerung der Genexpression bedarf es mehrerer Schritte. Die extrazelluläre Bindung eines Liganden an den Rezeptor (z.B. EGF, Epidermal Growth Factor) bewirkt über eine Konformationsänderung des Rezeptors und damit möglicher Bindung zu einem benachbarten, ebenfalls konformationell veränderten Rezeptor, eine Rezeptordimerisierung. Anschließend erfolgt über eine hochkonservierte ATP-Bindungsstelle vermittelt eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten, die zur Bindung von Proteinen wie Shc, Grb2 oder Src an die Rezeptoren führt. Diese Proteine enthalten sog. Src homologe 2 oder Phosphotyrosin-Bindedomänen (PTB), die die Rekrutierung weiterer Proteine an die Rezeptoren bedingen, die ihrerseits die gleichen Bindungsdomänen besitzen und so einen Signalkomplex aktivieren. Dieser Aktivierung folgt eine nach zentral gerichtete Kaskade von sich aktivierenden Serin/Threonin-Kinasen, die Transkriptionsfaktoren und damit die Genregulation und Proteinsynthese beeinflussen. Über RT-Kinasen vermittelte, intrazelluläre Signalkaskaden sind beispielsweise der MAP-Kinase- (mitogen activated protein kinase)-, der PI3-Kinase/Akt (Phosphoinositol3-Kinase/Proteinkinase B)- und der JAK/STAT-(janus kinases/signal transducers and activator of transcription) Signalweg.

Bestrahlung führt über Homo- oder Heterodimerisierungen des EGF-Rezeptors zu Phosphorylierungsprozessen, die die ‚downstream‘-orientierte Signaltransduktion

aktivieren (Serin-Threonin-Kinasen, RAS, MAP-Kinase etc.) und letztlich die Transkriptionsfaktorraten und die Genexpression beeinflussen.

Der EGFR spielt eine zentrale Rolle für vielerlei zelluläre Reaktionen, die für Tumoren u.a. relevantesten sind beispielsweise Zellüberleben und Zellproliferation (Baumann und Krause, 2004). Eine Überexpression des EGFR kann zu verstärkter Strahlenresistenz und damit vermindertem Ansprechen auf therapeutisches Bestreben führen.

Die dem EGF-Rezeptor nachgeschalteten Signalwege, insbesondere die über PI3-Kinase/Akt und mTOR, können zu einer verstärkten Invasionsbereitschaft glialer Tumorzellen nach Bestrahlung führen. Hierbei spielt die Hemmung des EGFR eine entscheidende Rolle um diese Invasivität abzuschwächen (Park et al., 2006). Die Hochregulation des Wildtyp-EGFR bzw. die Expression von EGFR-Mutanten wie etwa EGFRvIII, der häufigsten Mutante, die ihrerseits durch Bestrahlung weiter aktiviert werden kann, führen zu einer Signalverstärkung des Akt- und ERK bzw. MAP-Kinase Signaltransduktionsweges. Dies wiederum scheint auf die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden in glialen Tumoren günstige Effekte zu haben (Golding et al., 2009).

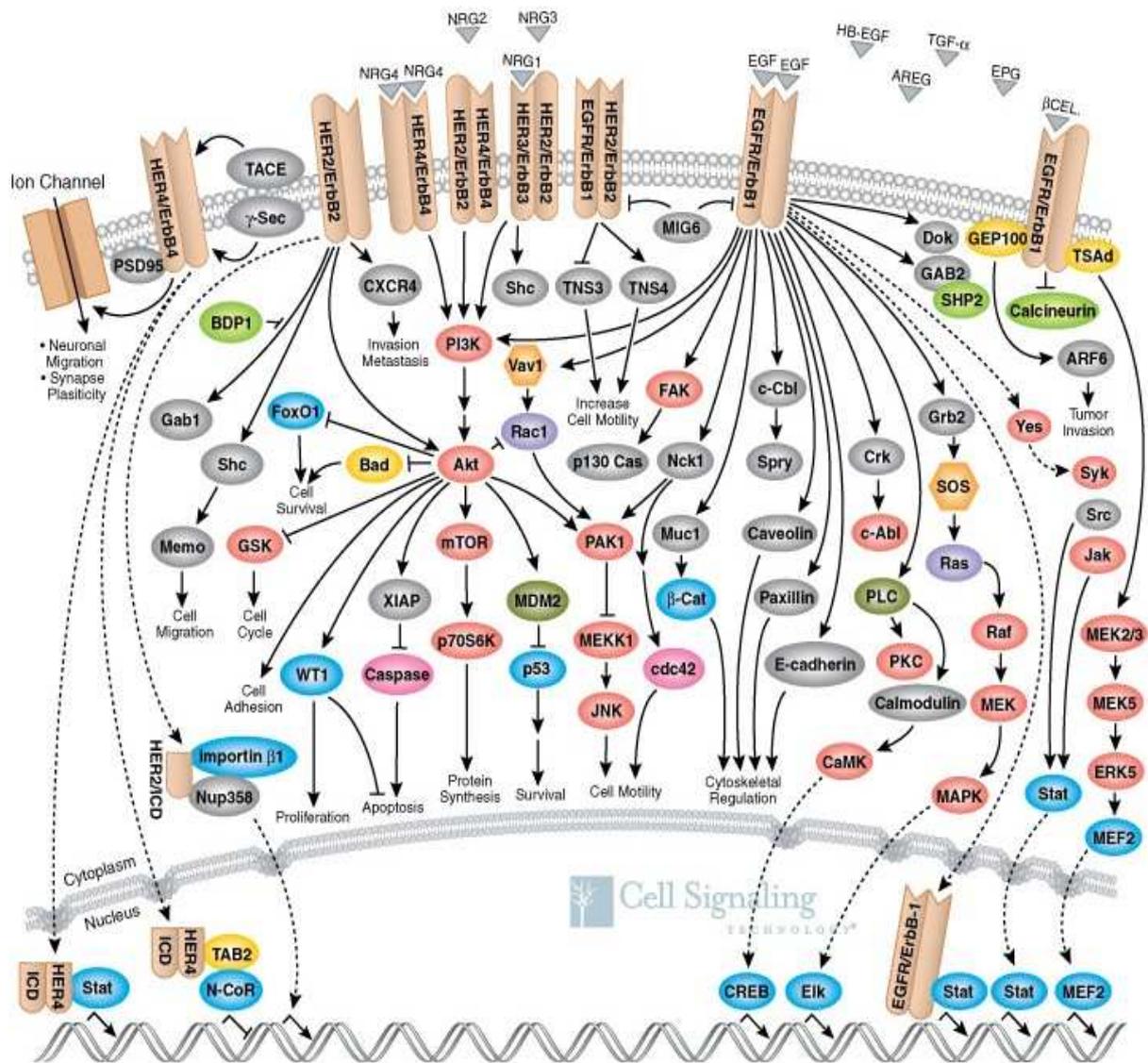


Abb. 1: Die ErbB- / HER-Familie und der EGF-Rezeptor (aus Cell Signaling Technology, <http://www.cellsignal.com/>, 2009)

6.2 Phosphatidylinositol-3-Kinase / Proteinkinase B (PI3K / Akt)

Die 56kDa Serin/Threoninkinase Akt bzw. Proteinkinase B (genauer: Akt 1/PKB) zählt zu den bis heute bestuntersuchten intrazellulären Proteinen menschlicher Zellen und Tumorzellen. Zelluläre Prozesse, die über Akt direkt oder indirekt vermittelt werden, sind u. a. Apoptose, Differenzierungen und Proliferation. Es sind gegenwärtig drei Isoformen bekannt, Akt 1/PKB α , Akt 2/PKB β 1 und Akt 3/PKB β 2, wobei von Akt 3 zwei unterschiedliche Splicing-Varianten vorkommen. Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, z.B. EGF, an den EGFR kommt es durch die

Aktivierung der PI3-Kinase zur Phosphorylierung von PIP2 (Phosphatidyl-Inositid-4,5-Diphosphat) zu PIP3 (Phosphatidyl-Inositid-3,4,5-Triphosphat) (Newton, 2004).

Hierdurch wird Akt aktiviert, das über weitere Phosphorylierungsschritte zur Aktivierung für das zelluläre Überleben relevanter Zielmoleküle führt. Hierzu gehört beispielsweise MDM2, ein Regulator von p53, dessen Inhibierung durch MDM2 von Akt verstärkt wird. Ein Gegenmechanismus über stress-induzierte Aktivierung von p53 führt zur Inhibierung dieser Akt-vermittelten Hemmung, da p53 die Spaltung und Herabsetzung von Akt über Caspasen-Prozesse verstärkt und über eine erhöhte Expression der Lipid- und Proteinphosphatase PTEN einen Gegenspieler der Umwandlung von PIP2 zu PIP3 induzieren kann (Haupt et al., 2003). PTEN ist ein funktioneller Antagonist zur PI3-Kinase durch die Dephosphorylierung von PIP3 (Hopkin, 1998).

Die Phosphorylierung von Akt kann z.B. auch durch PDK 1 (phosphoinositide-dependent-kinase 1), durch Akt selbst oder auch durch Kinasen wie DNA-abhängige Proteinkinase, Integrin-linked-kinase (ILK) oder mTOR Complex 2 erfolgen (Feng et al., 2004 / Hill et al., 2002 / Toker und Newton, 2000 / Lynch et al., 1999). Caspasen (Cysteinproteasen) werden von Akt direkt beeinflusst, in dem Akt deren Aktivität reguliert und somit apoptotische Mechanismen beeinflusst (Cross et al., 2000). BAD (bcl-2 antagonist of cell-death / bcl-xl associated death promoter) kann als pro-apoptotisches Molekül von Akt an Ser136 phosphoryliert werden und ist wiederum Zielpunkt von mindestens zwei weiteren anti-apoptotischen Proteinkinasen, ERK (extracellular-signal-regulated kinase) und PKA (Proteinkinsae A). Durch die Phosphorylierung wird BAD in seiner pro-apoptotischen Form blockiert. Dies entspricht einem der wichtigsten, Akt-abhängigen Schritte des zellulären Überlebens. Eine Blockade des über PI3-Kinase/Akt und nachfolgend p70S6-Kinase vermittelten Signalflusses ist beispielsweise durch Blockade der PI3-Kinase mit dem experimentellen Inhibitor LY294002 möglich. Dieser Inhibitor führte im Tiermodell zu Reduktionen sowohl des Tumolvolumens als auch des Tumorwachstums (Semba et al., 2002 / Hu et al., 2000). Eine Blockade der PI3-Kinase mit LY294002 kann den Zellzyklus in der G1-Phase arretieren und steht damit Proliferationsprozessen entgegen. Die über Akt vermittelten Zellsignale scheinen auch in Hinblick auf strahleninduzierte Zellschädigungen eine Rolle zu spielen. Golding et al. konnten 2009 zeigen, dass eine Blockade des Akt bzw. ERK-Signalpfades zu einer Hemmung

der NHEJ (non-homologous end-joining) führt, die für strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche einen wesentlichen Reperaturmechanismus darstellt.

In vielen Tumoren konnte eine Überaktivität der PI3-Kinase und von Akt ermittelt werden. Dies gilt besonders für maligne Gliome, in denen oft gleichzeitig eine Mutation des PTEN-Gens gefunden werden kann (Newton, 2004).

Ein Verlust der PTEN-Funktion führt in malignen, glialen Zellen zu einer konstitutiven Aktivierung von Akt, wohingegen gliale Tumorzellen, die diese Aktivierung nicht besitzen, eher erhöhte Expressionen der MAP-Kinase zeigen (Schlegel et al., 2000 / Cantley et al., 1999). Furnari et al. demonstrierten in 1997, dass eine Restauration einer defekten PTEN-Funktion das zelluläre Wachstum in GBM unterdrücken kann. Ferner kann, wie 2002 von Mayo et al. beschrieben, der p53-abhängige Eintritt in die Apoptose in Zelllinien von Akt bzw. PI3-Kinase verlängert werden.

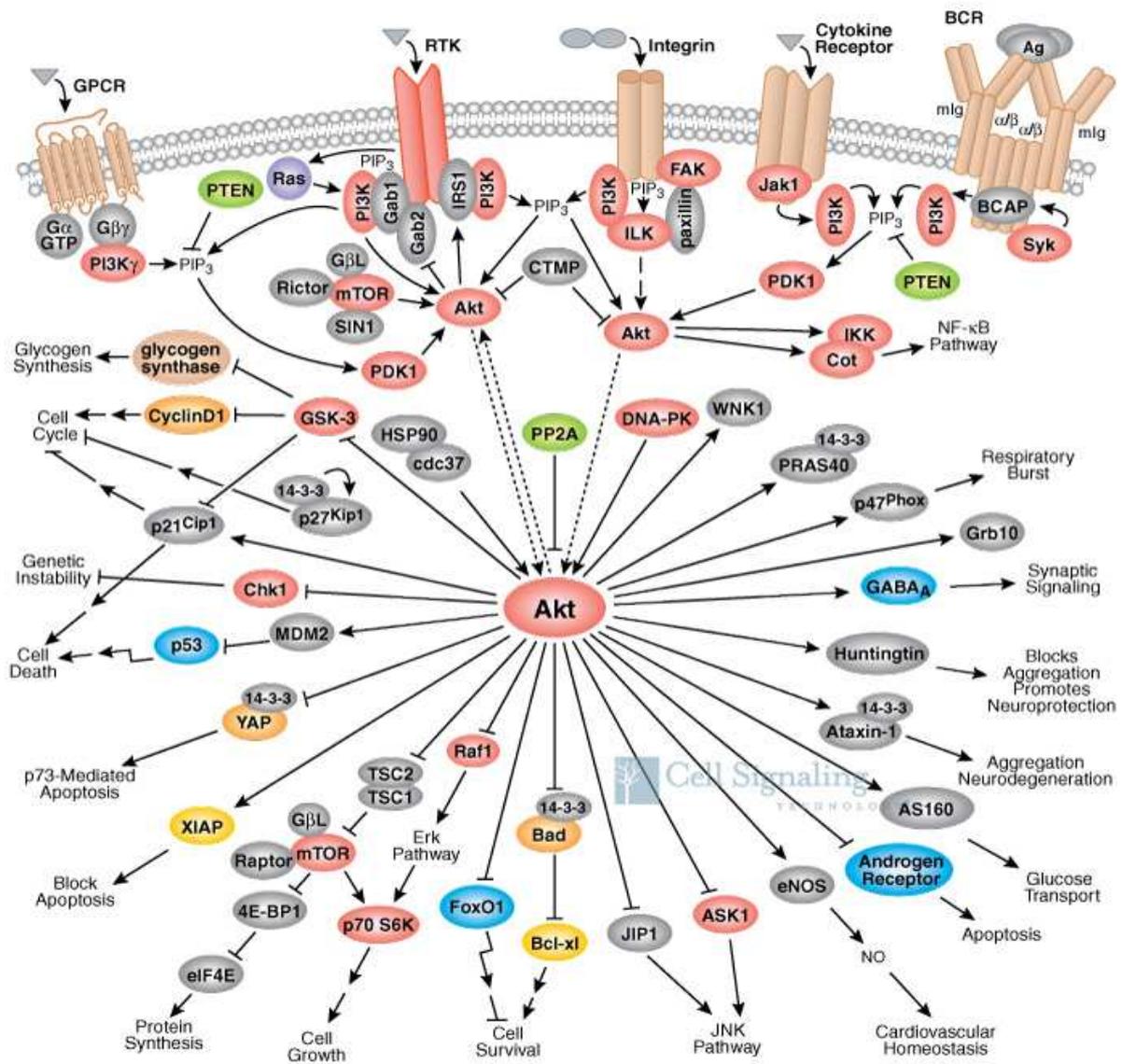


Abb. 2: Der PI3-Kinase / Akt-Signalweg (aus Cell Signaling, <http://www.cellsignal.com/>, 2009)

6.3 Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAP-Kinase / MAPK)

Ebenso wie Akt sind die Mitglieder der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen Serin/Threoninkinasen. Ihre zelluläre Bedeutung liegt in der Beeinflussung von Differenzierungen und der Embryogenese, der Zellproliferation, der Migration und des Zellüberlebens. Unterschieden werden drei bzw. vier zentrale Signaltransduktionspfade.

Die wesentlichen sind zum einen der über Mitogene und Wachstumsfaktoren aktivierte Raf, MEK 1/2 und ERK 1/2 / MAPK-Weg, der überwiegend bedeutend ist für Differenzierung, Proliferation und Zellwachstum.

Ein über zellulären Stress, inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren induzierter, p38/MAPK / MX1-Signalweg initiiert vorwiegend Wachstums-, Inflammations-, Differenzierungs- und Apoptoseprozesse.

Der dritte Signalweg ist ein dem zweiten Signalweg analog vermittelter über SAPK/JNK 1/2/3 (stress activated protein-kinase / c-Jun N-terminal kinase 1/2/3) und induziert im Wesentlichen die gleichen Effekte. Ein vierter Signalpfad läuft über die Initiierung durch zellulären Stress, Wachstumsfaktoren, Mitogene und G-protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), wobei es hier zu einer Aktivierung von ERK 5/ MAPK 7 kommt. Dies wiederum führt zu Wachstums- und Differenzierungsprozessen.

Je Signalweg werden mindestens drei hintereinandergeschaltete Kinasen, beginnend bei einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP-KKK) über eine MAP-Kinase-Kinase (MAP-KK) bis zur MAP-Kinase (MAP-K), in absteigender Reihenfolge phosphoryliert und dadurch aktiviert. In der hier vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung der p44/42-MAPK bzw. deren phosphorylierter Form p-p44/42-MAPK. Die Wechselbeziehung der unterschiedlichen MAP-Kinase-Kaskaden ist Gegenstand aktueller Forschung. So scheint der p38/NK-assoziierte Signalweg malignen Transformationen eher entgegenzuwirken, während der über ERK vermittelte Weg häufiger mit Malignomen vergesellschaftet ist (Junttila et al., 2008 / Raman et al., 2007).

Eine Aktivierung der p44/42 MAPK steht in Zusammenhang mit einer Inhibierung der Apoptose und kann durch einige Wachstumsfaktoren stimuliert werden (Cross et al., 2000). Die Aktivierung von Ras dient als erster Schritt für die weitere Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade. Ras-Mutationen finden sich in nahezu 30% aller Tumoren und sind besonders häufig in Pankreas- und Dickdarntumoren (90 bzw. 50%) (Bos et al., 1987), eine Ras-Aktivierung (Rat sarcoma) ist auch für das proliferative Verhalten maligner, astrozytärer Tumoren verantwortlich (Guha et al., 1997) und die kleinmolekulare Blockade von Raf inhibiert das Zellwachstum glialer Tumorzellen (Sathornsumetee et al., 2006). Der Ras-Aktivierung folgt die Rekrutierung von Raf (auch A-Raf, B-Raf bzw. Raf-1) an die Zellmembran, wo es Ras unter dem Einfluss

mehrerer Kofaktoren auf komplexe und nicht vollständig geklärte Weise bindet. Im Folgenden werden die Tyrosin- bzw. Serin/Threoninkinasen MEK 1/2 über direkte Raf-Phosphorylierungen aktiviert, die dann ihrerseits über Phosphorylierungen ERK 1/2 aktivieren. ERK 1/2 hat vielfältige Zielmoleküle, beispielsweise Elk-1, c-Ets1, c-Ets2, p90RSK1, MNK1, MNK2, und TOB.

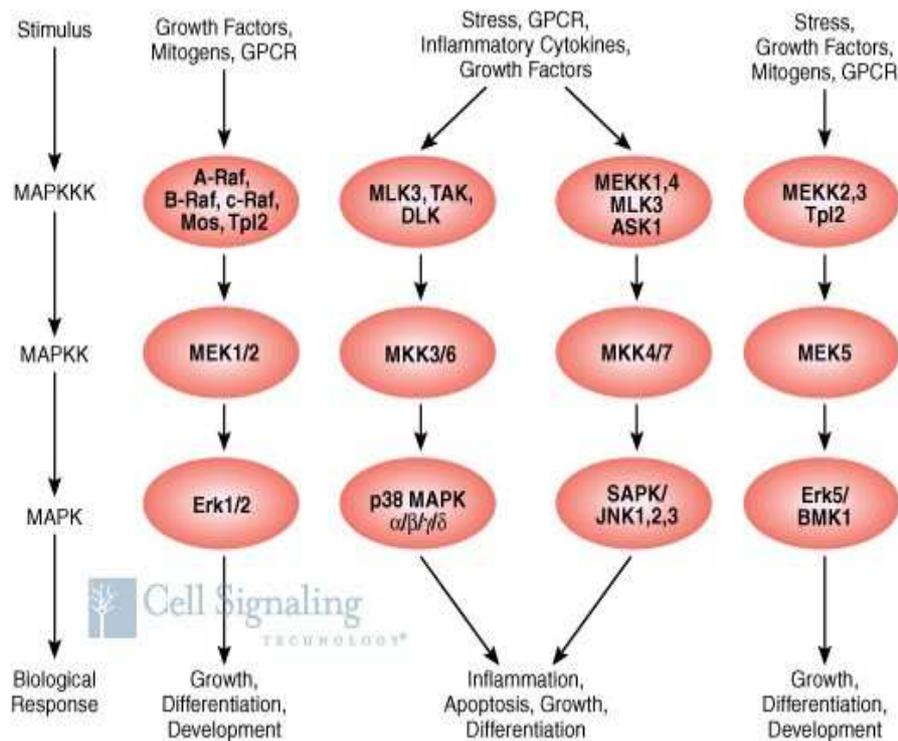


Abb. 3: Der MAP-Kinase-Signalweg (aus Cell Signaling, <http://www.cellsignal.com/> 2009)

6.4 Mammalian Target-of-Rapamycin (mTOR)

Mammalian Target-of-Rapamycin (mTOR) ist eine Serin/Threonin-Kinase mit 290kDa Molekülmasse. Synonyme sind RAFT 1 (Rapamycin and FK506-binding protein (FKBP)-target 1/FRAP) oder auch SEP (sirolimus effector protein). Die Kinase hat ihren Platz im PI3-Kinasen / PDK1 / Akt (Proteinkinase B) Signaltransduktionsstrom distal des TSC (Tuberous Sclerosis Complex, bestehend aus TSC1/Hamartin und TSC 2/Tuberin), durch den es gehemmt wird. Eine Aktivierung erfolgt durch Akt indirekt über den TSC, da Akt den TSC hemmt und dadurch mTOR aktiviert. Über

Phosphorylierung der p70S6-Kinase (p70S6K) und dadurch eingeleitete mRNA-Translationsprozesse führt mTOR seinerseits zu einer Zellwachstuminduktion (Dancey et al., 2006). Eine vielfältige Beteiligung kommt mTOR bei zellbiologischen Reaktionen zu. Dies im Besonderen bei Malignomen. So ist mTOR neben der Steuerung von Zellwachstum (über p70S6-Kinase/4EBP1 und eIF-4E), Autophagie (über p70S6kinase / ATG1) und ribosomaler Biogenese für Transkriptionsprozesse in der Angiogenese (über HIF-1), dem mitochondrialen Metabolismus (über PGC-1 α) und der Adipogenese (PPAR γ) zuständig sowie bei der cytoskelettalen Organisation (über Rho und PKC α), und dem Zellüberleben (über Akt).

In Glioblastomen sind Gene, die den PI3-Kinase-Signalweg beeinflussen, aktiviert (Knobbe et al., 2003) und führen dadurch wiederum zu Verstärkung des p70SK6-Kinase-Signalfusses. Beeinflusst wird dadurch die Proliferationsstärke sowie das Zellüberleben u.a. über die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 und folglich hochregulierter Translation von sog. 5' TOP-(terminal oligopolypyrimidine) mRNAs (Riemenschneider et al., 2006). Podsypanina et al. konnten 2001 in PTEN heterozygoten Mäusen Neoplasien induzieren, bei denen die Behandlung mit einem Rapamycin-Ester den Aktivierungsgrad der p70S6-Kinase und die Bildung von weiteren Neoplasien reduzierte.

Die p70S6-Kinase (p70S6K) ist eine Serin/Threonin Kinase und im Signalpfad unterhalb von Akt bzw. mTOR gelegen. Hauptsubstrat ist das S6-Protein der 40S-ribosomalen Untereinheit (S6K1/2), das wiederum für die Proteinbiosynthese von Relevanz ist. Aktivierung der p70S6K erfolgt über verschiedene Phosphorylierungsstellen. Die Rapamycin-sensitiven Domänen Threonin 229, über PDK1, und Threonin 389, via Akt und über FRAP/mTOR, sind für die Initiierung der Kinase mit am bedeutsamsten (Pullen et al., 1998 / Moser et al., 1997). Wachstumsfaktoren wie Insulin oder EGF sowie G-Protein gekoppelte Rezeptorliganden können die Phosphorylierung an Threonin 229 stimulieren, wohingegen eine Blockade an dieser Stelle über LY294002 bzw. Wortmannin (PI3K-Blockade) oder Rapamycin (FRAP/mTOR-Blockade) erreicht werden kann (Polakiewicz et al., 1998). Zellzyklusprogression und Zellgröße werden maßgeblich von mTOR und der weiteren Kaskade über p70S6K bzw. 4EBP1 beeinflusst (Fingar et al., 2002). Die pro-apoptotische Wirkung von BAD kann via p70S6-Kinase über eine Phosphorylierung gehemmt werden, die in Folge BAD nicht an die Inhibitoren

des mitochondrialen Zelltodes, Bcl-XL und Bcl-2, binden und diese blockieren lässt (Asnaghi et al., 2004).

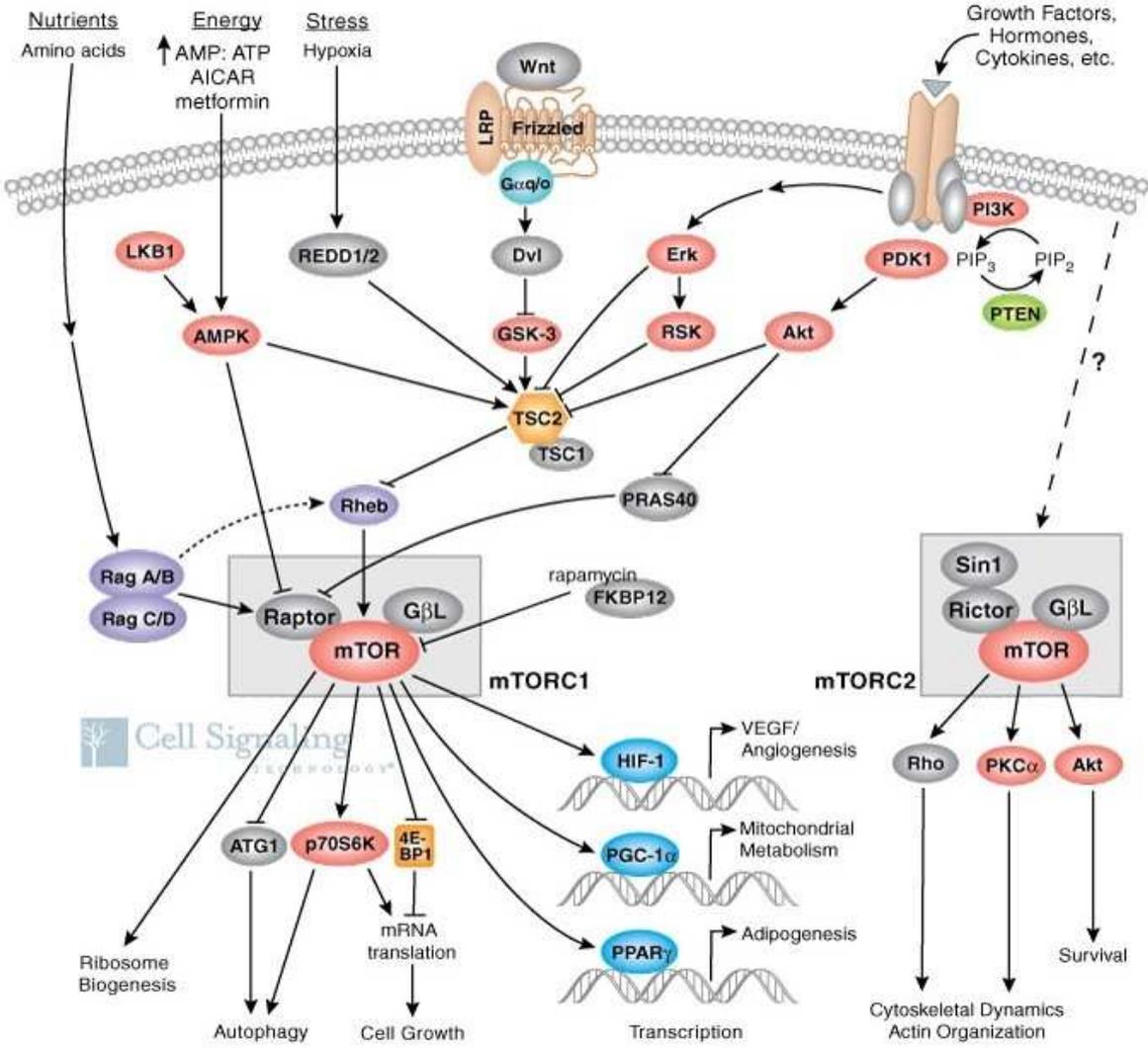


Abb. 4: Der mammalian Target-of-Rapamycin-Signalweg (aus Cell Signaling Technology, <http://www.cellsignal.com/>, 2009)

7. Tumorstammzellen

7.1 Einleitung

Im Folgenden wird ungeachtet dessen, dass die Tumorstammzellhypothese kontrovers diskutiert wird, der Einfachheit halber der Begriff ‚Tumorstammzellen‘ verwendet.

Vermutungen über die Existenz von Tumorzellen mit stammzellartigen Eigenschaften existieren bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts und stammen u.a. vom deutschen Pathologen Julius Friedrich Cohnheim (Grundmann, 1985 / Cohnheim, 1867). Erste Nachweise aus der neueren Zeit gelangen vor ca. 12 Jahren am Krankheitsbild der Akuten Myeloischen Leukämie (Bonnet und Dick, 1997), wobei hier Tumorzellen mit stammzellartigen Eigenschaften nach Implantation in Mäuse befähigt waren, in den Tieren eine Akute Myeloische Leukämie zu induzieren. In den Jahren darauf folgten in kurzen zeitlichen Abständen zahlreiche Arbeiten, die dergleichen für viele andere Tumorarten wie etwa Lungentumoren und letztlich auch für Hirntumoren zeigten (Tirino et al., 2009 / Perez Castillo et al, 2008 / Singh et al, 2003).

Dabei ist die grundlegende Hypothese derart, dass für die Tumorgenese neben molekulargenetischen, inflammatorischen und immunologischen Ursachen eine in der zahlenmässigen Verhältnissmäßigkeit zum Gros des Tumorgewebes sehr geringe Anzahl an Tumorzellen verantwortlich ist. Diese besitzen Eigenschaften, die sie auf eine Stufe mit Stammzellen setzen bzw. entarteten Stammzellen entsprechen. Ging man vor einigen Jahren noch von einer Zellheterogenität des Tumors aus, in der durch zufällige Mutationen Klone mit Stammzelleigenschaften entstanden, so wird gegenwärtig von einer nicht-zufälligen, definierten Subpopulation der Tumorstammzellen ausgegangen. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Tumorstammzellen, für die im neuroonkologischen Sinne u.a. Synonyme verwendet werden wie TSZ (Tumor-Stammzellen), TIC (Tumor Initiating Cells), CSC (Cancer Stem Cells), CSIC (Cancer Stem like Cells), TSC (Tumor Stem Cells), BTSC (Brain Tumor Stem Cells) oder auch GSC (Glioma Stem Cells), über

eine ausgeprägte Behandlungsresistenz verfügen (Shervington et al., 2008 / Bao et al., 2006).

Die ursächlichen Resistenzmechanismen zeichnen auch für die Rezidivfreudigkeit maligner Gliome und die Unterhaltung des Tumors, insbesondere des GBM, verantwortlich (Qiang et al., 2009). Dies wiederum ist für das klinische Verhalten entscheidend.

Für neurale Stammzellen und aus malignen Gliomen isolierte TSZ konnten viele charakteristische Gemeinsamkeiten gezeigt werden (Crowe et al., 2004). Eine gezielte Einschleusung von für Proteinkinase B und Ras codierenden Genen in neuronale Vorläuferzellen von Mäusen führte durch kombinierte Aktivierung der entsprechenden Signalwege zu histopathologischen Glioblastomen. Diese Tumorinitiierung war bei Einschleusung in differenzierte Astrozyten nicht zu erreichen (Holland et al., 2000).

Ausgehend von der Annahme eines hierarchisch organisierten Zellkompartiments eines bösartigen Tumors bilden tumoröse Stammzellen gewissermaßen die Spitze dieser Organisationsstruktur. In Analogie zu nicht-malignen Stammzellen sind sie befähigt zu unlimitierter Selbsterneuerung und zur Bildung von Vorläuferzellen anderer Differenzierung, darüber hinaus zur Masseerhaltung und zu besagter Rezidivinitiation.

Eigenschaft / Fähigkeit	Tumorstammzelle	Adulte, neurale Stammzelle
Differenzierung	+	+
Selbsterneuerung	+	+
Ausschleusung von Toxinen	+	+
Teilungsrage verlangsamt	+	+
CD 133 Expression	+	+
Tumorinitiation	+	--

Tab. 1: Vergleichende Übersicht: Eigenschaften adulter, neuraler Stammzellen und Tumorstammzellen.

7.2 Identifikationstechniken

Die Integration der bereits an anderen Tumoren untersuchten Tumorstammzellhypothese in die Pathogenese des Glioblastoms veranlasste dazu, die gesuchten Zellen über spezifische Charakteristika zu identifizieren. Allerdings stellen diese Identifikationstechniken lediglich Surrogatmarker dar.

7.2.1 Neurosphärenkultur

Die Fähigkeit von hirneigenen Stammzellen, sich unter Kulturbedingungen in Neurobasalmedium zu dreidimensionalen Konglomeraten zu aggregieren, den sog. Neurosphären, gilt als Charakteristikum dieser Stammzellen und dient folglich als ein anerkanntes Identifikationsmerkmal. Aus GBM isolierte Zellen sowie etablierte Glioblastomzelllinien bilden unter kulturellen Bedingungen ebenso Neurosphären, was den Nachweis von Tumorzellen stammzellartiger Charakteristik bzw. von Tumorstammzellen ermöglicht (Yang et al., 2006 / Yuan et al., 2004).

7.2.2 Neuronale Differenzierung

Die astrogliale Differenzierung wurde lange Zeit als ein Prozess angesehen, der in seiner Richtung nicht umkehrbar erschien. Wie sich zeigte, konnten jedoch ausdifferenzierte Oligodendrozyten unter dem Einfluss von bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) wieder dedifferenzieren und proliferierten (Grinspan et al., 1996 und 1993). Der Einfluss von Proteinkinase C ließ Oligodendrozyten proliferieren, sich dedifferenzieren und Eigenschaften der Remyelinisierung zeigen (Pouly et al., 1994). Unter dem Gesichtspunkt der Tumorstammzellhypothese gilt es, Identifizierungsmerkmale zu verwenden, die sowohl neuronale Stamm- und Vorläuferzellen und deren differenzierende Entwicklung nachzeichnen, als auch Tumorstammzellen erkenn- und zuordenbar machen.

Nestin wurde ursprünglich als Epitop für den monoklonalen Antikörper RAT401 gegen embryonales Rückenmarksgewebe in Ratten beschrieben (Hockfield und McKay, 1985) und als Intermediärfilament Typ VI mit Verbindung zu den Neurofilamenten klassifiziert (Dahlstrand et al., 1992). In der embryonalen

Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) von Säugern spielt Nestin eine Rolle in proliferierenden Neuroepithelien (Dahlstrand et al., 1992) und kommt im erwachsenen Gehirn des Menschen in Stammzellen der subventrikulären Zone sowie im Plexus Choroideus vor (Morshead et al., 1994). Unabhängig davon konnte eine Nestinexpression im entwickelten Gehirn aber auch im Rahmen von Entzündungen und Abszessbildungen und bei diversen malignen Prozessen des ZNS gesehen werden, so auch beim Glioblastom (Asklund et al., 2003).

Die GTP (Guanosintriphosphat)-bindenden Tubuline der Gruppen α und β sind die Hauptbestandteile der Mikrotubuli, die wiederum als Proteinfilamente wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts von Zellen sind. Die Tubuline werden von einer Multigen-Familie codiert, wobei sechs Gene für beide Tubulinarten codieren und ca. 20 Isoformen des Tubulins im menschlichen Gehirn vorkommen (Nogales et al., 2006). Die Expression von β III-Tubulin wird herangezogen, um neuronale Zellen gegen hirneigene Zellen anderer Spezifikation abzugrenzen, z.B. gegen gliale Zellen, und ist der Expression von Nestin als Marker einer differenzierten Entwicklung aus neuronalen Vorläuferzellen gewissermaßen ‚nachgeschaltet‘. Dieser Umstand kann auch in Zellen aus Glioblastomen bzw. malignen Tumoren des ZNS zur Identifizierung genutzt werden (Katsetos et al., 2007 / Yang et al., 2006). Eine Überexpression von β III-Tubulin wird aufgrund mikrotubulärer Störungen mit einer Tumorprogression und malignen Transformation bei GBM sowie mit einer glialen Tumorgenese selbst in Verbindung gebracht (Katsetos et al., 2009, 2007 und 2003).

7.2.3 Prominin 1/CD133 Proteinexpression

Singh et al zeigten im Jahr 2003, dass über den Oberflächenmarker CD133 (cluster of differentiation 133, auch Prominin 1 bzw. AC133) markierte und separierte Tumorzellen aus humanen Medulloblastomen sowie anderen malignen Hirntumoren genetische und phänotypische Charakteristika von Stammzellen aufwiesen. Tumorzellen, die den neuronalen Stammzellmarker CD133 exprimierten, konnten anhand ihrer Eigenschaften bezüglich Selbsterneuerung, Proliferationskapazität und Differenzierungsfähigkeit betrachtet werden. Die höchste Selbsterneuerungsrate wiesen diejenigen Zellen auf, die aus dem malignesten Tumor (Medulloblastom)

stammten. Ferner differenzierten die CD133 positiven Zellen zu phänotypischer Ähnlichkeit mit dem Primärtumor.

CD133/AC133/Prominin 1 wurde initial an Mauszellen detektiert und ist ein aus 5 transmembranären Einheiten bestehendes, 115 kDa schweres Glykoprotein (Weigmann et al., 1997), das im selben Jahr auch auf hämatopoetischen Stammzellen als Antigen des monoklonalen AC133-Antikörpers gefunden und gensequenziert wurde (Miraglia et al., 1997) und seitdem Identifizierungsmerkmal für Stammzellen herangezogen wird (Uchida et al., 2000). Unterschieden werden die orthologen Gruppen Prominin 1 und 2, die ihrerseits in Menschen, Mäusen und Ratten zu finden sind. Prominin1 s1 (CD133 s1 respektive AC133-2) und Prominin 1 s2 (CD133 s2 respektive AC133) entsprechen den beim Menschen relevanten Splicingvarianten des Prominin 1 (Fargeas et al., 2003).

Weitere Arbeitsgruppen konnten, teils über flusszytometrische Analyse und fluoreszenz- bzw. antikörpergestützte Markierung, eine Fraktion von Tumorzellen sekretieren, die fortan unter dem Begriff Side Population (SP) bzw. CD133 positive Zellen subsummiert wurden und die als Fraktion von Tumorstammzellen innerhalb der Tumormasse sie umgebender, nicht-stammzellartiger Tumorzellen existieren (gewissermaßen als Subfraktion oder Subpopulation innerhalb der ‚normalen‘ Tumorzellen). Die Zellen, die nicht zur Side Population klassifiziert werden, tragen meist den Namen Non-Side Population (Non-SP) bzw. CD133 negative Zellen (Qiang et al., 2009 / Galli et al., 2004). In einem Gliommodell an transgenen, S100 β -verbB/Trp53-Mäusen konnten Harris et al. 2008 eine erhöhte Rate an TSZ innerhalb der Side Population identifizieren, deren Eigenschaften sich durch erhöhte Tumorinitiation sowie verstärkter Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multipotenz im Verhältnis zur sog. Non-Side Population zeigte.

Durchflusszytometrische Genexpressionsanalysen erbrachten im Vergleich zur Non-SP und zu gesunden neuronalen Stammzellen mehrere Gene, die speziell in glialen TSZ hervorgebracht werden und deren teilweises Vorkommen mit dem Tumorgrad positiv korrelierte (Harris et al., 2008). Wie oben beschrieben, wurde den Tumorstammzellen und damit der SP eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber zytotoxischer Behandlung zugewiesen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Subpopulation die Fähigkeit zu neuronaler als auch glialer Differenzierung

aufweist (Taga, 2006) sowie weitere Eigenschaften besitzt, die sie als stammzellartig- oder ähnlich charakterisiert (Günther et al., 2008).

7.2.4 Nachweis einer Side Population mittels FACS-Analyse

Bei der Identifikation und Isolierung einer Side Population kommen neben antikörpergestützten Methoden (Prominin 1/CD133) auch solche zur Anwendung, die biologische Verhaltensweisen dieser Zellen einbeziehen.

In zahlreichen Tumoren, so auch in Glioblastomen, konnten Membranproteine identifiziert werden, die Substanzen über spezifischen aktiven Transport von intra- nach extrazellulär zu befördern vermögen. Diese als ABC-Transporter bezeichnete Protein-Superfamilie wird über Spezies hinweg exprimiert und ist substrat- sowie multispezifisch für unterschiedlichste, physiologisch wichtige Stoffe. Gemeinsames Strukturelement dieser sogenannten ABC-Transporterproteine sind ATP-bindende Kassetten (ATP-binding cassette, ABC), die als funktionelle Domänen für den Transport dieser Stoffe verantwortlich sind.

Es bestehen aber auch Transportsysteme, die nicht nur für Aminosäuren, Peptide oder Fette zuständig sind, sondern auch für die transmembranäre Beförderung von zellschädigenden Substanzen wie etwa Chemotherapeutika. Beim Menschen wurde der MDR1-Transporter (Multi Drug Resistance 1, auch P-Glykoprotein als Genprodukt des MDR-Gens) als erster ABC-Transporter in Zusammenhang mit Resistenzmerkmalen gegenüber Chemotherapeutika charakterisiert.

Bisher konnten für viele in der Chemotherapie eingesetzte Substanzen unterschiedliche Subtypen der ABC-Transporter klassifiziert werden (z.B. ABCG2), wobei einige betroffene Therapeutika in der Gliomtherapie zur Anwendung kamen bzw. kommen (Dean et al., 2002). Charakteristischerweise konnte für viele Malignome gezeigt werden, dass die verstärkte Effluxkapazität für zellschädigende Noxen ein Merkmal stammzellartiger Tumorzellen darstellt und diese sich über solch spezifische Eigenschaften identifizieren lassen. Dies gilt auch für das Glioblastom (Hirschmann-Jax et al., 2004 / Kolchinsky et al., 1997).

Häufig verwendet wird hierzu Hoechst 33342 bzw. 2,5'-Bi-1H-Benzimidazol, ein in die DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der von ABC-Transportern aktiv aus Zellen befördert werden kann. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wird Hoechst 33342 von Licht im ultravioletten Spektralbereich bei einer spezifischen

Wellenlänge um 350nm angeregt, woraufhin es in den Bereichen um 450nm und 670nm Licht emittiert. Dies wird zur Detektion von Zellen genutzt, die per Kernfärbung markiert wurden und die als Non-Side Population bezeichnet werden. Die nicht-markierte Fraktion kann somit als Tumorstammzellpopulation bzw. Side Population identifiziert werden (Wang et al., 2007 / Kondo et al., 2004).

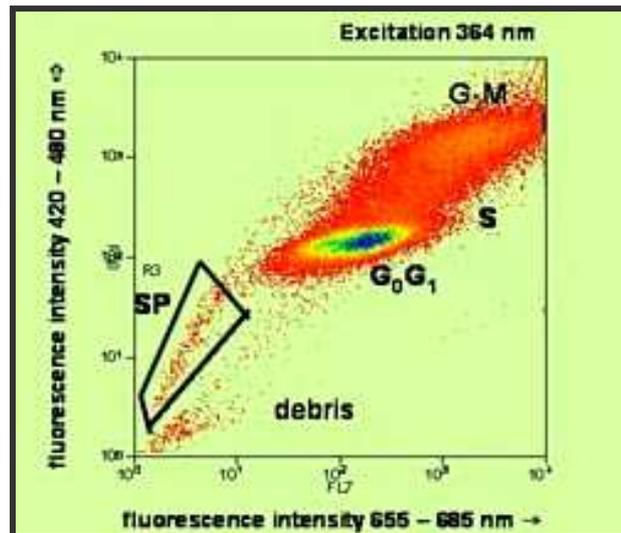


Abb. 5: FACS-Analyse Side Population (aus Zellsortierservice, HelmholtzZentrum München, Institut für Molekulare Immunologie, Serviceabteilung Monoklonale Antikörper, <http://www.helmholtz-muenchen.de/imi/zs/index.html>, 2007).

8. Zielsetzung der Arbeit

Glioblastome haben ungeachtet aller bisherigen Therapiemöglichkeiten eine infauste Prognose. Die 2-Jahres-Überlebensrate variiert unter Ausschöpfung gängiger Strategien um 25% (Stupp et al., 2009), die Therapiemöglichkeiten sind aufgrund des infiltrativen Wachstums und der Behandlungsresistenzen nach wie vor limitiert.

Als ursächlich für Resistenzmechanismen und Rezidiventwicklung gelten eine veränderte, intrazelluläre Signaltransduktion sowie die Existenz einer durch die herkömmliche Therapie nicht zugänglichen Tumorstammzellpopulation.

Für die Entwicklung neuer Therapiestrategien wäre es wichtig, die Beteiligung veränderter, intrazellulärer Signalwege sowie den Einfluss von Tumorstammzellen an der Resistenzbildung besser zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Zusammenhang der Signaltransduktion glialer Tumoren mit einer Strahlenresistenz einerseits und andererseits unter diesem Gesichtspunkt die Rolle von Tumorstammzellen untersucht werden.

- Dazu sollten vier verschiedene Tumorzelllinien experimenteller Bestrahlung ausgesetzt, proteinbiochemisch charakterisiert und deren Klonogenität sowie Zellvitalität analysiert werden.
- Funktionelle Veränderungen der intrazellulären, EGF-Rezeptor vermittelten Signaltransduktion über Proteinkinase B/Akt und MAP-Kinase sollten durch chemische Inhibition mit Tyrphostin AG1478 (EGFR), LY294002 (PI3K) und Rapamycin (mTOR) untersucht werden, um geeignete Angriffspunkte für eine Radiotherapie zu identifizieren. Im Speziellen unter Berücksichtigung des Status des EGF-Rezeptors, des PTEN- und p53-Proteins und einer konstitutiven Akt-Aktivierung.
- Schließlich sollte mittels FACS-Analyse eine Tumorstammzellpopulation identifiziert und analog den etablierten Gliomzelllinien untersucht werden.

9. Material und Methoden

9.1 Material

9.1.1 Geräte

Gerät	Quelle
Brutschrank	Memmert, Schwabach
CO ₂ - Inkubator	Heraeus, München
Durchflusszytometer MoFlo mit Software Summit 4.1	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA- Reader	Biorad, München
Gelkammern, horizontal	Biorad, München
Gelkammern, vertikal	Biorad, München
Magnetrührer/Heizplatte	IKA-Labortechnik, Staufen
Mikroskop Apotom Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Minishaker MS1	IKA-Labortechnik, Staufen
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Kamera AxioCam HRm	Carl Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge 5471R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma, Deisenhofen
Orbital Shaker IKA-VIBRAX-VXR	IKA Labortechnik Staufen
Pipetus akku	Hirschmann, Eberstadt
Prestained Protein Ladder (Page Ruler)	Fermentas, St.Leon-Rot
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	Konica Minolta, Unterföhring
Röntgentherapiegerät RT100	Philipps Healthcare, Hamburg
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Kelheim
Semidry Blotapparatur	Biorad, München
Software AxioVision LE Rel. 4.5	Carl Zeiss, Jena
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	Gesellsch. 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	Schäfer System, Reutlingen

9.1.2 Zellkultur: Zelllinien, Kultivierungs- und Arbeitsmaterialien

Material	Quelle
Glioblastomzelllinien	
LN 18, LN 229	Dr. E. Van Meir, Lausanne, Schweiz
LNZ 308	Dr. E. Van Meir, Lausanne, Schweiz
G 139	Neurochirurgie, Universität Heidelberg
Accutase	PAA Pasching, Österreich
Dulbecco´s Modified Eagle Medium mit Glutamax, 4500 mg/l	Invitrogen, Karlsruhe PAA, Pasching (Österreich)
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 1x	
Epidermal Growth Factor; human, rekombinant)	Millipore, Schwalbach
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Hank`s balanced salt solution	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
LY294002	Cell Signaling Technology, MA, USA
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Rapamycin	Merck Biosciences, Darmstadt
RPMI Glutamax-I mit 1,25 mM HEPES	Invitrogen, Karlsruhe

Tyrphostin AG1478	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypsin/EDTA 0,5 %	Invitrogen, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, CA, USA
Zell-Lysepuffer 10fach	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
Ziegenserum	Dako Inc.
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (buffering agent)	Invitrogen, Karlsruhe

9.1.3 Lösungen, Puffer und Reagenzien

Material	Quelle
Aceton p.a.	Roth, Karlsruhe
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Amino-n-caprioic-acid	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Basic Fibroblast Growth Factor	Invitrogen, Karlsruhe
Biorad Protein Assay	Biorad, München
Blockierungspuffer	5 % Magermilchpulver in TTBS
Bovine Serum Albumine	Biorad, München
Proteinstandard	
Diff-Quik [®]	Medion-Diagnostics, Dünningen, Schweiz
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
Chemilumineszenzlösung	GE Healthcare Life Sciences Deutschland, München
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd, säurefrei	Roth, Karlsruhe

Gelatine Typ A	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Merck Biosciences, Darmstadt
Hoechst 33342	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Knockout-DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Knockout-Serum Replacement	Invitroge, Karlsruhe
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Merck Biosciences, Darmstadt
Methanol p.a.	Roth, Karlsruhe
Proliferations-Kit	Roche Applied Science, Mannheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxyd	Roth, Karlsruhe
Natural Mouse Laminin	Invitrogen, Karlsruhe
Non-Essential Aminoacids 100x	Invitrogen, Karlsruhe
N2-Supplement 100x	Invitrogen, Karlsruhe
Nutrient Mixture Ham`s F12 + Glutamine	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Sodium Lauryl Sulfate 20 %	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
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 H2O
10x SDS Proteingel-Laufpuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS;ad 1000 ml H2O
10x Tris-gepufferte Salzlösung (Puffer)	24,2 g Tris; 80 g NaCl; pH 7,6 mit Essigsäure einstellen; ad 1000 ml H2O
Tris-gepufferte Salzlösung/Tween (Waschpuffer)	1x TBS Puffer; 0,1 % Tween 20
Tetramethylethylendiamin	Biorad, München
Transferpuffer	Anode I 300 mM Tris, 20 %

10x Tris-Puffer pH 7,6

Triton X-100

Tween®20

Methanol; ad 500 ml H₂O

Anode II 25 mM Tris; 20 % Methanol;
ad 500 ml H₂O

Kathode 25 mM Tris; 20 % Methanol;
40 mM amino-n-caprioicacid; ad 500
ml H₂O

60,5 g Tris-Base, 90 g NaCl, pH 7,6
mit HCl einstellen; ad 1000 ml H₂O

Fluka, Neu-Ulm

Roth, Karlsruhe

9.1.4 Primär - und Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle	Artikelnummer
Rabbit Anti-p-Akt (Ser 473)	1:5000 WB	NEB, Frankfurt	# 9272
Rabbit Anti-p-Akt (Ser 473)	1:5000 WB	NEB, Frankfurt	# 9271
Anti-CD133 mAB-Mouse,IgG2b, CD133/2, Klon: 293C3	1:50 IF	Miltenyi Biotec	130-090-85X
Rabbit Anti-EGFR	1:2500 WB	Santa Cruz, USA	sc-03
Mouse Anti-Nestin	1:100 IF	Millipore, USA	MAB5326
Rabbit Anti-p-p44/42 MapKinase, (Klon: 20G11, Thr 202/Tyr 204)	1:5000 WB	NEB, Frankfurt	#9101
Mouse Anti-βIII-Tubulin	1:100 IF	Millipore, USA	MAB 1637
Rabbit Anti-p-p70S6-Kinase (Thr 389)	1:2500 WB	NEB, Frankfurt	#9201
Goat Anti-Mouse-IgG, HRP gekoppelt	1:10000 WB	NEB, Frankfurt	#7076
Goat Anti-Rabbit-IgG, HRP gekoppelt	1:10000 WB	NEB, Frankfurt	#7074
Goat AntiMouse-IgG, Cy™3 gekoppelt	1:100 IF	Invitrogen, Karlsruhe	#81-6515
Anti-PTEN	1:2000 WB	NEB, Frankfurt	#9552
Anti-p53	1:2000 WB	DakoCytomation, Hamburg	#DO-7

Tab. 2: Primär- und Sekundärantikörper

9.1.5 Größenstandard

Material	Quelle
Prestained Protein Ladder (Page Ruler)	Fermentas, St. Leon-Rot

9.1.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Quelle
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Aqua Ad Iniectionabilia	B. Braun, Melsungen
Blotting Papier	Sartorius, Göttingen
Combitips plus 1,0ml / 2,5ml	Eppendorf, Hamburg
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
PVDF Immobilon-P Membran 0,45 µm	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter steril, 0,2 µm	Schubert und Weiss, München
Zellkulturplatten 6-well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 6, 10, 15 cm Ø	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

9.2 Methoden

9.2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien sind adhäsiv wachsende Monolayer-Kulturen. Die Glioblastomzelllinien LN 18, LN 229, LN 308 und G 139 wurden bei gleichen Bedingungen mit 5%igem CO₂-Anteil der Umgebungsluft, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C im Brutschrank kultiviert.

Für die Zelllinien LN 18, LN 229, LN 308 wurde als Standardnährmedium DMEM Vollmedium mit und 10 Vol% FCS verwendet. Die Zelllinie G 139 wurde mit RPMI-Medium mit 100U/ml Streptomycin und 100µg/ml Penicillin, 2mM/ml L-Glutamin sowie 10Vol% FCS versorgt. Sämtliche Zelllinien wurden in 10cm Kulturschalen gehalten und in Abhängigkeit von der variierenden Proliferationsstärke ca. alle 2-3 Tage bei einer durchschnittlichen Konfluenz von jeweils ca. 70% passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 3ml PBS 1x gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA für ca. 3-5 min bei oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit 4 ml entsprechenden Mediums abgelöscht, die abgelösten Zellen mit der Pipette vereinzelt und in neue Kulturschalen umgesetzt.

Die in der Tab. 3 in ihren spezifischen Eigenschaften dargestellten Zelllinien wurden bereits durch Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgemeinschaft sowie auf der Basis der Arbeiten von Van Meir et al. charakterisiert (Schlegel et al, 2000 / Kraus et al. 2000 / Van Meir et al. 1994):

	LN 18	LN 229	LN 308	G 139
p-Akt (Ser473)	konstitutiv aktiviert	---	konstitutiv aktiviert	konstitutiv aktiviert
EGF-Rezeptor-Expression	+++	+	++	++
PTEN-Status	Wildtyp	Wildtyp	mutiert	mutiert
TP53-Gen	mutiert	Wildtyp	deletiert	Wildtyp

Tab. 3: Zelllinien und Eigenschaften

9.2.2 *Versuchsmodalitäten*

Für Versuche mit Zelllinien erwiesen sich bezüglich der Zeiträume, ab wann Zellen mit Chemoinhibitoren vorinkubiert werden sollten, im Rahmen umfangreicher Vorversuche der eigenen Arbeitsgruppe Zeitpunkte von 12h vor Bestrahlung oder anderweitiger Experimente als optimal.

Zeiträume, die länger oder kürzer waren, zeigten bezüglich des späteren morphologischen und molekularbiologischen Verhaltens entweder keine deutlichen Effekte (bei längeren Zeiträumen) oder zu geringe Effekte (bei kürzeren Zeiträumen). Konfluenzen von 70 bis 75% in den Kulturschalen galten als Standard vor Versuchsdurchführung. Nach ca. 2-3 Passagen wurden die Zelllinien LN 18, LN 229, LN 308 sowie G 139 verworfen und neue Kulturen angesetzt. Als Quelle dienten bei -80°C gelagerte Aliquots.

Die im Rahmen der Isolierung von Tumorstammzellen gewonnene Subfraktion (Side Population) wurde lediglich für jeweils 2-3 Passagen kultiviert. Konfluenzraten dieser Populationen erreichten Werte bis ca. 40%. Arbeiten mit Medien, die mit Chemoinhibitoren versetzt wurden, fanden unter bestmöglichem Ausschluss von UV-Licht statt. Für die eingesetzten Mengen an Chemoinhibitoren galt je Menge verwendeten Mediums:

- LY294002 (LY): 25µMol / ml
- Rapamycin (Rapa): 100nMol / ml
- Tyrphostin AG1478 (AG): 10µMol / ml

LY294002 ist ein hochselektiver Inhibitor der PI3-Kinase und hemmt somit die Phosphorylierung von Akt an der ATP-Bindungsstelle (Produktinformationen Cell Signaling Technology, 2009 / Vlahos, 1994).

Rapamycin gehört zur Gruppe der Makrolid-Antibiotika und hat unterschiedlichste Wirkungen auf Zellen. Für die vorliegende Arbeit war die Blockade von mTOR und damit die Hemmung der Aktivierung der p70S6-Kinase relevant (Produktinformationen Calbiochem, Akt/PI 3-Kinase Signaling, 2007 / Dancey, 2006).

Tyrphostin AG1478 ist ein kleinmolekularer, monospezifischer Inhibitor des EGF-Rezeptors. Hirdurch ist eine Blockade der nachgeschalteten Signalwege möglich. (Produktinformationen Cell Signaling Technology, 2009 / Ellis et al., 2006).

Bestrahlungsversuche wurden am Röntgentherapiegerät Philips RT100 mit folgender Einstellung durchgeführt:

Bestrahlungstrichter:	Höhe 30cm, Grundfläche 20x20cm, pyramidenförmig
Beschleunigungsspannung:	70kV
Bestrahlungszeit:	5,13min
Strahlenart (Röntgenröhre):	Röntgenstrahlen
Applizierte Gesamtdosis je Versuch:	6 Gy

Aufgrund Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde bezüglich der Dosisfindung bei Bestrahlungsversuchen die Dosis von 6 Gy als Standard eingesetzt (Gross et al., 2005). Bestrahlt wurden 6-well-plates, die auf einen stabilen Metalltisch gestellt wurden. Der Bestrahlungstrichter wurde von oben orthogonal über die 6-well-plates gebracht. Die Vergleichs- und Kontrollgruppen mussten in den Versuchsträgern zum Bestrahlungsapparat transportiert werden, was per Isolationsbehälter möglichst erschütterungsarm gewährleistet wurde. Die Kontrollgruppen wurden stets den gleichen Bedingungen ausgesetzt. Nach Bestrahlung erfolgte eine obligate Inkubation von 1h bei Standardbedingungen vor anschließenden, weiteren Versuchen.

9.2.3 Colony formation assays (colony assays)

Zur Bestimmung der quantitativen und langfristigen Zellbeeinflussung durch Bestrahlung wurden für die Zelllinien LN 18, LN 229, G 139 und LNZ 308 ‚colony formation assays‘ durchgeführt. Nach entsprechender Vorbehandlung und Bestrahlung wurde die quantitative Beeinträchtigung ausgewertet. Im Rahmen der über Hoechst 33342 gesorteten Side Population der Zelllinie LN 18 wurden entsprechend den etablierten Zelllinien ebenfalls colony formation assays angefertigt.

Bei Konfluenzen um jeweils ca. 75% wurden die Zelllinien in 10cm Kulturschalen am Röntgentherapiegerät RT 100 für 5,13min entsprechend 6Gy Gesamtdosis bestrahlt, anschließend für 1h bei Standardbedingungen inkubiert und nach enzymatischer Vereinzellung und Zählung am Zellzähler zu jeweils 5×10^3 Zellen in neue 15cm Kulturschalen überführt. Vergleichsgruppen mit Chemoinhibitoren wurden vor der Bestrahlung für 12h mit LY294002, Rapamycin oder Tyrphostin AG1478 vorbehandelt. Analog wurden diese Zellen nach Bestrahlung auch mit dem Medienvolumen angepassten Mengen an Chemoinhibitoren weiter inkubiert. Alle neu ausplattierten Zellen wurden mit 15ml Gesamtmedium für 14 Tage im Brutschrank belassen. Danach folgte ein dreistufiges Fixieren und Färben der Kolonien mit Diff-Quick[®] für jeweils 5min.

Bei gleichen Lichtverhältnissen wurden die Kolonien lichtmikroskopisch durch drei unabhängige Zählungen je Kulturschale ermittelt. Als Standardbedingungen galten eine räumliche Abgrenzbarkeit der Kolonien zueinander, bei einzelnen Kolonien ein Gefälle an Zelldichte von zentral nach peripher mit identifizierbarem Zentralpunkt sowie Ausschluss von Artefakten, beispielsweise von gefärbten, nichtzellulären Elementen, durch zusätzliche stichprobenartige Kontrolle aller gezählten Areale. Ab einer Zellzahl von 25 wurde als Kolonie gewertet, dies wurde ebenso stichprobenartig für jede Zählung jedes ausgewerteten Areals mehrfach bestätigt.

9.2.4 Zellvitalitätsassays

Die Ermittlung der quantitativen, kurzfristigen Zellbeeinflussung bis 72h durch Bestrahlung und chemische Signalblockade wurde durch den sog. Zellvitalitätsassay durchgeführt (Berridge et al., 1996 / Mosmann et al., 1983). Die Zytotoxizität bzw. im Umkehrschluss die Zellvitalität unter LY294002, Tyrphostin AG1478 und Rapamycin wurde über den Reduktionsvorgang von gelbem, wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zu blauvioletter, wasserunlöslichen Formazan getestet.

Hierzu wurden 5×10^5 Zellen auf 6-well-plates ausplattiert, nach 12h Chemoinhibitoren zugesetzt und nach insgesamt 24h nach Plattieren erfolgte die Bestrahlung. Danach Inkubation für 1h und Zählung der Zellen. Zellsuspensionen mit Zelldichten von 5×10^4 Zellen/ml wurden zu je 100 μ l auf 96-well-plates überführt und für 24h inkubiert.

Danach Durchführung nach Angaben des Herstellers. Für die Zeitpunkte 24h, 48h und 72h wurden die Extinktionswerte am ELISA-Reader gemessen. Die Extinktionswellenlänge im Photometer betrug 595nm

9.2.5 Gewinnung von Proteinlysaten

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit ca. 4°C kaltem PBS kurz gewaschen und anschließend ein Zellysepuffer zugegeben. Die Kulturschalen wurden sodann für 15min auf Eis gestellt. Es folgte die mechanische Erntung mittels Zellschaber, die gelösten Zellen wurden in 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert und erneut für 15min auf Eis gelegt. Eine Zentrifugation der Zellysate für 15min bei 10000rpm und 4°C schloss sich an. Daraufhin wurde der in Triton lösliche Überstand in neue 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C konserviert. Die tritonunlösliche Fraktion wurde verworfen.

9.2.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Um quantitative Werte an Proteinkonzentrationen in den Proteinlysaten zu erhalten kam die Methode nach Bradford zur Anwendung. Hierbei kommt es zur Bindung von Coomassie brilliant blue G 250 an Proteine, was zu einer zunehmenden Blaufärbung führt, die bei einer Absorption von 595 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Methodisch werden die Proteinlysate im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt und mit 0,01% Triton X-100, PBS und Biorad-Reagenz (ihrerseits im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt) in einer Einmalküvette durchmischt. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde im Spektralphotometer gemessen. Eine parallele Messung von BSA-Proteinstandards lieferte die für die Bestimmung der Proteinmengen nötige Kalibrationskurve.

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

Tab. 4: Bradford-Ansatz

9.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der Gelelektrophorese lassen sich Proteingemische elektrochemisch auftrennen. Die Bindungsfähigkeit einzelner Proteine an das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) dient hierbei als wesentlicher Mechanismus. Nach Bindung denaturiert SDS die Proteine und negativiert diese in deren Ladungseigenschaften, was Protein-Protein-Interaktionen verhindert. Die Proteine lassen sich folglich nur anhand ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht mittels unterschiedlich langer Laufeigenschaften im Elektrophoresegel auftrennen. Zum Einsatz kam das diskontinuierliche, eindimensionale Lämmli-System (Lämmli, 1970). Hierbei liegt ein Sammelgel (5%ig, pH 6,8) über einem Trenngel (10- oder 12,5%ig, pH 8,8), wobei letzteres in vertikaler Füllrichtung zwischen zuvor mit technischem Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen und anschließend mit H₂O überschichtet wurde. Es folgte eine 45minütige Polymerisationsdauer für das Trenngel und eine anschließend 15minütige Polymerisationsdauer für das Sammelgel.

Parallel wurden entsprechende Proteinmengen mit Gelladepuffer für 5min bei 95°C denaturiert und danach kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die einzelnen Kammern mit den Proteinen beladen und bei 100V Spannung je nach Proteingröße zwischen 30min und ca. 3h aufgetrennt.

Zusätze	Sammelgel	Trenngel	Trenngel
	5%ig	10%ig	12,5%ig
30%iges Acrylamid	836	1330	2100
1 M Tris/HCl pH 6,8	626	--	--
1 M Tris/HCl pH 8,8	--	1000	1870
H ₂ O bi dest.	3500	1660	1000
20% SDS	25	25	25
10% APS	25	25	25
TEMED	10	10	25

Tab. 5: Zusammensetzungen Sammelgel und Trenngel für SDS-PAGE; in µl

9.2.8 Western Blot Analysen

Zur Untersuchung intrazellulärer Signalwegsregulation wurden Western Blot Analysen für die Zeitpunkte 1h, 12h, 24h und 48h nach initialer Behandlung mit LY294002, Rapamycin oder Tyrphostin AG1478 sowie Bestrahlung ermittelt. Untersuchte Proteine waren Phospho-Akt/Proteinkinase B, Phospho-MAPK/p-p44/42 MAP-Kinase, sowie Phospho-p70S6-Kinase. Expressionen von EGFR, PTEN, p53 sowie Phospho-Akt (Ser473) wurden zur Charakterisierung der Zelllinien bestimmt. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin.

Nach SDS-PAGE wurden die Proteine des SDS-Gels im Semidry-Verfahren je nach Protein ca. 1h bis 1,5h bei 225mA elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurden zunächst die PVDF-Membranen je 5min in Methanol und danach in Anodenpuffer II bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurde nach Beendigung des Gellaufs die Sammelgelschicht von der Trenngelschicht abgetrennt und manuell mit den vorbereiteten PVDF-Membranen aufgenommen

Die geblotteten Membranen kamen im Anschluss für 1h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer und wurden nachfolgend kurz in TBST Waschpuffer gegeben und mit Primärantikörperlösung (5 ml) in entsprechender Konzentration (siehe Tab. 2) über Nacht bei 4°C auf dem Rüttler inkubiert. Die Sekundärantikörperlösungen wurden nach vorhergehendem, dreimaligen Waschen mit TBST Waschpuffer für jeweils 7min bei Raumtemperatur für 1h auf dem Rüttler inkubiert, danach wieder dreimal mit TBST Waschpuffer für jeweils 10min gewaschen.

Anschließend wurden die Membranen für 2min mit im Verhältnis 1:1 gemischter ECL Chemilumineszenzlösung behandelt und in Transparenzfolie eingeschlagen. Die Chemofluoreszenzdetektion erfolgte mit Röntgenfilmen, die Entwicklung per Entwicklermaschine in der Dunkelkammer.

9.2.9 Neurosphärenkultur

Mit Gelatinelösung beschichtete 15cm Kulturschalen aller Zelllinien wurden über Nacht unter Standardbedingungen vorinkubiert. Es folgten die Zugabe von 5×10^5 Zellen einer Zellsuspension in Neurobasalmedium und erneute Inkubation. Zunächst setzten sich die Zellen als Monolayer ab. Nach ca. 8-10 Tagen in Kultur zeigten sich

morphologische Veränderungen in Form sich kontinuierlich bildender, sphärischer Zellkonglomerate, die teils spontan selbst abschwammen oder sich durch leichtes Klopfen zum Abschwimmen bringen ließen. Eine Vereinzelung erfolgte enzymatisch.

50er Falcon	Endkonzentration
Knockout-DMEM	1x
Ham's F12	1x
Knockout Serum Replacement	10%
Non-essential Aminoacids	1x
Laminin	1µg/ml
N2-Supplement	1x
Penicillin / Streptomycin	100U/ml / 100µg/ml
500µl Glutamin	2mM
bFGF	10ng/ml
50µl EGF	50ng/ml

Tab. 6: Neurobasal-Medium (N2-Medium)

9.3 Neuronale Differenzierung

Einzelzellsuspensionen der Zelllinie LN 18 aus den Neurosphäroiden erhielten für neuronale Differenzierungsversuche ein Medium mit B-27 supplement. Initial wurden die zu untersuchenden Zellen in Standardmedium inkubiert, dann für 10 Tage in Neurobasal-Medium gehalten und anschließend für weitere 14 Tage in neuronalem Differenzierungsmedium mit B-27 supplement inkubiert. Anschließend wurde die Immunfluoreszenz auf β III-Tubulin zur Identifizierung neuronaler Differenzierung durchgeführt.

Zusätze	Endkonzentration
Knockout-DMEM	1x
Ham's F12	1x
Knockout Serum replacement	10%
B-27 supplement	1x
Non-essential Amino-acids	1x
Penicillin/Streptomycin	100U/ml / 100µg/ml
Glutamin	2mM/ml
NGF	50ng/ml

Tab. 7: Neuronales Differenzierungsmedium

9.3.1 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzfärbungen auf Nestin (Intermediärfilament Typ VI) wurden für alle Zelllinien sowie bei LN 18 auf β III-Tubulin nach folgendem Protokoll markiert:

Im ersten Schritt erfolgte Spülen mit PBS und Fixieren der Zellen auf den Kulturschalen mittels Formaldehyd 4%, Aceton oder Ethanol 70% in Abhängigkeit des jeweiligen Antikörpers. Anschließend Inkubieren der Slides für 10min mit 0,25% Triton X-100/PBS und Spülen mit PBS. Dann wurde mit 5% Normal Ziegenserum für 30 min blockiert und die Inkubation mit Primärantikörper für 1h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in der entsprechend ausgetesteten Verdünnung durchgeführt. Nach erneuter Spülung mit PBS erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörper (Verdünnung 1:100) für 1h bei Raumtemperatur. Spülung und anschließende Kernfärbung mit Hoechst 33342 mit 1µg/µl schloss sich an. Die Präparate wurden danach mit Vectashield Mountain-Medium eingedeckelt und im Dunkeln bei -20°C gelagert. Für die Detektion von Nestin wurden die Zellen über 10 Tage in Neurobasalmedium vorinkubiert und anschließend nach oben genanntem Protokoll markiert. Fluoreszenz-Dokumentationen erfolgten über das konfokale Zeiss-Mikroskop ApoTome.

9.3.2 Prominin 1/CD133 Proteinexpression

Die Zelllinien LN 18, LN 229, G 139 und LN 308 wurden nach Immunfluoreszenzprotokoll gemäß 9.3.1 auf die Expression des Membranproteins CD133 (cluster of differentiation133, Prominin-1) untersucht. Hierzu erfolgte die Vorinkubation der Zellen für 10 Tage in Neurobasalmedium und anschließend die Markierung über den monoklonalen Antikörper IgG2b/CD133/2 Klon: 293C3. Dokumentiert wurde über das konfokale Zeiss-Mikroskop ApoTome.

9.3.3 Nachweis einer Side Population mittels FACS-Analyse

Alle Zelllinien waren vor den Versuchen in FCS-Medium inkubiert und wurden für die eigentliche Analyse mit HBSS-HEPES-Medium versorgt. Die Zelllinie LN 18 wurde bei einheitlichen Konfluenzen von 70 bis 75% den durchflusszytometrischen Analysen zugeführt.

Zusammensetzung HBSS-HEPES-Medium:

- 2Vol% FCS
- 10 μ M HEPES
- 1x HBSS

Je Messvorgang wurden ca. 1×10^7 Zellen eingesetzt. Begonnen wurde mit Waschen der Zellen mittels 4°C kaltem PBS, nachfolgender enzymatischer Ablösung mit Accutase zu 4ml je 15cm Schale, Ablösung mit ca. 6ml HBSS-HEPES-Medium und mechanischer Vereinzelung mit der Pipette, anschließend wurde die Zellzahl mittels automatischer Zellzählung bestimmt.

Nach Zählung wurden die Zellsuspensionen bei 4°C für 2min und mit 4000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 5ml HBSS-HEPES-Medium resuspendiert. Der Kernfärbungs-/DNA-Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 diente zur Markierung von Zellen mit ATP-binding-cassette-Transportersystemen (ABC-Transporter). Hierzu wurde jedem vorbereiteten 50ml Falcon 5 μ g/ml Hoechst-Farbstoff zugegeben. Bei 37°C inkubierten die Zellen im Wasserbad für mindestens

90min, dabei wurden die Versuchsgefäße in regelmässigen Abständen manuell gedreht, Ausschluss von UV-Licht war gegeben. Nach Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen in 15ml Falcons überführt, erneut bei 4°C abzentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zellen mit 5ml HBSS-HEPES-Medium in PBS neu aufgenommen. Eine ständige Kühlung auf etwa 4°C war gewährleistet.

Um die zu identifizierenden Tumorzellen mit stammzellartigen Eigenschaften aus der heterogenen Zellsuspension isolieren zu können, wurden die vorbereiteten Zellen im Durchflusszytometer ‚MoFlo‘ (Becton Dickinson) des Zellsortierservices des Instituts für Molekulare Immunologie des HelmholtzZentrum münchen, Serviceeinheit Monoklonale Antikörper, analysiert und zur weiteren Kultivierung in sterile Gefäße sortiert. Parallel zum Sortierprozess erfolgte die Quantifizierung der gesorteten Zellen.

9.3.4 Statistik

Für statistische Auswertungen im Rahmen der Zellvitalitätsassays wurde die Software SPSS 17.0.2 verwendet. Diese diente auch zur Erstellung der Abbildungen der colony formation assays sowie der Zellvitalitätsversuche. Es wurden die nicht-parametrischen Testverfahren nach Mann-Whitney-U und nach Friedman für die Auswertung der Zellvitalitätsassays herangezogen und eine statistische Signifikanz wurde unter der Bedingung $p \leq 0,05$ angenommen. Für die colony formation assays wurde eine rein deskriptive Auswertung und grafische Aufarbeitung mittels Boxplots und Balkendiagrammen (Software: Microsoft Excel) gewählt.

10. Ergebnisse

10.1 Colony formation assays

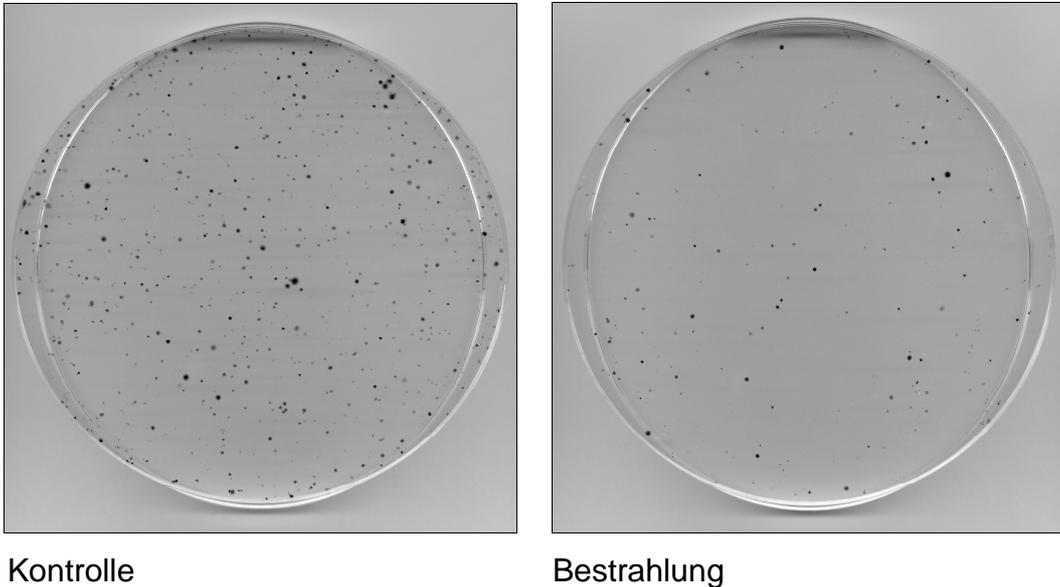


Abb. 6: Beispielbilder Zellkulturschalen colony formation assays (colony assays):

Computerscan von 10cm-Zellkulturträgern mit gefärbten Kolonien der Zelllinie LN 18 unter Standardkulturbedingungen ohne Bestrahlung (Kontrolle;links) und mit Bestrahlung mit einer Dosis von 6Gy Röntgenstrahlung (Bestrahlung;rechts) nach 14tägiger Inkubation und anschließender Fixierung und Färbung mittels Diff-Quik[®]-Lösung zur Veranschaulichung des kolonierelevanten Effekts der Bestrahlung. Die Auswertung erfolgte für alle Zelllinien gemäß Punkt 9.2.3.

Ergebnisse Zelllinie LN 18:

Alleinige Bestrahlung minderte die Kolonienanzahl um 20%. LY294002 und kombinierte Bestrahlung dezimierten die Kolonienanzahl um 82%. Unter Rapamycin und Bestrahlung war eine Minderung auf 46% zu verzeichnen, unter Bestrahlung und Tyrphostin AG1478 auf 92%.

LN 18	Anzahl Kolonien unbestrahlt	Anzahl Kolonien bestrahlt	Anzahl Kolonien unbestrahlt in %	Anzahl Kolonien bestrahlt in %
Kontrolle	875	702	100	80
LY294002	281	51	100	18
Rapamycin	1260	580	100	46
Tyrphostin AG1478	787	722	100	92

Tab. 8: Ergebnisse des colony assays der Zelllinie LN 18

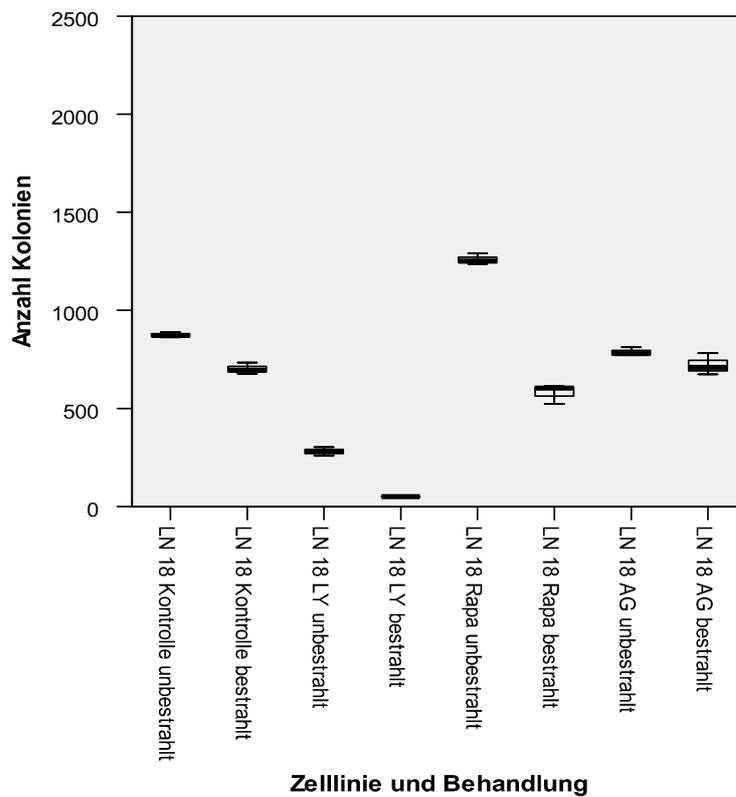


Abb. 7: Grafische Darstellung des colony assays der Zelllinie LN 18:

Die Abbildung enthält Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima.

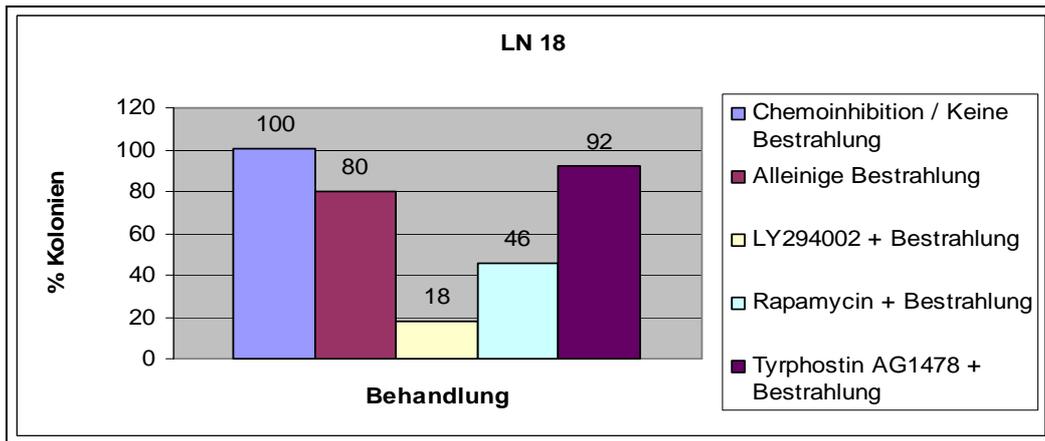


Abb. 8: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse für LN 18:

Die Abbildung veranschaulicht den Effekt kombinierter Strahlen- und Chemotherapie im Vergleich zu alleiniger Chemoinhibition bzw. alleiniger Bestrahlung.

Ergebnisse Zelllinie LN 229:

Bestrahlung alleine verminderte die Kolonienanzahl um 55%. Unter dem Einfluss von LY294002 und Bestrahlung fand sich eine klonogene Überlebensrate von 31%, unter Rapamycin von 53% und unter Tyrphostin AG1478 von 46%.

LN 229	Anzahl Kolonien unbestrahlt	Anzahl Kolonien bestrahlt	Anzahl Kolonien unbestrahlt in %	Anzahl Kolonien bestrahlt in %
Kontrolle	2292	1040	100	45
LY294002	498	154	100	31
Rapamycin	2011	1057	100	53
Tyrphostin AG1478	787	359	100	46

Tab. 9: Ergebnisse des colony assays der Zelllinie LN 229

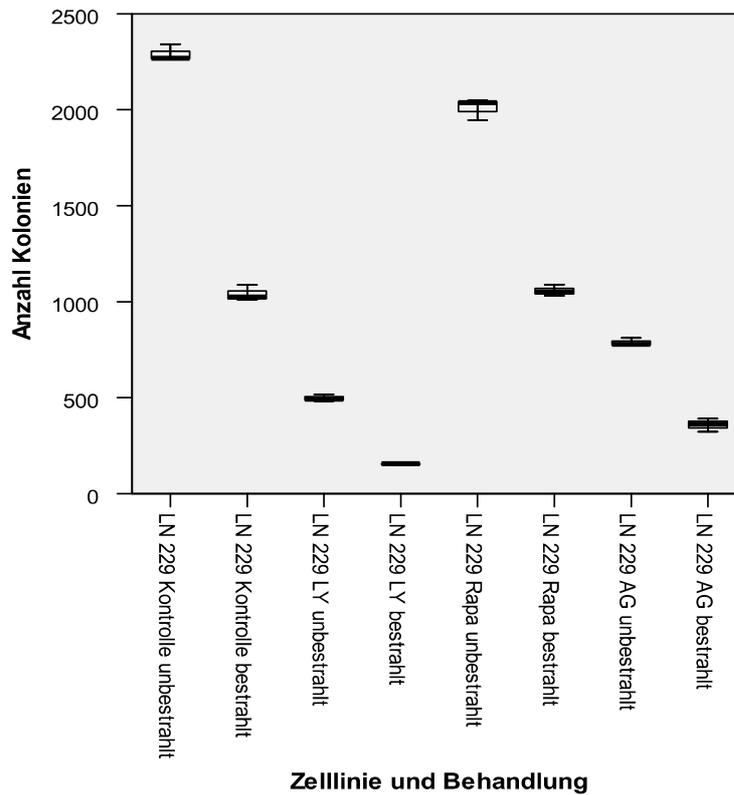


Abb. 9: Grafische Darstellung des colony assays der Zelllinie LN 229:

Die Abbildung enthält Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima.

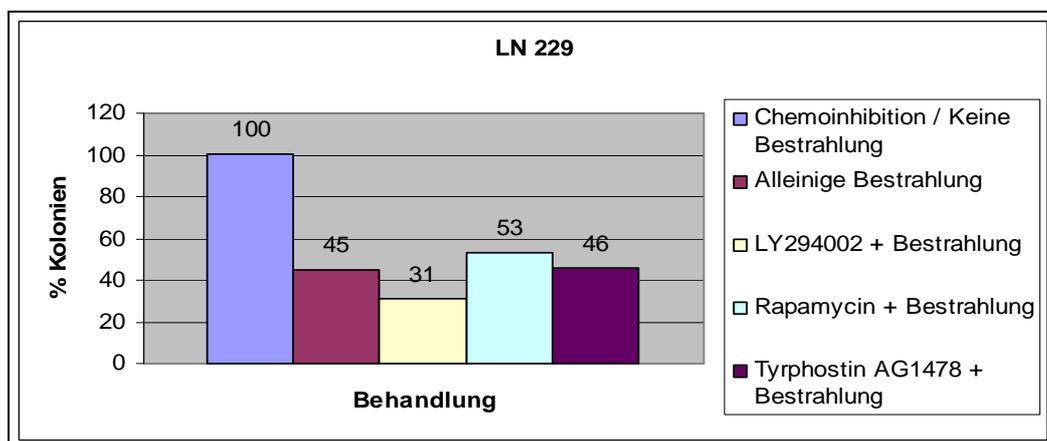


Abb. 10: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse für LN 229:

Die Abbildung veranschaulicht den Effekt kombinierter Strahlen- und Chemotherapie im Vergleich zu alleiniger Chemoinhibition bzw. alleiniger Bestrahlung.

Ergebnisse Zelllinie G 139:

Alleinige Bestrahlung reduzierte die Kolonienanzahl auf 69%. LY294002 und Bestrahlung verminderte das klonogene Überleben um 66%. Der Wert für Bestrahlung und Rapamycin betrug 28%, bei Bestrahlung und Tyrphostin AG1478 37%.

G 139	Anzahl Kolonien unbestrahlt	Anzahl Kolonien bestrahlt	Anzahl Kolonien unbestrahlt in %	Anzahl Kolonien bestrahlt in %
Kontrolle	1384	951	100	69
LY294002	125	42	100	34
Rapamycin	1119	803	100	72
Tyrphostin AG1478	168	105	100	63

Tab. 10: Ergebnisse des colony assays der Zelllinie G 139

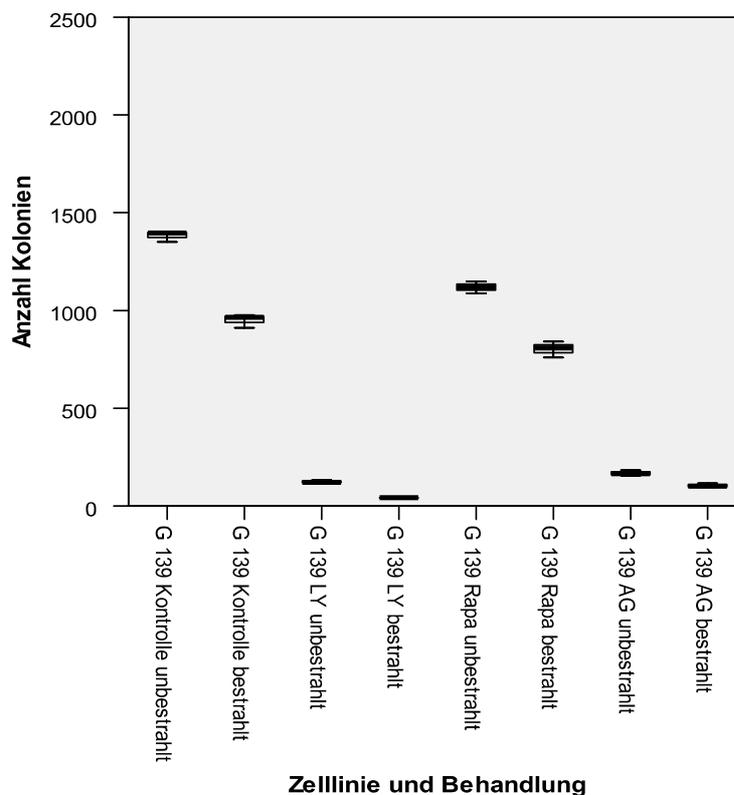


Abb. 11: Grafische Darstellung des colony assays der Zelllinie G 139:

Die Abbildung enthält Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima.

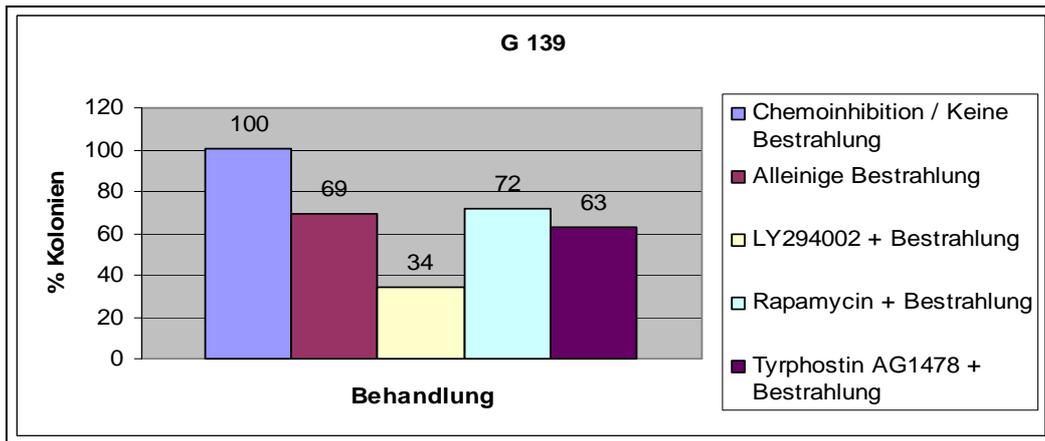


Abb. 12: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse für G 139:

Die Abbildung veranschaulicht den Effekt kombinierter Strahlen- und Chemotherapie im Vergleich zu alleiniger Chemoinhibition bzw. alleiniger Bestrahlung.

Ergebnisse Zelllinie LNZ 308:

Unter Bestrahlung von LNZ 308 kam es zu einer Minderung der Kolonien auf 47%. Bei LY294002 war eine Minderung unter gleichzeitiger Bestrahlung um 80%, bei Rapamycin und Bestrahlung um 78% zu verzeichnen. Tyrphostin AG1478 und Bestrahlung führten zu einer Reduktion auf 47%.

LNZ 308	Anzahl Kolonien unbestrahlt	Anzahl Kolonien bestrahlt	Anzahl Kolonien unbestrahlt in %	Anzahl Kolonien bestrahlt in %
Kontrolle	1517	717	100	47
LY294002	251	50	100	20
Rapamycin	1070	230	100	22
Tyrphostin AG1478	1380	647	1000	47

Tab. 11: Ergebnisse des colony assays der Zelllinie LNZ 308

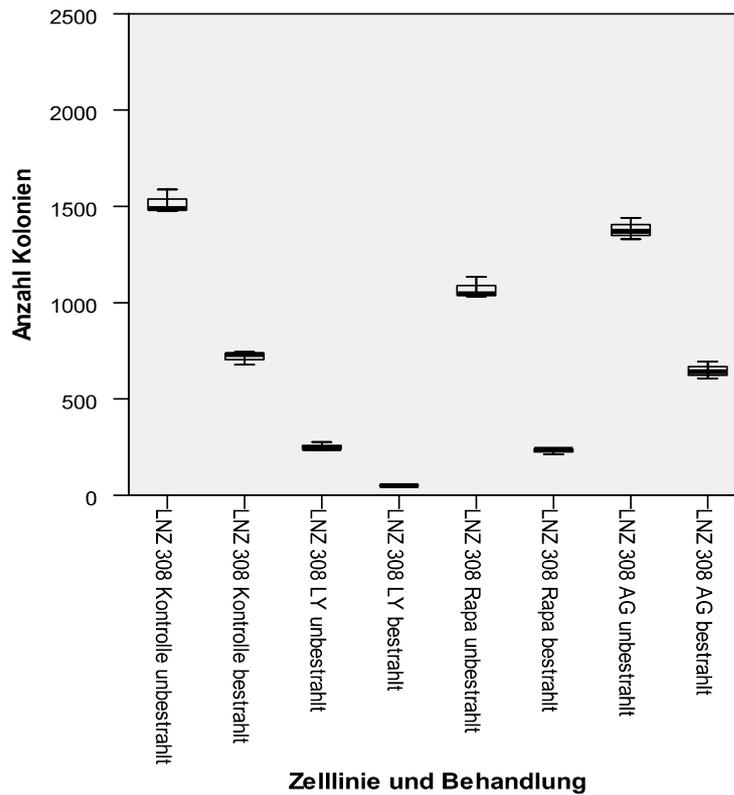


Abb. 13: Grafische Darstellung des colony assays der Zelllinie LNZ 308:

Die Abbildung enthält Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima.

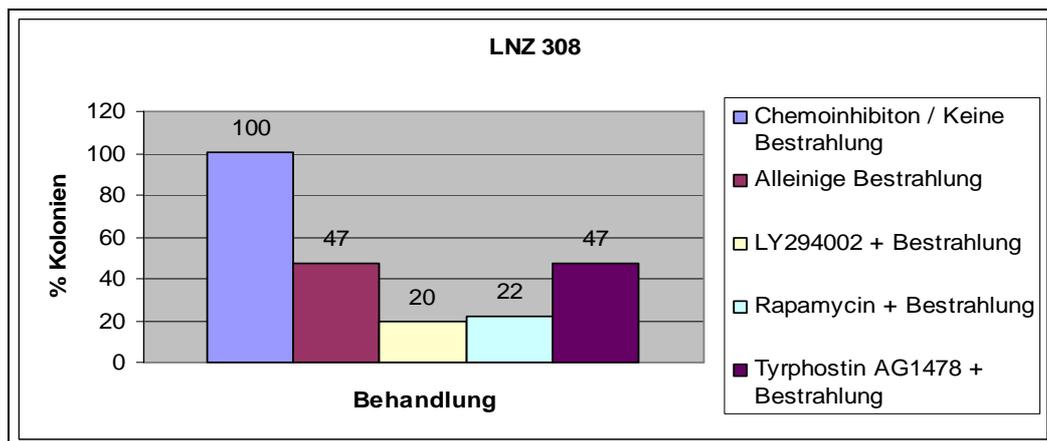


Abb. 14: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse für LNZ 308:

Die Abbildung veranschaulicht den Effekt kombinierter Strahlen- und Chemotherapie im Vergleich zu alleiniger Chemoinhibition bzw. alleiniger Bestrahlung.

10.2 Zellvitalitätsassays

Bei **LN 18** stiegen die Messwerte der unbehandelten Kontrolle linear an, unter Bestrahlung war der Verlauf zu allen Zeitpunkten vermindert. Alle Messwerte mit Chemoinhibitoren lagen unter den Kontrollniveaus. LY294002 ohne und mit Bestrahlung ergaben sich keine Unterschiede. Behandlung mit Rapamycin alleine zeigte eine Senke bei 48h gegenüber der kombinierten Bestrahlung. Mit Tyrphostin AG1478 ergaben sich über die genannten Zeitpunkte stabil niedrige Level.

LN 18	unbestrahlt	bestrahlt
Kontrolle 24h	0,605 (0,008)	0,499 (0,019)
Kontrolle 48h	1,377 (0,011)	0,993 (0,042)
Kontrolle 72h	1,787 (0,023)	1,174 (0,036)
LY294002 24h	0,335 (0,022)	0,286 (0,014)
LY294002 48h	0,299 (0,027)	0,291 (0,026)
LY294002 72h	0,304 (0,008)	0,306 (0,012)
Rapamycin 24h	0,432 (0,037)	0,315 (0,023)
Rapamycin 48h	0,318 (0,034)	0,31 (0,016)
Rapamycin 72h	0,415 (0,016)	0,412 (0,016)
Tyrphostin AG1478 24h	0,46 (0,017)	0,39 (0,02)
Tyrphostin AG1478 48h	0,358 (0,031)	0,352 (0,022)
Tyrphostin AG1478 72h	0,371 (0,039)	0,359 (0,022)

Tab. 12: Extinktionsmesswerte LN 18

Standardabweichungen in Klammern.

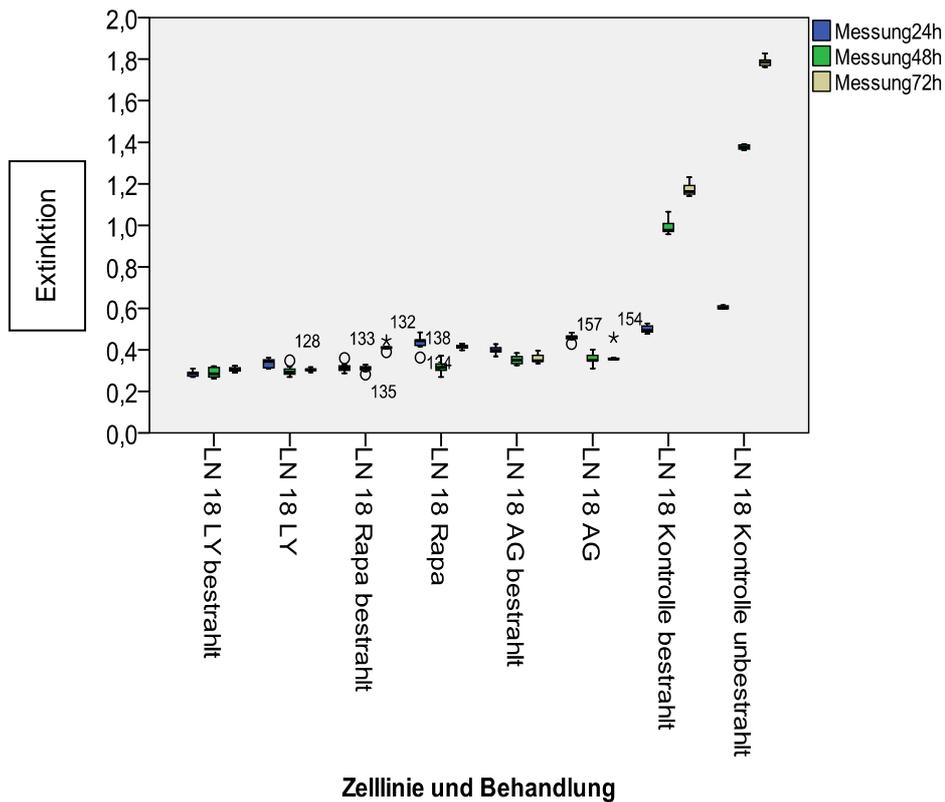


Abb. 15: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 16: Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima. Einzelwerte sind Ausreißer; deren Wert entspricht nicht Extinktionsmesswerten, sondern internen Parametern der Grafiksoftware.

Bei der Zelllinie **LN 229** zeigte sich ein zu LN 18 ähnlicher Messwerteverlauf der unbestrahlten und bestrahlten Kontrollen, allerdings lagen die Messwerte insgesamt auf niedrigerem Niveau. Messwerte für LY294002 ohne und mit Bestrahlung hatten einen linear steigenden Verlauf. Für Rapamycin ergab sich ein zu LY294002 ähnlicher Verlauf, allerdings flacher. Tyrphostin AG1478 zeigte unabhängig von Bestrahlung einen tendenziell fallenden Messwerteverlauf, der ohne kombinierte Bestrahlung flacher verlief.

LN 229	unbestrahlt	Bestrahlt
Kontrolle 24h	0,249 (0,004)	0,224 (0,003)
Kontrolle 48h	0,493 (0,009)	0,396 (0,005)
Kontrolle 72h	0,848 (0,015)	0,549 (0,006)
LY294002 24h	0,201 (0,005)	0,219 (0,014)
LY294002 48h	0,298 (0,05)	0,294 (0,028)
LY294002 72h	0,423 (0,077)	0,411 (0,008)
Rapamycin 24h	0,294 (0,016)	0,261 (0,018)
Rapamycin 48h	0,279 (0,03)	0,283 (0,015)
Rapamycin 72h	0,332 (0,047)	0,337 (0,018)
Tyrphostin AG1478 24h	0,253 (0,004)	0,324 (0,012)
Tyrphostin AG1478 48h	0,297 (0,048)	0,284 (0,007)
Tyrphostin AG1478 72h	0,253 (0,037)	0,245 (0,015)

Tab. 13: Extinktionsmesswerte LN 229

Standardabweichungen in Klammern.

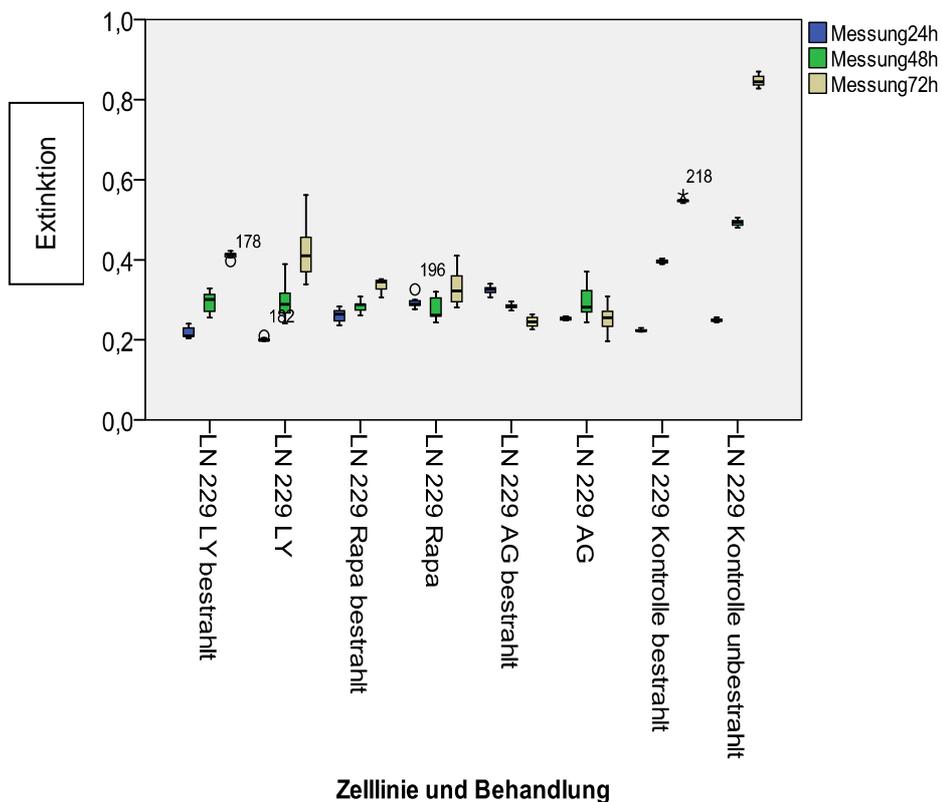


Abb. 16: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 17: Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima. Einzelwerte sind Ausreißer; deren Wert entspricht nicht Extinktionsmesswerten, sondern internen Parametern der Grafiksoftware.

Bei **G 139** waren für unbestrahlte Kontrollen höhere Messwerte im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle ermittelbar. Messwerte bei LY294002 zeigten sowohl unbestrahlt als auch bestrahlt keine Unterschiede, die 72h-Werte für LY294002 mit und ohne Bestrahlung waren höher als die unbestrahlte Kontrolle. Für Rapamycin alleine zeigte sich ein flacherer Verlauf im Vergleich zu Rapamycin und Bestrahlung, insgesamt für bestrahlte und nichtbestrahlte Gruppen mit dem niedrigsten Messwertenniveau gegenüber allen anderen Chemoinhibitoren und Kontrollen. Bei Tyrphostin AG1478 wurde ein zu LY294002 und zur unbestrahlten Kontrolle nahezu identischer Verlauf ermittelt.

G 139	unbestrahlt	bestrahlt
Kontrolle 24h	0,182 (0,024)	0,172 (0,005)
Kontrolle 48h	0,261 (0,013)	0,207 (0,008)
Kontrolle 72h	0,291 (0,055)	0,237 (0,013)
LY294002 24h	0,151 (0,008)	0,153 (0,01)
LY294002 48h	0,219 (0,005)	0,21 (0,016)
LY294002 72h	0,274 (0,019)	0,286 (0,011)
Rapamycin 24h	0,107 (0,005)	0,125 (0,006)
Rapamycin 48h	0,144 (0,007)	0,147 (0,01)
Rapamycin 72h	0,184 (0,008)	0,169 (0,001)
Tyrphostin AG1478 24h	0,149 (0,007)	0,165 (0,006)
Tyrphostin AG1478 48h	0,218 (0,019)	0,214 (0,008)
Tyrphostin AG1478 72h	0,299 (0,009)	0,279 (0,007)

Tab. 14: Extinktionsmesswerte G 139

Standardabweichungen in Klammern.

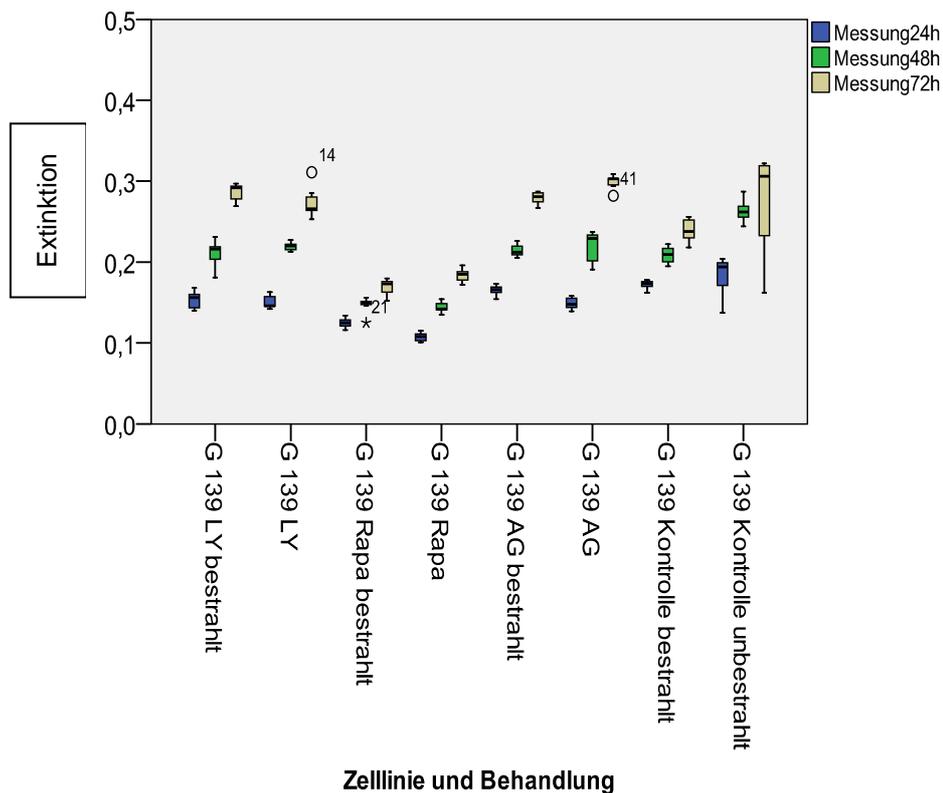


Abb. 17: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 18: Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima. Einzelwerte sind Ausreißer; deren Wert entspricht nicht Extinktionsmesswerten, sondern internen Parametern der Grafiksoftware.

Bei der Zelllinie **LNZ 308** konnten für beide Kontrollgruppen nahezu keine Unterschiede ermittelt werden. Unter LY294002 war der Verlauf ähnlich zu den entsprechenden Kontrollen mit höheren Messwerten und unabhängig von Bestrahlung bei 72h. Unter Rapamycin mit Bestrahlung war der messwerteverlauf flacher als bei der bestrahlten Kontrolle, Rapamycin alleine war ohne wesentlichen Unterschied zu beiden Kontrollen. Tyrphostin AG1478 wiederum ähnelte im zeitlichen Verlauf LY294002 und lag für unbestrahlte und bestrahlte Zellen bei 72h sowohl über dem Kontrolllevel als auch über den Messwerten bei LY294002.

LNZ 308	unbestrahlt	bestrahlt
Kontrolle 24h	0,131 (0,001)	0,129 (0,009)
Kontrolle 48h	0,194 (0,001)	0,170 (0,028)
Kontrolle 72h	0,219 (0,014)	0,219 (0,014)
LY294002 24h	0,148 (0,005)	0,159 (0,007)
LY294002 48h	0,213 (0,005)	0,197 (0,016)
LY294002 72h	0,293 (0,015)	0,292 (0,025)
Rapamycin 24h	0,124 (0,007)	0,133 (0,005)
Rapamycin 48h	0,162 (0,004)	0,161 (0,004)
Rapamycin 72h	0,208 (0,007)	0,189 (0,009)
Tyrphostin AG1478 24h	0,159 (0,004)	0,159 (0,005)
Tyrphostin AG1478 48h	0,188 (0,024)	0,228 (0,008)
Tyrphostin AG1478 72h	0,308 (0,014)	0,308 (0,014)

Tab. 15: Extinktionsmesswerte LNZ 308

Standardabweichungen in Klammern.

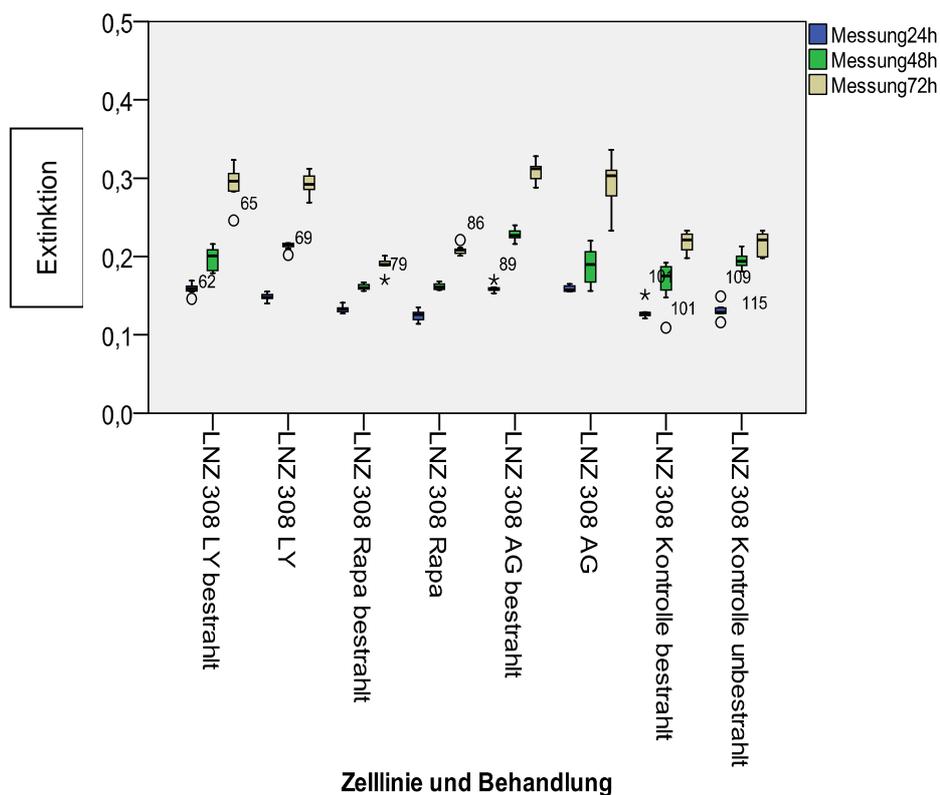


Abb. 18: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 19: Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima. Einzelzahlen sind Ausreißer; deren Wert entspricht nicht Extinktionsmesswerten, sondern internen Parametern der Grafiksoftware.

10.3 Western Blot Analysen

Für die Western Blot Analysen aller Zelllinien waren in mehrfachen Versuchen keine Blotbanden für Phospho-p70S6-Kinase nachweisbar. Für jede Analyse wurde α -Tubulin als Ladekontrolle mitgeführt.

Western Blot Analyse EGFR, p53, PTEN und p-Akt (Ser 473):

Die Charakterisierung der Zelllinien LN 18, LN 229, LNZ 308 und G 139 mittels Western Blots erbrachte den in Tab. 3 dokumentierten Status für die Expression des EGF-Rezeptors, des PTEN- und p53-Proteins und von Phospho-Akt (p-Akt / Ser 473):

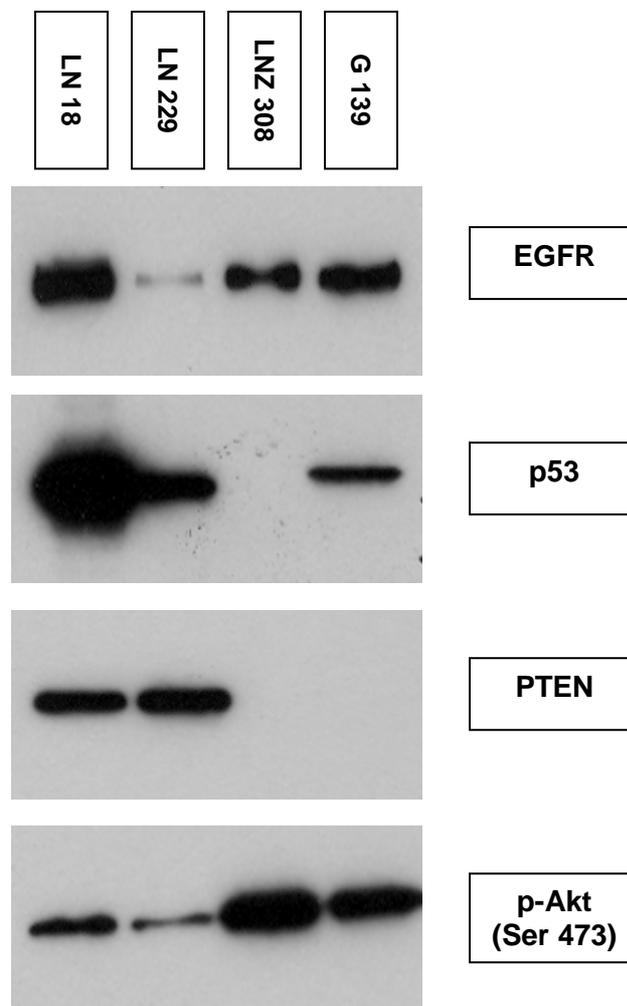


Abb. 19: Western Blot der Zelllinien LN18, LN 229, G 139 und LNZ 308 für EGFR, PTEN, p53 und Phospho-Akt (p-Akt /Ser 473)

Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt):

Eingesetzte Antikörper zur Detektion des phosphorylierten Akt wurden als Bande im Bereich von 60kDa sichtbar:

Die Zelllinie **LN 18** zeigte ohne Bestrahlung eine Aktivierung nach 1h. Mit Bestrahlung bei 1h und 48h. Bei LY294002 konnten unabhängig von Bestrahlung keine Banden nachgewiesen werden. Unter Rapamycin waren ohne Bestrahlung nach 1h, 12h und 24h Banden detektierbar. Für Tyrphostin AG1478 war ohne Bestrahlung eine Aktivierung nach 1h und 24h sichtbar. Unter Bestrahlung und Tyrphostin AG1478 war eine starke Bande bei 12h erkennbar.

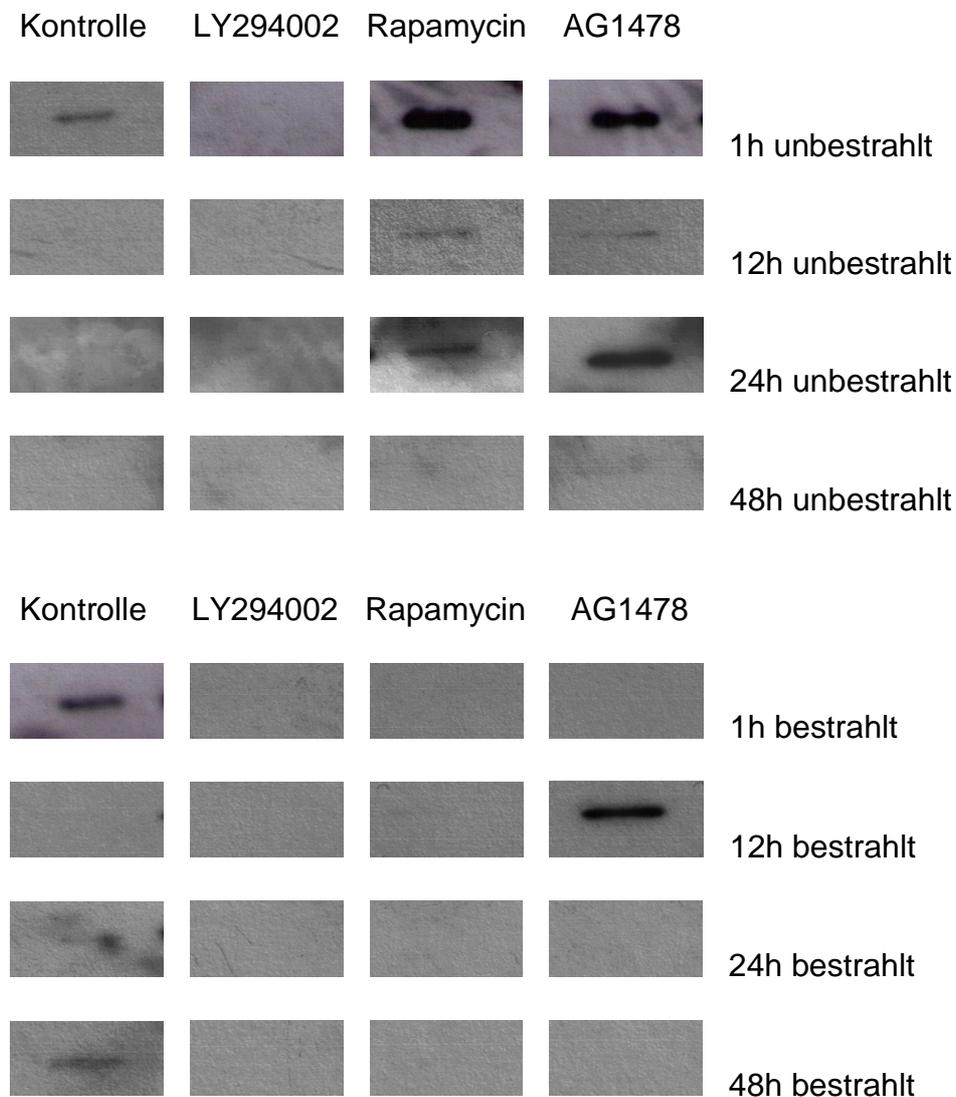


Abb. 20: Übersicht p-Akt Zelllinie LN 18

Bei der Zelllinie **LN 229** konnten für die Kontrolle ohne Bestrahlung über alle Zeitpunkte immunreaktive Banden gesehen werden, am stärksten bei 24h und 48h. Unter Bestrahlung zeigte die Kontrolle einen ähnlichen Verlauf, nur schwächer. Für LY294002 mit und ohne Bestrahlung zeigten sich bei 24h und 48h Banden. Unter Rapamycin alleine wurde eine Aktivierung nach 1h ermittelt mit abnehmender Intensität bis 48h. Wurde zusätzlich bestrahlt, zeigte sich eine ähnliche Aktivierung, allerdings am stärksten bei 24h. Tyrphostin AG1478 führte ohne Bestrahlung zur stärksten Aktivierung bei 48h, mit Bestrahlung zu ähnlichen Banden wie Rapamycin und Bestrahlung.

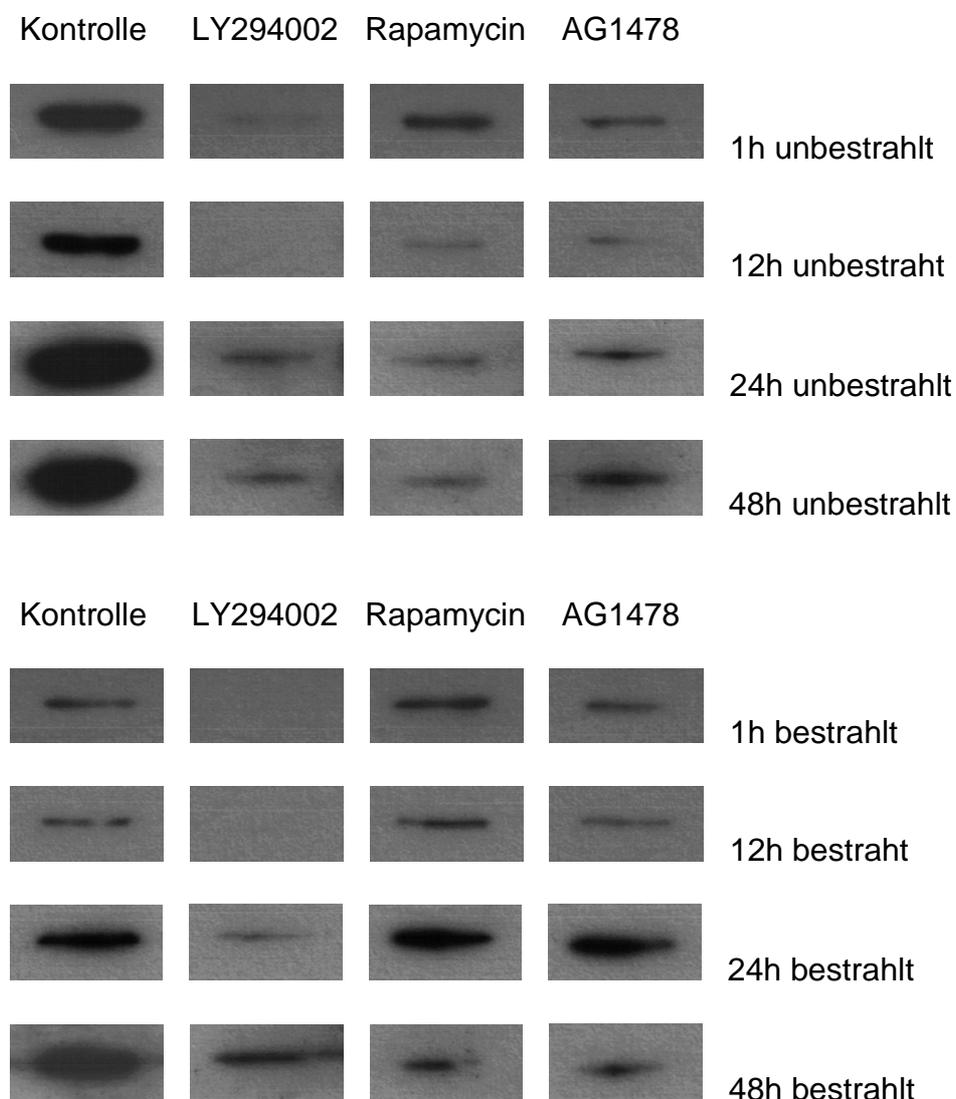


Abb. 21: Übersicht p-Akt Zelllinie LN 229

Die Kontrollen der Zelllinie **G 139** zeigten ohne und mit Bestrahlung intensive Banden. Bei alleiniger Bestrahlung waren für 12h und 24h schwächere Intensitäten sichtbar. LY294002 alleine führte mit und ohne Bestrahlung bei 48h zu einer Aktivierung, schwächer unter Bestrahlung. Für Rapamycin alleine kam es zu zwei Aktivierungsspitzen bei 1h und bei 48h. Bestrahlung und Rapamycin zeigte ähnliche Banden, allerdings stärker bei 1h. Mit Tyrphostin AG1478 ergab sich ein ähnlicher Verlauf wie bei Rapamycin. Hier war die Intensität bei 1h deutlicher und bei 12h und 24h konnten immunreaktive Banden gesehen werden. Tyrphostin AG1478 und Bestrahlung war gleich zur unbestrahlten Fraktion, allerdings mit geringerer Bandenintensität.

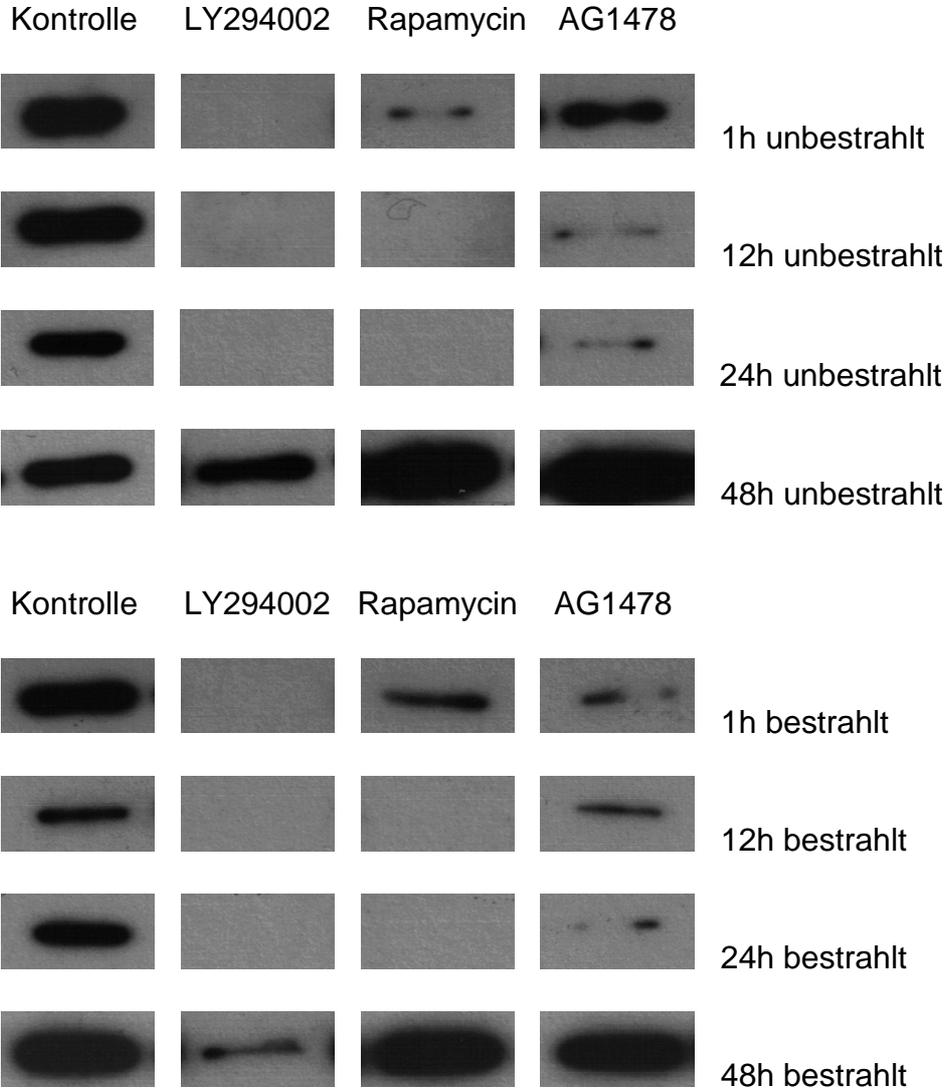


Abb. 22: Übersicht p-Akt Zelllinie G 139

Bei **LNZ 308** waren intensive Aktivierungen sichtbar, deutlicher unter alleiniger Bestrahlung. Unter LY294002 ließen sich unabhängig von einer kombinierten Bestrahlung schwache Banden nachweisen. Rapamycin zeigte mit und ohne Bestrahlung gleichbleibend intensive Banden bis 48h, ebenso wie Tyrphostin AG1478.

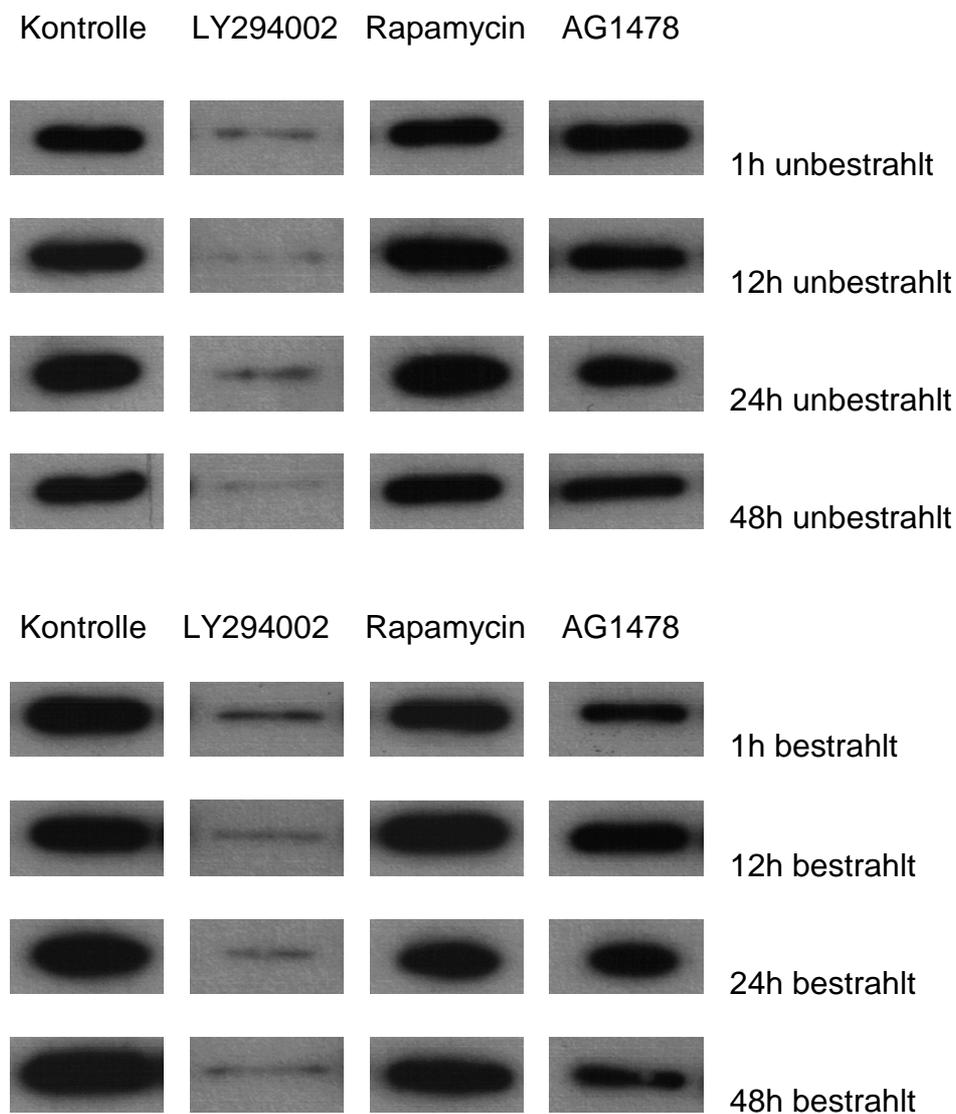


Abb. 23: Übersicht p-Akt Zelllinie LNZ 308

Phosphorylierung der MAP-Kinase:

Antikörper gegen phosphorylierte MAP-Kinase reagierten als Doppelbande in den Bereichen von 42 und 44 kDa:

Die Zelllinie **LN 18** zeigte ohne Bestrahlung für 12h eine Aktivierung für p-MAPK, unter Bestrahlung waren für 1h und schwach für 12h markierte Doppelbanden nachweisbar. Für LY294002 alleine zeigten sich Intensitäten bis 48h, am stärksten bei 12h und 24h. Mit Bestrahlung kein Nachweis von Banden. Mit Rapamycin alleine wurde ein Auftreten von Banden bei 1h und 24h sichtbar, bei kombinierter Bestrahlung bei 12h. Für die Behandlung mit Tyrphostin AG1478 konnten immunreaktive Banden bei 1h und 24h gesehen werden, unter komplementärer Bestrahlung bei 12h.

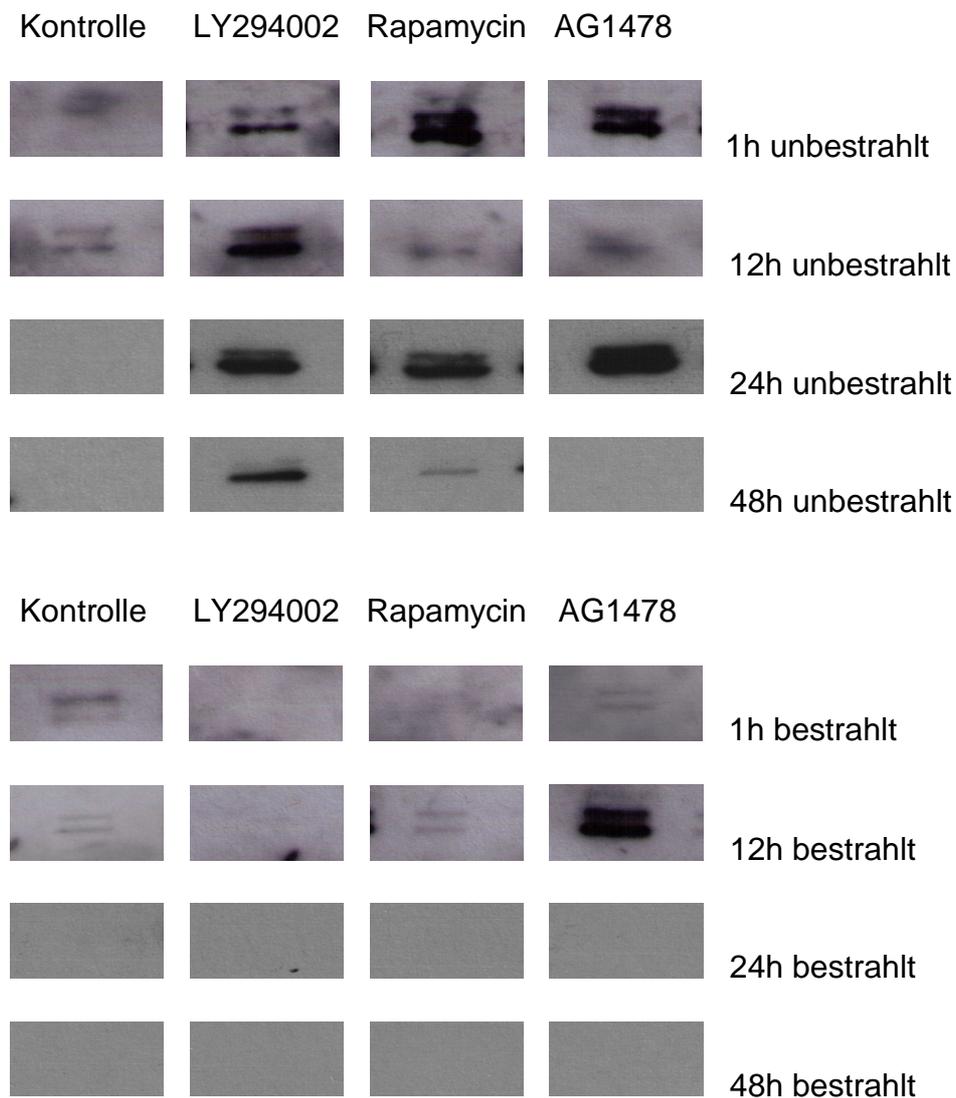


Abb. 24: Übersicht p-p 44/42-MAPK Zelllinie LN 18

Bei **LN 229** waren für unbestrahlte und bestrahlte Kontrollen intensive Banden detektierbar, schwächer jedoch unter Bestrahlung. LY294002 alleine zeigte stärkere Aktivierungen bei 1h und 24h, dazwischen schwache Aktivierungen. Mit kombinierter Bestrahlung waren keine wesentlichen Unterschiede sichtbar. Rapamycin alleine führte bei 1h zur deutlichsten Intensität, mit Bestrahlung bei 24h. Bei Behandlung mit Tyrphostin AG1478 waren sehr schwache Banden bei 12h und 48h nachweisbar, unter kombinierter Bestrahlung bei 24h und 48h.

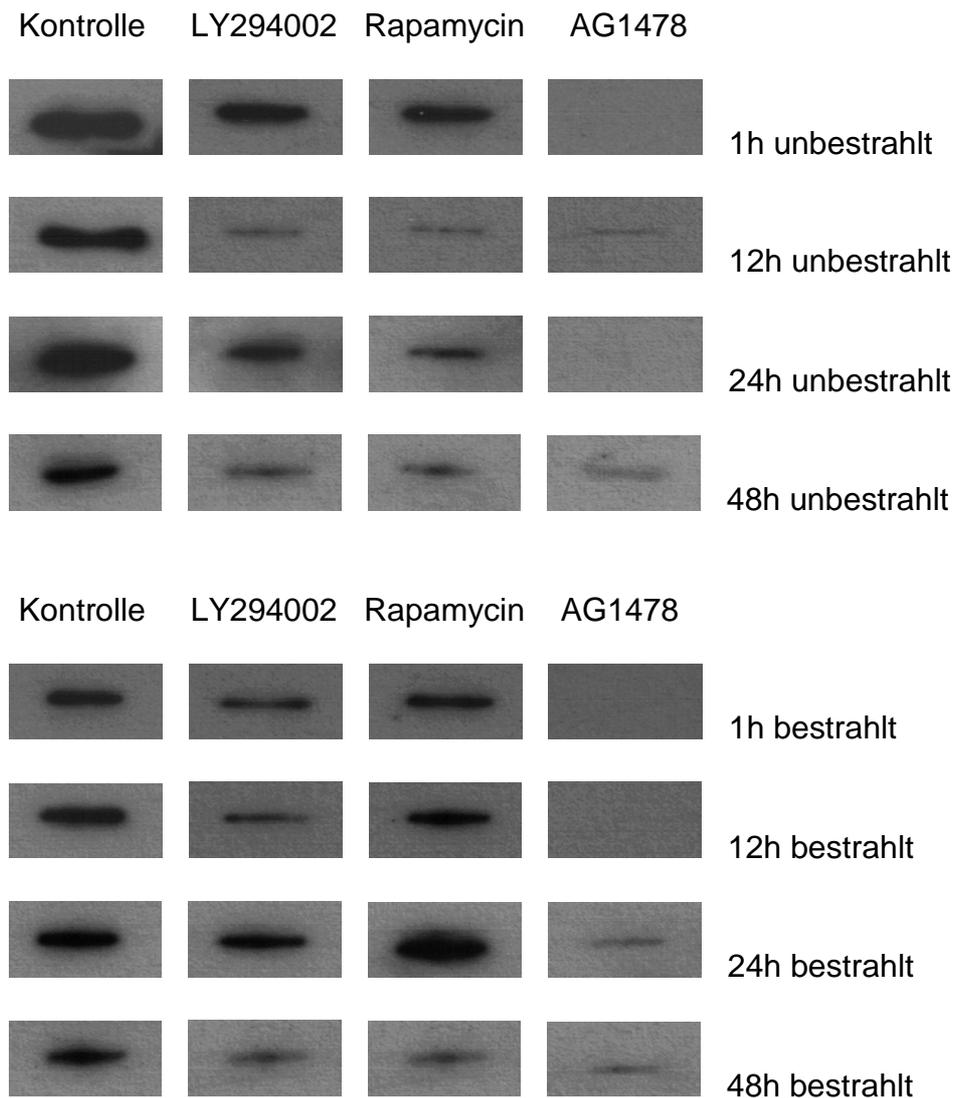


Abb. 25: Übersicht p-p 44/42-MAPK Zelllinie LN 229

Bei **G 139** waren unbestrahlt bei 1h und 12h Banden detektierbar, bei 24h noch schwach. Unter Bestrahlung waren keine Banden sichtbar. Unter LY294002 waren Banden bei 1h und 12h sichtbar, unter kombinierter Bestrahlung bei 12h. Für Rapamycin ergab sich bei 1h ein eine schwache Bande, unter kombinierter Bestrahlung einen intensive Bande bei 1h. Tyrphostin AG1478 zeigte bei 1h und bei 48h immunreaktive Banden, sonst keine.

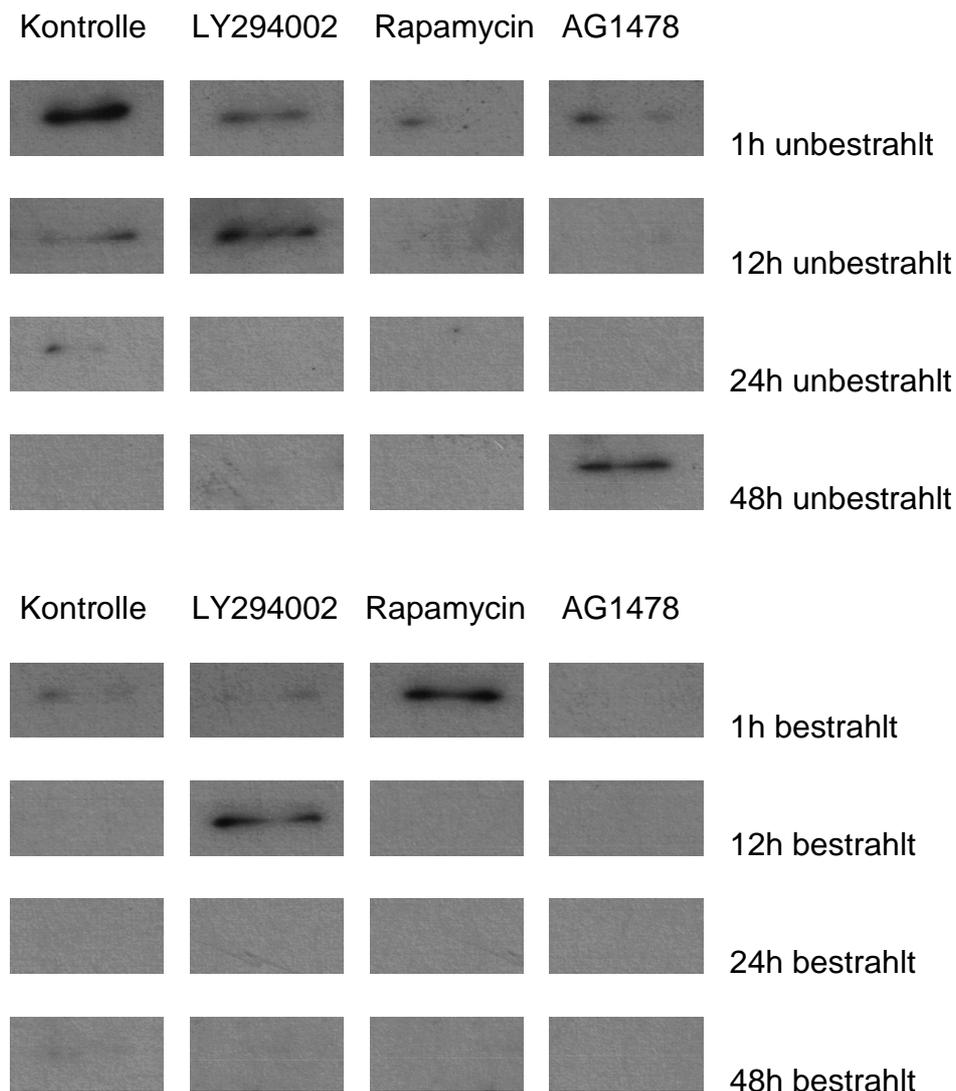


Abb. 26: Übersicht p-p 44/42-MAPK Zelllinie G 139

Die Zelllinie **LNZ 308** zeigte unbestrahlt starke Bandenintensitäten bis 48h. Unter Bestrahlung bei 1h, danach schwächer bis 48h. LY294002 alleine zeigte bei 1h und 24h intensive Nachweise von Banden, bei 12h und 48h schwächer. LY294002 und Bestrahlung erbrachte bei 1h eine intensive Bande, bei 12h bis 48h schwächere

Banden. Unter Rapamycin alleine konnten Markierungen bis 24h nachgewiesen werden. Rapamycin und Bestrahlung zeigten deutlichere Banden, die bis 48 durchgängig waren. Bei Tyrphostin AG1478 konnten mit und ohne Bestrahlung bei 1h und 12h immunreaktive Nachweise gezeigt werden, unter Bestrahlung insgesamt intensiver.

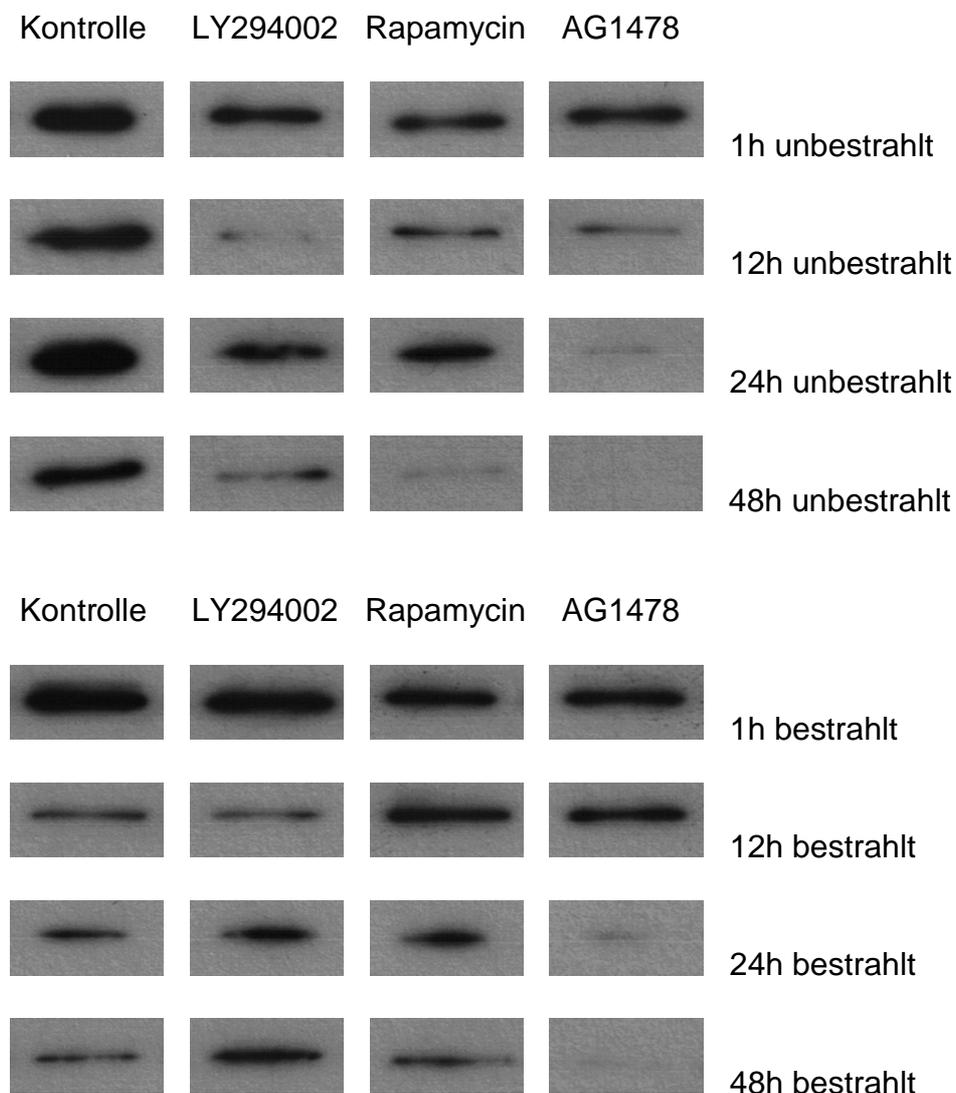
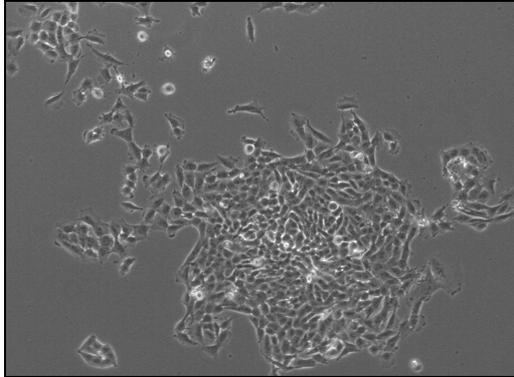


Abb. 27: Übersicht p-p-44/42-MAPK Zelllinie LNZ 308

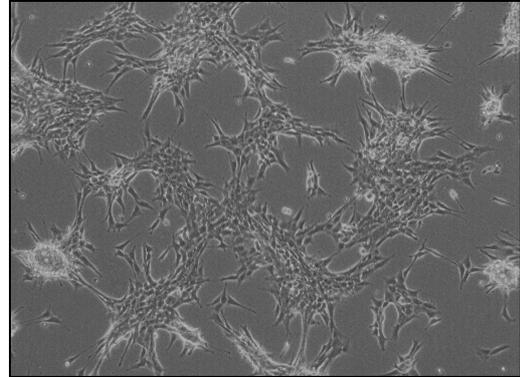
10.4 Neurosphärenkultur

In umfangreichen Vorexperimenten zeigte sich, dass die Zelllinie LN 18 als einzige der Zelllinien über mehrere Passagen stabile Neurosphärenkulturen ausbildete. Die Zelllinie LNZ 308 zeigte ebenfalls initial eine Sphäroidbildung unter

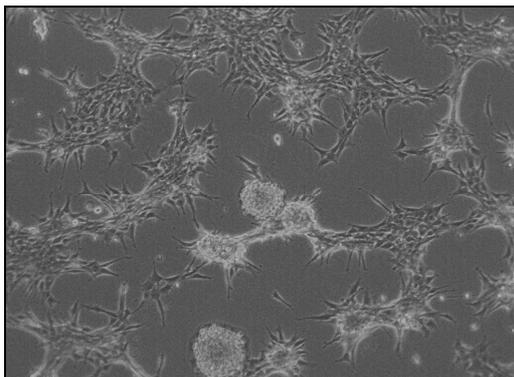
Stimulationsbedingungen, verlor diese Eigenschaft nach 1 bis 2 Passagen jedoch wieder. Die Zelllinien LN 229 und G 139 zeigten keine Neurosphärenbildung.



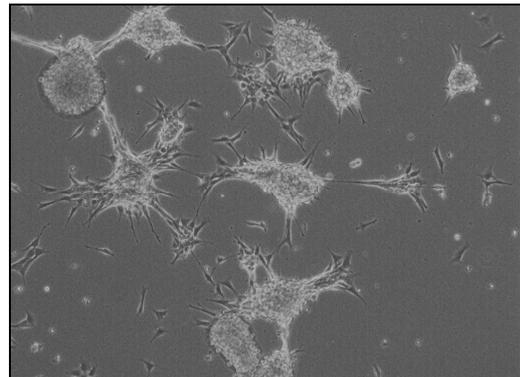
Kontrolle (*FCS-Medium*)



nach 2-4 Tagen Inkubation
(*N2-Medium*)



nach 6-10 Tagen Inkubation
(*N2-Medium*)



nach 14 Tagen Inkubation
(*N2-Medium*)

Abb. 28: Zellmorphologie nach 2-4, 6-10 und 14 Tagen Inkubation in N2-Medium:

Mikroskopische Phasenkontrastaufnahmen der Zelllinie LN 18 nach Durchführung gemäß Punkt 9.2.9. Die Entwicklung sphärischer Zellkonglomerate in Neurobasalkultivierung wurde im zeitlichen Verlauf dokumentiert. Vergleichsaufnahme der Kontrolle unter Standardbedingungen (*FCS-Medium*).

10.5 Neuronale Differenzierung

Bei der Untersuchung des Differenzierungspotentials zeigten sich bei der Zelllinie **LN 18** rote β III-Tubulin-Immunfluoreszenzen:

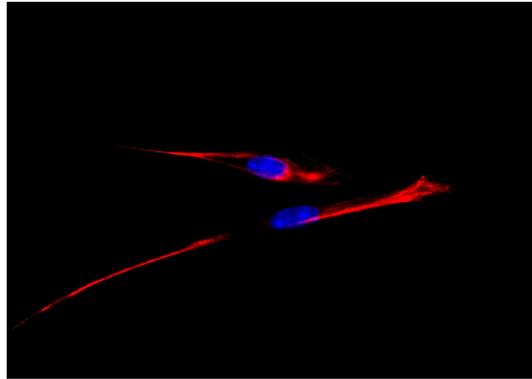


Abb. 29: β III-Tubulin Immunfluoreszenz LN 18:

Konfokale Fluoreszenzaufnahmen nach Durchführung gemäß Punkte 9.3 und 9.3.1.

10.6 Immunfluoreszenz Nestin

Der Nachweis von Stammzell-Expressionsmarkern ergab rotfluoreszierende Nestin-Antikörperbindungen bei der Zelllinie **LN 18**:

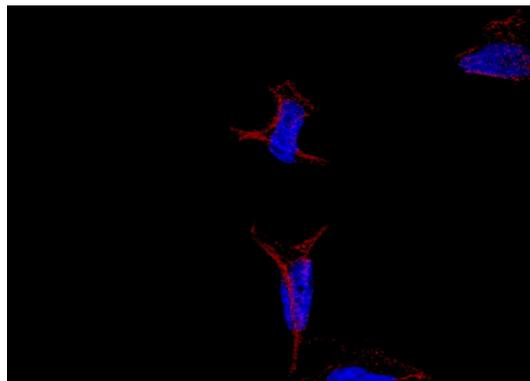


Abb. 30: Immunfluoreszenz Nestin LN 18:

Konfokale Fluoreszenzaufnahmen nach Durchführung gemäß Punkt 9.3.2.

10.7 Prominin 1/CD133 Proteinexpression

Für die Zelllinie **LN 18** waren grüne CD133-Immunfluoreszenzen detektierbar (ca. 10% aller ausgezählten Zellen je Gesichtsfeld):

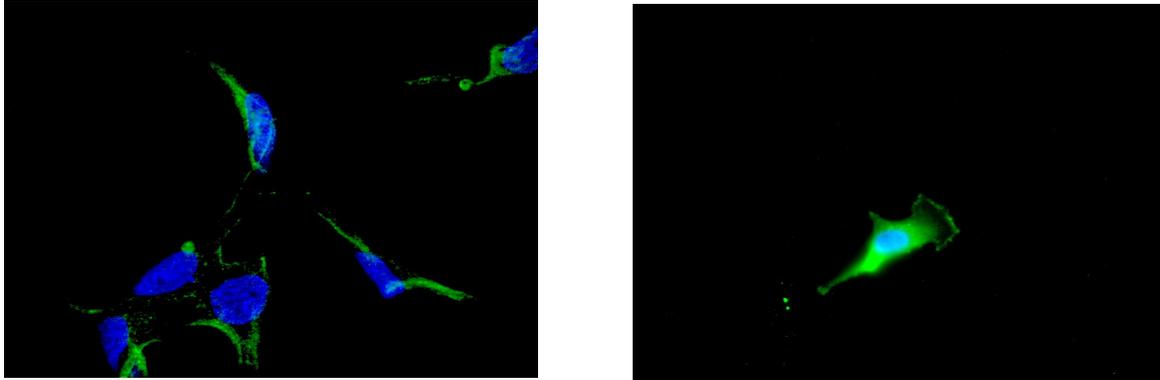


Abb. 31: Prominin 1/CD133 Immunfluoreszenz LN 18:

Konfokale Fluoreszenzaufnahmen nach Durchführung gemäß Punkt 9.3.2.

10.8 Nachweis einer Side Population mittels FACS-Analyse

Das Prinzip der Durchflusszytometrie bzw. der fluoreszenzgestützten Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting als geschützter Handelsmarkenbegriff der Firma Becton Dickinson, NJ, USA) nutzt die Eigenschaften von Zellen, optische Signale nach Passage eines Laserstrahles emittieren zu können. Dabei werden Zellen einer Einzelzellsuspension über eine Kapillare und eine Sensoreinheit einem Laserstrahl ausgesetzt, wobei die Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe und Granularität den durchgelenkten Lichtstrahl unterschiedlich streuen. Diese Streuung wird detektiert und dient zur Unterscheidung der Zellen. Eine weitreichendere Unterscheidung verschiedener Zellen ist durch die Anreicherung bzw. Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorophore) bzw. fluoreszierenden Antikörpern möglich. Fluorophore binden an zellspezifische Elemente (Oberflächenproteine oder DNA) und lassen sich über Laserstrahlen spezifischer Wellenlängen anregen, Licht charakteristischer Wellenlängen zu emittieren. Dies dient ebenfalls zur Detektion und kann darüber hinaus zur Sortierung der einzelnen Zellen verwendet werden (Homepage Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Institut für Funktionelle

Genomforschung, 2008 / HelmholtzZentrum München, Institut für Molekulare Immunologie, Zellsortierservice, 2007).

Side Population Zellen entfernen Hoechst 33342 aktiv aus dem Zytoplasma. Dies ergibt eine geringere Emmission für Hoechst 33342 im Vergleich zu Non-Side Population Zellen, deren kerngebundene Konzentration von Hoechst 33342 höher ausfällt.

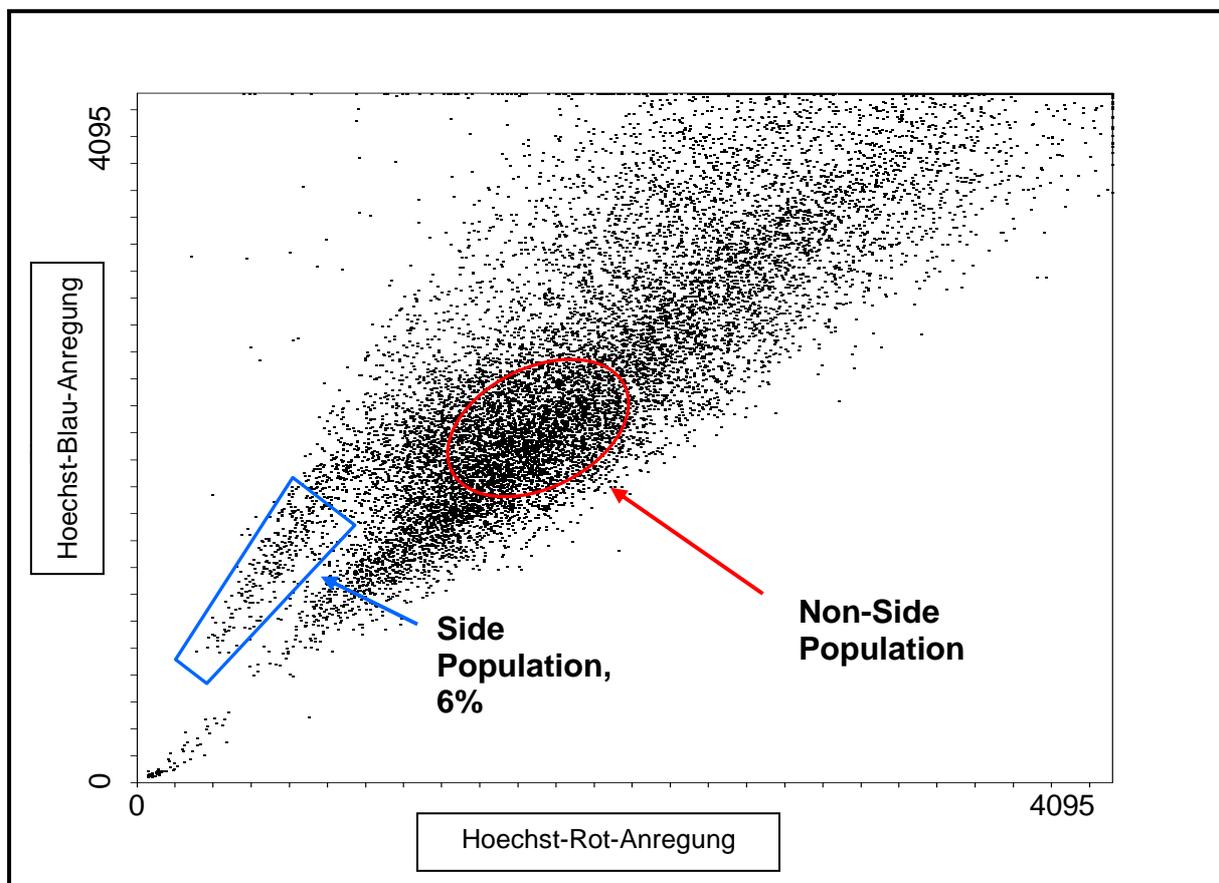


Abb. 32: Zweiparametrische FACS-Analyse der über Hoechst 33342 markierten LN 18 Gliomzelllinie. Die Anregung erfolgte über Argon-Laser im Ultraviolett-Wellenlängenbereich von 351+364nm, die Emissionsfluoreszenz wurde über Hoechst-Rot (X-Achse) und Hoechst-Blau (Y-Achse) in den Bereichen 670nm bzw. 480nm Wellenlängen mit BP-Filtern (Breitpass) detektiert. Die initial zugeführte Zellmenge lag bei ca. 1×10^6 Zellen der heterogenen Zellsuspension, analysiert und gesortet wurde ein Anteil von ca. 6×10^5 respektive 6% Zellen der Side Population, die als blau umrandete Fraktion dargestellt ist. ABC-Transporter ließen sich durch Verapamil inhibieren. Dies führte in der Analyse zum

Verschwinden der Side Population. Avitale Zellen (ca. 11%) wurden mit Propidiumjodid (1µg/ml) gegenmarkiert und aus der Analyse ausgeschlossen.

10.9 Colony formation assay Side Population LN 18

Ergebnisse Side Population LN 18:

Eine Bestrahlung verminderte die klonogene Überlebensrate der FCS-kultivierten LN 18 Side Population um 63%, der N2-kultivierten Side Population um 99%.

LN 18	Anzahl Kolonien unbestrahlt	Anzahl Kolonien bestrahlt	Anzahl Kolonien unbestrahlt in %	Anzahl Kolonien bestrahlt in %
SP FCS-Medium	2275	835	100	37
SP N2-Medium	1820	181	100	1

Tab. 16: Ergebnisse des colony assays zur Side Population der Zelllinie LN 18

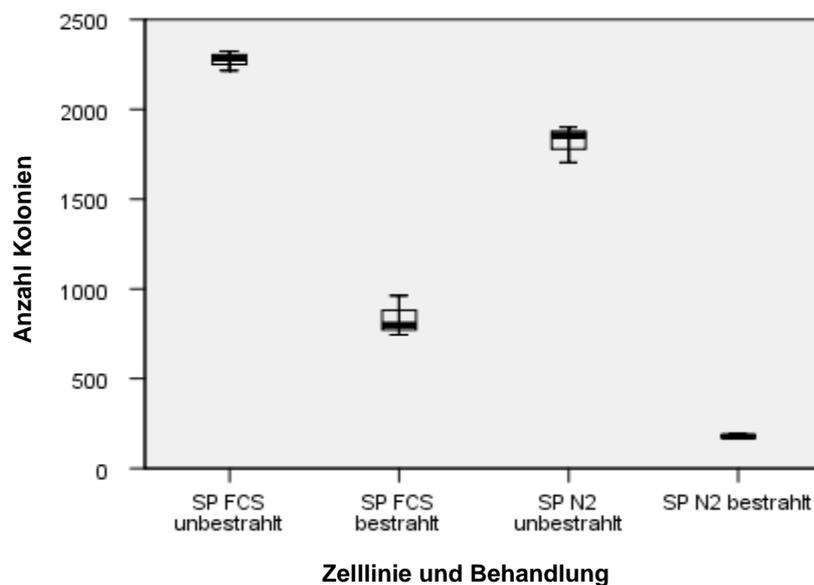


Abb. 33: Grafische Darstellung des colony assays der LN 18 Side Population:

Die Abbildung enthält Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima. Dargestellt ist die Kolonienzählung ohne Bestrahlung und nach Radiatio mit 6Gy für die Fraktionen unter Standard- (FCS-Medium) und unter Neurobasalkultivierung (N2-Medium).

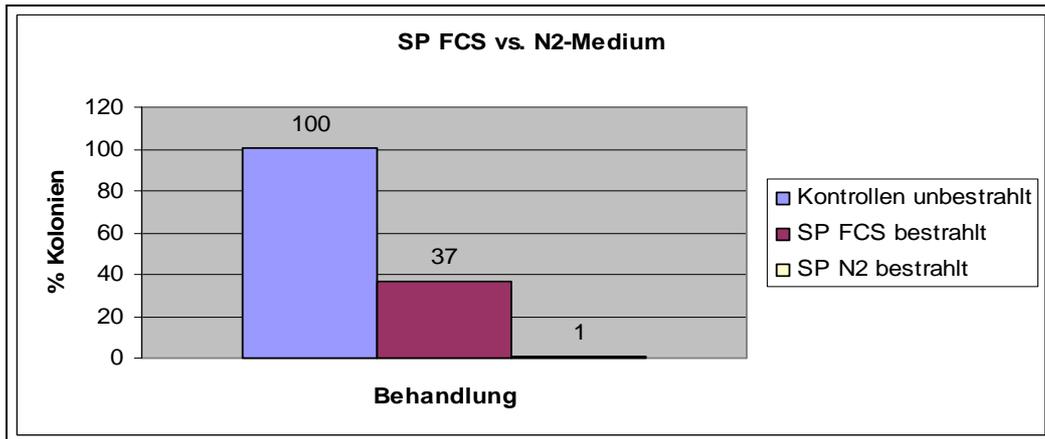


Abb. 34: Grafische Darstellung der prozentualen Ergebnisse zur LN 18 Side Population: Die Abbildung veranschaulicht den Effekt der Bestrahlung unter FCS- oder N2-Kultivierung.

11.0 Zellvitalitätsassay Side Population LN 18

Die unter Standardbedingungen kultivierten Fraktionen zeigten bei 24h und 48h bestrahlt wie unbestrahlt höhere Messwerte als die entsprechenden, mit Neurobasalmedium kultivierten Fraktionen.

Bei 72h zeigten sich sowohl bei der bestrahlten als auch unbestrahlten, FCS-kultivierten Fraktion niedrigere Messwerte als bei 24h und für die bestrahlte Gruppe niedriger als für die bestrahlte Fraktion unter N2-Medium.

Im Vergleich der N2-kultivierten Fraktionen war eine bis 72h zunehmend höhere Zellvitalität der bestrahlten Gruppe messbar, die Zunahme der Zellvitalität der unbestrahlten N2-Fraktion war geringer, der Verlauf flacher.

SP (FCS-Medium)	unbestrahlt	bestrahlt
24h	0,136 (0,004)	0,129 (0,003)
48h	0,203 (0,007)	0,193 (0,007)
72h	0,174 (0,003)	0,156 (0,006)
SP (N2-Medium)		
24h	0,095 (0,002)	0,089 (0,003)
48h	0,134 (0,003)	0,141 (0,006)
72h	0,172 (0,004)	0,199 (0,006)

Tab. 17: Extinktionsmesswerte der LN 18 Side Population (FCS vs. N2-Medium)

Standardabweichungen in Klammern.

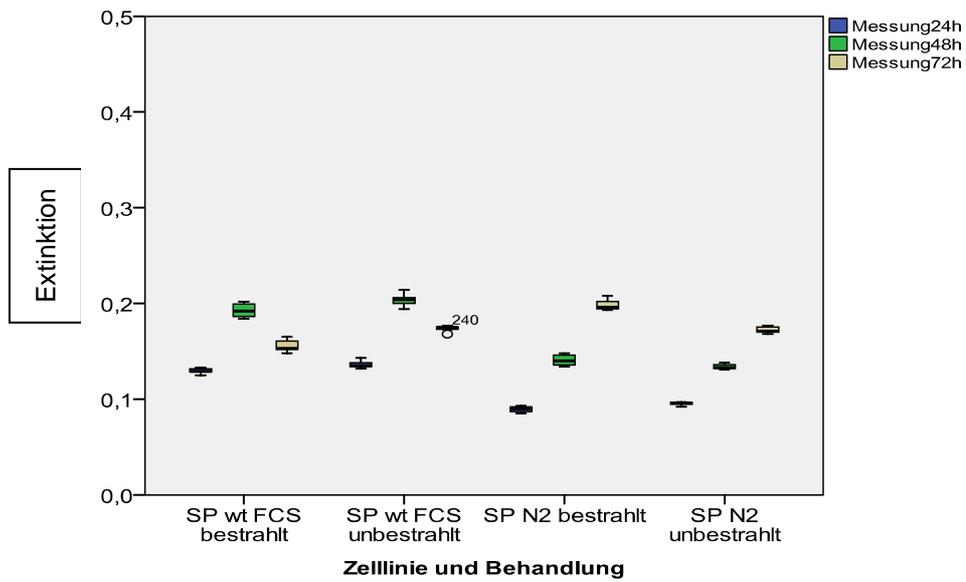


Abb. 35: Grafische Darstellung der Messwerte aus Tab. 21: Boxplots mit Median, 25% und 75%-Quartilen sowie Minima und Maxima. Einzelwerte sind Ausreißer.

12. Diskussion

12.1 Einleitung

Glioblastome sind mit mehr als 60% die häufigsten malignen Neoplasien des Zentralen Nervensystems (Ohgaki und Kleihues, 2007) und stellen ungeachtet aller bisherigen Bemühungen in Forschung und Klinik eine verheerende Diagnose für Betroffene dar. Die Tumorlokalität, das hochinfiltrative und diffuse Wachstum sowie die Behandlungsresistenz und Rezidivfreudigkeit schränken die Therapiemöglichkeiten stark ein und limitieren das Überleben der Patienten (Stummer et al., 2008 / Pichlmeier et al., 2008 / Tait et al., 2007 / Lacroix et al. 2001).

Obwohl die genaue Ursache der malignen Entartung nach wie vor ungeklärt ist, konnte neben genetischen und epigenetischen Faktoren wie beispielsweise Mutationen im Bereich des TP53-Tumorsuppressorgens (Tohma et al., 1998) eine wesentliche Beteiligung veränderter, intrazellulärer Signaltransduktionswege für das pathobiologische Verhalten ermittelt werden. So finden sich in ca. 40 bis 50% aller Glioblastome EGF-Rezeptor-Genamplifikationen, die mit einer veränderten Regulation der nachgeschalteten Signalkaskaden einhergehen (Schlegel et al., 1994). Einer konstitutiven Aktivierung etwa, beispielsweise des Proteinkinase B/Akt-Signalweges, kommt eine wesentliche Bedeutung in der Tumorgenese bei Gliomen zu (Sonoda et al., 2001).

Darüber hinaus wird die in den letzten Jahren zunehmend diskutierte Hypothese der Tumorstammzellen und ihrer hervorstechenden Eigenschaften für die Tumorbilogie immer stärker in die Entstehung und Etablierung der Glioblastome miteinbezogen (Singh et al., 2003). Tumorstammzellen wurden in vielen Tumoren unterschiedlichster Gewebe identifiziert und ihre besonderen Fähigkeiten scheinen ein zentrales Element des typischen Verhaltens der Glioblastome zu sein. So wird beispielsweise eine erhöhte Strahlenresistenz einem gesteigerten DNA-Reparaturmechanismus der Tumorstammzellen zugeschrieben (Bao et al., 2006).

Angesichts der bisherigen Erfahrungen scheint es erforderlich, neue Behandlungsstrategien auf der Grundlage eines eingehenderen, molekularbiologischen Verständnisses dieser Tumorentität zu erschließen.

12.2 Beurteilung der Methodik

In der vorliegenden Arbeit sollte neben der proteinbiochemischen Charakterisierung glialer humaner Tumorzellen eine funktionelle Untersuchung von Signalwegen durchgeführt werden. Als experimentelle in-vitro-Testverfahren wurden daher etablierte zellbiologische Methoden wie der colony formation assay, der Zellvitalitätsassay und die Western Blot Analyse gewählt (Fu et al., 2009 / Berridge et al., 2005 / Renart et al., 1979 / McAllister und Reed, 1968). Diese In-vitro-Modelle sind artifizieller Natur, die Verhältnisse werden einer vereinfachten Betrachtung unterzogen und die Ergebnisse sind daher überwiegend in zellbiologischem Kontext zu interpretieren. Dennoch sind sie gut etablierte strahlenbiologische Untersuchungsmethoden sowohl für kurz- als auch für langfristige Zeiträume, ihre Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit machen sie einfach zu handhaben und sie besitzen hohe Sensitivität und Spezifität im Rahmen eines relativ kostengünstigen Versuchsdesigns. Desweiteren kann die intrinsische, durch das Tiermodell determinierte Störanfälligkeit von in-vivo-Methoden teilweise durch die Zellkultur umgangen werden und liefert stabile Versuchsbedingungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumorzellen mit experimenteller Röntgenstrahlung von 6Gy Gesamtdosis und in Kombination mit den Chemoinhibitoren LY294002, Rapamycin sowie Tyrphostin AG1478 behandelt und die überlebende Zellzahl in Relation gesetzt zur ursprünglich ausplattierten Zellzahl, die als Kolonien (Kolonie: ≥ 25 Zellen) manuell lichtmikroskopisch ausgezählt wurden.

Die applizierte Dosis der Bestrahlung orientierte sich an Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Gross et al., 2005), in denen sich zwischen 4Gy und 8Gy ein optimales Gleichgewicht aus kolonierelevantem Strahleneffekt und verwertbarem, proliferativen Verhalten einstellte. Im klinischen Alltag werden niedrigere Dosen appliziert (etwa 1,8Gy/Tag), dies aber über mehrere Tage und über Zeiträume von mehreren Wochen. Aus technischen und zeitlichen Umständen war das verwendete Versuchsdesign vorgegeben.

Für die jeweilige Dosis der Chemoinhibitoren waren sowohl Vorarbeiten und Erfahrungen der eigenen Arbeitsgruppe als auch die in der Literatur beschriebenen Protokolle maßgeblich (Opel et al., 2008 / Semba et al., 2002 / Hu et al., 2000). Alle eingesetzten Inhibitoren sind Standardsubstanzen zur Beeinflussung der

Signaltransduktion, wobei Rapamycin im klinischen Alltag bei Glioblastomen eingesetzt wird (Faivre et al., 2006).

LY294002 inhibiert die Phosphorylierung der PI3-Kinase und in geringem Umfang der p70S6-Kinase, unbeeinflusst bleibt die MAP-Kinase (Gupta et al., 2001). Rapamycin blockiert die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der p70S6K durch Komplexbildung mit mTOR bzw. Bindung an das FK506-binding-protein-12. Darüber hinaus führt es zu einem G1-Zellzyklus-Arrest (Calbiochem, Akt/PI3-Kinase Signaling, EMD Biosciences, Merck, 2007 / Dancey, 2006 / Law, 2005). Tyrphostin AG1478 dient als kleinmolekularer, intrazellulärer Inhibitor der spezifischen Blockade des EGF-Rezeptors (ErbB1) und scheint eine ausgeprägtere, hemmende Wirkung auf Gliomzellen mit aberranten EGF-Rezeptoren im Vergleich zu Wildtyp-EGFR zu besitzen (Ellis et al., 2006 / Bowers et al., 2001 / Han et al., 1997).

Zur Detektion von Tumorstammzellen in den Gliomzelllinien LN 18, LN 229, G 139 und LN2 308 wurde nach einem mehrstufigen System vorgegangen:

Im ersten Schritt wurden Zellen aller Linien neurobasalen Kultivierungsbedingungen ausgesetzt (N2-Medium/Neurobasalmedium), um hierdurch diejenigen Zellen identifizieren zu können, deren biologisches Verhalten und Differenzierungspotential die Zuordnung zu Stammzeleigenschaften ermöglichte. Die Ausbildung dreidimensionaler, aggregierter Zellkonglomerate sphärischer Form gilt als etablierte Methode zur Identifikation von Stammzellen. Das bedeutet, neurale Stammzellen können sog. Neurosphären bilden, deren Erscheinen spezifisch für sie ist (Yang et al., 2003). Neurosphärenbildung konnte analog zu gesundem Gewebe in Glioblastomen gesehen werden und dient hier ebenso als Erkennungsmerkmal für tumoröse, maligne Stammzellen (Yang et al., 2006).

Da sich lediglich bei LN 18 stabile Neurosphärenkulturen etabliert ließen, erfolgte an ihr exemplarisch die Immunmarkierung auf das Filamentprotein Nestin. Dieses Intermediärfilament wird standardmäßig in der Zellbiologie zum Expressionsnachweis von Stammzellmarkern verwendet (Wiese et al., 2004). In Glioblastomen und glialen bzw. neuroepithelialen Tumoren dient es zur der Identifizierung stammzellartiger Tumorzellen bzw. glialer Tumor-Vorläuferzellen (Mangiola et al., 2007).

Im nächsten Schritt stand die Überprüfung des weiteren Differenzierungspotentials derjenigen Zellen an, die im Neurophärenversuch stabile Konglomerate bildeten. Die Zelllinie LN 18 wurde hierzu auf die Expression von β III-Tubulin untersucht. Zellen, die in der Differenzierungshierarchie bereits in Richtung neuronale Entwicklung weiter ‚fortgeschritten‘ sind, können mit der Markierung auf β III-Tubulin gegenüber nicht-neuronalem Gewebe im adulten Gehirn abgegrenzt werden (Draberova et al., 1998).

Anschließend folgte die Markierung auf den stammzellmarkierenden Oberflächenmarker CD133 mittels Immunfluoreszenz, die für LN 18 positiv war. Die Darstellung der CD133-Expression dient sowohl in gesundem, cerebralen wie auch in maligne transformiertem Hirngewebe als Marker für eine Stammzellcharakteristik und steht in Verbindung mit spezifischen biologischen Stammzeleigenschaften wie unlimitierter Selbsterneuerung, einer erhöhten Behandlungsresistenz (etwa via erhöhter Expression von ABC-Transporter-Systemen) der exprimierenden Zellen sowie mit deren tumorinitiierenden und tumorerhaltenden Eigenschaften (Perez-Castillo et al., 2008 / Singh et al., 2003).

Eine CD133-Markierung gilt zwar seit einigen Jahren als Standardmethode, wird jedoch in der letzten Zeit auch zunehmend kontrovers diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass CD133 positive wie negative Zellen beide tumorinitiierende Eigenschaften aufweisen und damit die eigentlich favorisierte Differenzierbarkeit in sich zusammenfällt (Wang et al., 2008).

In der gleichen Arbeit von 2008 konnten Wang et al. auch zeigen, dass CD133 negative Zellen CD133 exprimierende Zellen initiieren können. Einige weitere Faktoren sprechen gegen die Aussagekraft von CD133, so beispielsweise der Oxygenierungszustand der Zellen oder unspezifische Bindungen der routinemäßig eingesetzten Antikörper. Da eine spezifische Funktion für CD133 bisher nicht zufriedenstellend gezeigt werden konnte (Bidingmaier et al., 2009), der Nachweis einer funktionellen Eigenschaft allerdings zellbiologisch äußerst relevant ist, werden verstärkt andere Expressionsmerkmale für Identifikationstechniken gesucht. Wie CD133 wird gegenwärtig auch die Neurosphärenkultur teilweise kritisch beurteilt. Die Proliferationseigenschaften von neuronalen Stamm- bzw. Vorläuferzellen in der Zellkultur scheint auch durch die Lokalisation des Gewebes im Gehirn beeinflusst zu sein (Smith et al., 2003).

Aufgrund der gelieferten Ergebnisse im Vergleich zu den anderen Gliomzelllinien war die Zelllinie LN 18 der geeignete Kandidat für die FACS-Analyse. Obwohl alle Zelllinien ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert wurden, konnte hier außer bei LN 18 keine Side Population identifiziert werden (Daten nicht dargestellt). LN 18 Glioblastomzellen wurden vor der Durchflusszytometrie in einer Titrationsreihe und angeschlossenem Zellvitalitätstest auf die adäquate Konzentrationsmenge für die Markierung mit Hoechst 33342 ausgetestet, da Hoechst 33342 ab bestimmten Konzentrationen zu zellschädigenden Effekten führt (Shen et al., 2008). Abweichend zum Protokoll nach Goodell et al. von 1996 wurde ein chemokinfreies HBSS-HEPES-Medium für die Untersuchungen im Durchflusssystem verwendet.

12.3 Zusammenfassende Beurteilung der eigenen Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Ansatzpunkte für eine Verbesserung der Strahlentherapie in humanen Gliomen zu identifizieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Zelllinien LN 18, LN 229, G 139 und LN 308 unterschiedlich auf eine experimentelle Radiotherapie ansprechen. Die Unterschiede schienen am ehesten durch Veränderungen in der intrazellulären Signaltransduktion begründet zu sein. Bei gleichzeitiger Blockade der relevanten Signalwege (EGF-Rezeptor, PI3-Kinase und mTOR) mit spezifischen chemischen Inhibitoren fanden sich interessante Veränderungen im Ansprechen auf die experimentelle Strahlentherapie.

Durch die Inhibition des mTOR-abhängigen Signalweges durch Blockade mit Rapamycin konnte eine signifikante Reduktion der Kolonien im *colony formation* assay in den Zelllinien LN 18 und LN 308, nicht jedoch in den anderen beiden Linien beobachtet werden. Dieser Effekt erklärt sich am ehesten über den TP53-Mutationsstatus in LN 18 und LN 308. Eine Zellzyklus-Arretierung ist nur bei funktionell intaktem p53-Status möglich. Der nur temporäre G1-Block durch Rapamycin in LN 18 und LN 308 führt zu einem Anstieg der Zellen in der S-Phase, in der sie vulnerabler für die Strahlentherapie sind (Schlegel und Durchschlag, 2002).

Die Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 zeigte in allen Zelllinien einen zumindest additiven Effekt zur Strahlentherapie. Am deutlichsten fiel das wiederum in

den Zelllinien LN 18 und LN 308 auf, was auf einen dem Rapamycin vergleichbaren Zellzyklus-Effekt hindeutet. Eine Blockade der PI3-Kinase scheint daher im Sinne einer *targeted therapy* ein idealer Angriffspunkt für eine Kombinationstherapie zu sein.

Die häufige Überexpression des EGFR in glialen Tumoren macht dieses Molekül attraktiv für eine gezielte therapeutische Ausschaltung. Die hier untersuchten Zelllinien zeigten einen unterschiedlichen EGFR-Status. Die Blockade des EGF-Rezeptors war vergleichsweise mäßig effektiv, was durch Mutationen in nachgeschalteten Signalwegen, v.a. im PTEN-Status, erklärbar war. Einen Ausreißer bildete dabei allerdings die Zelllinie LN 18, die trotz kräftiger EGFR-Expression und intaktem PTEN-Status keine Veränderung zeigte. Interessanterweise wies LN 18 als einzige Linie eine signifikante Zellpopulation mit Stammzell-Eigenschaften auf. Die hier gezeigten Ergebnisse belegen daher, dass eine EGFR-Blockade in BTSC (Brain Tumor Stem Cells) wenig effektiv für eine experimentelle Radiotherapie zu sein scheint.

12.3.1 Bestrahlung

LN 18:

Eine Bestrahlung erbrachte bei LN 18-Zellen die geringste Beeinflussung klonogenen Überlebens unter allen getesteten Zelllinien. Angesichts des charakteristischen Profils der Zelllinie mit ausgeprägter EGFR-Expression, konstitutiver Akt-Aktivierung und mutiertem TP53-Gen entsprechen die Ergebnisse weitestgehend dem Erwartungswert. Ebenfalls denkbar sind über die konstitutive Akt-Aktivierung verstärkte DNA-Reparaturmechanismen, die der zellulären Schädigung entgegenstehen (Golding et al., 2009).

LN 229:

Eine Bestrahlung verminderte die Kolonienanzahl in der Zelllinie LN 229 am effektivsten. Hinsichtlich ihres Profils bestehen sowohl keine EGF-Rezeptor-Überexpression als auch keine aberranten PTEN- und p53-Verhältnisse. Die Ergebnisse decken sich hier gut mit den Erwartungen.

G 139:

Bei der G 139-Linie konnten durch experimentelle Bestrahlung, ähnlich zu LN 18, relativ schwache Effekte gesehen werden. Die Minderung der Kolonienanzahl war ausgeprägter als bei LN 18 und schwächer als bei LN 229 und LN 308. Dies war hinsichtlich des Profils von G 139 im erwarteten Bereich.

LNZ 308:

Die Ergebnisse für LNZ 308 sind angesichts einer konstitutiven Akt-Aktivierung, mutiertem PTEN-Status und deletiertem TP53-Gen nicht einzuordnen. Erwartungsgemäß wäre eine etwa auf dem Niveau von LN 18 oder G 139 liegende Beeinflussung gewesen. Insgesamt lag die Kolonienanzahl nach Bestrahlung jedoch noch gering oberhalb des LN 229-Niveaus. Dies wiederum kann in das vorhandene Profil integriert werden.

12.3.2 Chemoinhibitoren und Bestrahlung in den colony formation assays

LY294002 und PI3-Kinase:

Hier zeigte sich, dass LY294002 in allen Zelllinien zur deutlichsten Beeinflussung der Klonogenität führte und der ausgeprägteste Effekt bei LN 18 und etwas schwächer bei LNZ 308 zu registrieren war. Werden die Profile von LN 18 (vergleiche Tab. 3) und LNZ 308 miteinbezogen, so liegt deren Gemeinsamkeit in einem aberranten p53-Status. G 139 und LN 229 liegen auf vergleichbarem Niveau, wobei beiden ein unverändertes TP53-Gen gemeinsam ist. Durch Blockade der PI3-Kinase wird eines der wichtigsten Elemente der Signaltransduktion geschwächt, denn PI3-Kinase-assoziierte Signaltransduktion kommt eine elementare Rolle für Zellgröße- und Zellüberlebensmechanismen in unterschiedlichsten Tumoren wie auch dem Glioblastom zu (Faivre et al., 2006 / Chen et al., 2005).

In höheren Konzentrationen inhibiert LY294002 darüber hinaus nicht nur die PI3K, sondern auch andere, für die Apoptose relevante Kinasen wie die DNA-PK (DNA-Proteinkinase). Diese Kinase wird durch Strahlenschädigungen der DNA aktiviert und ist an Reparaturmechanismen beteiligt. Fehlt die Funktion der DNA-PK, so treten strahlengeschädigte Zellen nicht in die Apoptose ein (Izzard et al., 1999). Opel et al. wiesen in ihren Untersuchungen von 2008, bei denen ebenfalls LN 18 und LN 229 zum Einsatz kamen, einen Effekt für LY294002 nach, der den Ergebnissen in der

vorgestellten Arbeit ähnlich ist und die Bedeutung der PI3-Kinase für chemotherapeutisch sensitivierte Apoptose unterstreicht.

Ferner ist die Frage naheliegend, inwieweit Mutationen des Ras-Onkogens die Signaltransduktion unter der Wirkung von LY294002 beeinflussen. Gupta et al. demonstrierten 2001, dass LY294002 in Zusammenhang mit Ras-Mutationen zu einer verstärkten Strahlensensibilisierung führt und die Inhibition von mTOR durch Rapamycin nicht den gleichen Effekt hervorruft. Ferner konnten Vasudevan et al. in ihrer Arbeit von 2009 berichten, dass Mutationen in PI3KCA (phosphatidyl inositol 3-kinase catalytic subunit) eine Akt-unabhängige Tumorgenese induzieren können.

Rapamycin und mTOR:

Eine Bestrahlung unter Inhibition von mTOR führte zu ausgeprägteren Effekten in LN 18 und LN 308, die beide über ein verändertes TP53-Gen verfügen. Für LN 229 und G 139 konnte keine relevante Beeinflussung durch Rapamycin und Bestrahlung gezeigt werden, das prozentuale Kolonieverhältnis lag sogar konträr zu den anderen Zelllinien oberhalb des bestrahlten Kontrollniveaus. Im Allgemeinen wird durch Rapamycin ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase induziert (Dancey, 2006). Huang et al. demonstrierten 2001, dass eine durch Rapamycin induzierte Apoptose die Folge einer trotz mTOR-Inhibition fortschreitenden G1-Phase ist und dies durch die Überexpression funktioneller p53-Proteine durch Zellzyklusarrest inhibiert werden kann. Zellen, die aber p53-insuffizient waren, konnten durch Rapamycin in wesentlich verstärktem Maße in die Apoptose gebracht werden. Bestätigt wird diese These auch durch das inverse Ansprechen der p53-intakten Zelllinien G 139 und LN 308. Inwieweit veränderte p53-Varianten unter Bestrahlung in dem hier vorgestellten experimentellen Modell mit einem gestörten Zellzyklusarrest einhergehen (Kastan et al., 1991) oder inwiefern durch TP53-Mutationen die Zellzykluskontrolle insgesamt beeinflusst wird (Tan und Luo, 2009) war jedoch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit.

In PTEN-mutierten G 139-Zellen konnte Rapamycin nur einen schwachen Effekt hervorrufen. Eventuell spielt auch eine alternative Signalkaskade über mTOR-Komplex 2 eine Rolle, die ebenfalls zu Proliferation und Zellwachstum führt und durch Inhibition mittels Rapamycin aktiviert würde (Gulati et al., 2009). Hinzu kommt, dass Rapamycin durch Transaktivierung des EGF-Rezeptors zu einer Verstärkung des ERK-Signalweges führen kann. Dies scheint allerdings zelltypspezifisch zu sein

(Chaturvedi et al., 2009). Eine Hochregulation des Akt-Signalwegs durch mTOR-Blockade wird auch durch einen autokrinen Feedback-Mechanismus vermittelt (O'Reilly et al., 2006).

Tyrphostin AG1478 und EGF-Rezeptor:

Behandlung mit Tyrphostin AG1478 und Bestrahlung blieb hinter den Erwartungen zurück und war am ineffektivsten in der Zelllinie LN 18, die als einzige der untersuchten Gliomlinien einen positiven Nachweis einer Tumorstammzellfraktion erbrachte.

Die Expressionsstärke des EGF-Rezeptors scheint darüber hinaus in Zusammenhang mit stammzellassozierten Merkmalen und Behandlungsresistenzmerkmalen eine prognostische Relevanz für Glioblastompatienten zu haben (Murat et al., 2008). Vichalkovski et al. zeigten 2005, dass eine spezifische EGF-Rezeptor abhängige Blockade in hämatopoetischen Vorläuferzellen zudem zu Proteinkinase C beta-vermitteltem Zellwachstum und Antiapoptose führte.

Unabhängig davon konnten Griffero et al. in einer 2009 vorgestellten Arbeit zur Wirkung einer EGFR-Blockade an verschiedenen Gliomzelllinien höchst unterschiedliche Resultate sehen. Für einzelne Zelllinien war dabei eine massive Resistenz gegenüber EGFR-Inhibition feststellbar, dies wurde von den Autoren aber eher in Zusammenhang mit einem PTEN-Defekt gesehen, der in LN 18 nicht vorliegt. Womöglich trägt aber auch der p53-Defekt zu den Ergebnissen bei LN 18 bei.

12.3.3 Chemoinhibitoren und Bestrahlung in den Zellvitalitätsassays und Western Blot Analysen

Für LN 18 war eine durch alle Inhibitoren supprimierbare Zellvitalität ermittelbar und kombinierte Bestrahlung verstärkte diesen Effekt unwesentlich. Die LN 18-Kontrollen erbrachten, unabhängig von einer Bestrahlung, die höchsten absoluten Messwerte.

LY294002 mit und ohne kombinierte Bestrahlung zeigte in LN 18 den deutlichsten Effekt im Vergleich zu allen anderen Zelllinien. Rapamycin mit und ohne Bestrahlung war verglichen mit LY294002 weniger effektiv und im Vergleich zu allen anderen Zelllinien ebenfalls am ineffektivsten in LN 18-Zellen. Tyrphostin AG1478 mit und

ohne Bestrahlung wies, analog zur Zelllinie LN 229, eine fallende Stoffwechsellendenz auf und war vergleichbar mit der Behandlung unter Rapamycin.

LN 229 zeigte bei den Kontrollen die zweithöchste Zellvitalität hinter LN 18. Das Messwertenniveau für die inhibitorisch behandelten und bestrahlten Zellen lag durchschnittlich gering über dem von LNZ 308 und G 139. LY294002 wies unabhängig von Bestrahlung den schwächsten Effekt im Vergleich zu allen anderen Zelllinien in LN 229 auf. Rapamycin war unabhängig von Bestrahlung vom Effekt stärker als in LN 18 und schwächer als in LNZ 308 und G 139.

G 139-Gliomzellen verhielten sich im Zellvitalitätstest bei allen eingesetzten Inhibitoren ähnlich wie LNZ 308, lediglich die unbestrahlten wie bestrahlten Kontrollen zeigten eine höhere Zellvitalität als bei LNZ 308. Die Behandlung mit Rapamycin war in G 139 und LNZ 308 unabhängig von einer kombinierten Bestrahlung am effektivsten, in G 139 noch deutlicher. 2004 konnte von deGraffenried et al. gezeigt werden, dass Zellen mit konstitutiver Akt-Aktivierung durch Rapamycin für Behandlung mit Chemotherapeutika sensitiviert wurden. Dies müsste allerdings auf andere getestete Zelllinien besser übertragbar sein.

In den Western Blot Analysen spiegelte sich diese kurzfristige Beeinflussung aus den Zellvitalitätsversuchen uneindeutig wider. Im Übrigen waren unterschiedliche Aktivierungen des PI3-Kinase- und MAPK-Signalwegs zu erkennen:

In LN 18 war für alleinige Behandlung mit LY294002, Rapamycin und Tyrphostin AG1478 ein Überwiegen des p-MAPK-Signalkweges gegenüber p-Akt zu erkennen, in LN 229 noch für LY294002 und Rapamycin. Beide Zelllinien sind PTEN-intakt. Diese Ergebnisse decken sich in Teilen mit denen aus der eigenen Arbeitsgruppe und deuten darauf hin, dass ein intaktes PTEN-Protein womöglich Anteil hat an einer Verschiebung des Akt-Signalweges hin zur MAP-Kinase abhängigen Signaltransduktion (Schlegel et al., 2000). Fallende Zellvitalitätswerte, etwa für Tyrphostin AG1478 mit und ohne Bestrahlung, spiegelten sich für LN 18 und LN 229 in einer schwachen Aktivierung (LN 229) und einer kurzfristigen Aktivierung (LN 18) wider.

Für G 139 liegt der wesentliche Unterschied zu LN 18 in umgekehrten Verhältnissen des PTEN- und p53-Status und hier war ein Überwiegen von p-Akt zu erkennen. Alleinige Bestrahlung führte bei LNZ 308 und G 139 zu einer stärkeren Aktivierung von p-Akt, wobei beide Zelllinien PTEN- mutiert sind. Wird dies mit der Literatur verglichen, so können verstärkte Banden von p-Akt auch mit einer gestörten PTEN-Funktion in Zusammenhang stehen (Besson et al., 1999).

Ein Verbindung zwischen den Signaltransduktionswegen über PI3K und MAP-Kinase wurde u.a. von Kaur et al. 2006 über eine Rekrutierung der PI3K durch Ras-GTP (Guanosin-Triphosphat) beschrieben und Kodaki et al. konnten 1994 zeigen, dass der PI3-Kinase-Komplex durch Ras aktiviert werden kann. Die Wechselbeziehung von Ras zur katalytischen p110alpha-Einheit der PI3-Kinase konnte 2007 in einem in-vivo-Mausmodell zu einer Ras- und PI3K-abhängigen Tumorfomation führen (Gupta et al., 2007). In entgegengesetzter Richtung scheint ebenfalls eine Beeinflussung möglich zu sein, denn eine Inhibition von mTOR führt zu einer über eine negative Feedback-Regulation erhöhten ERK/MAPK-Signalverstärkung und die kombinierte Blockade beider Signalwege zeigte ausgeprägte, antitumoröse Eigenschaften (Grant, 2008).

Rapamycin führte in den PTEN-mutierten Linien LNZ 308 und G 139 unabhängig von Bestrahlung zu einer Aktivierung von p-Akt. Hier liegt bei der Behandlung mit Rapamycin eventuell ein Effekt über einen negativ-regulierten Feedback-Mechanismus vor, der die PI3-Kinase vermittelte Akt-Phosphorylierung antreibt (O'Reilly et al., 2006). Wie Chaturvedi et al. 2009 demonstrierten, ist eine durch Rapamycin vermittelte Induktion des Zellüberlebens auch durch transaktivierende Prozesse des EGF-Rezeptors möglich, hier allerdings überwiegend durch ERK 1/2-Signaltransduktion (MAP-Kinase). Der MAP-Kinase-Signalweg kann wiederum über eine stressaktivierte, ERK-hemmende Wirkung durch c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)/p38 MAP-Kinase gegensinnig reguliert werden (Junttila et al., 2008).

Die ausgeprägte Zellvitalität unter LY294002 und Tyrphostin AG1478 in LNZ 308 und G 139, bei beiden jeweils unabhängig von einer kombinierten Bestrahlung, und die niedrigen Zellvitalitätsmesswerte für Rapamycin mit und ohne Bestrahlung in beiden Zelllinien standen in umgekehrtem Verhältnis zu den Aktivierungen in den Western Blot Analysen.

12.3.4 Tumorstammzellen

LN 18 Gliomzellen waren unter den getesteten Zelllinien die einzige mit Nachweis einer Side Population.

Wie sich im experimentellen Verlauf zeigte, konnte jedoch die Non-Side Population nicht mittel- bis langfristig kultiviert werden. Zu diskutieren ist, ob die Toxizität von Hoechst 33342 eine entscheidende Rolle hierfür spielte. Obgleich in einem separaten Zellvitalitätsassay mit titrierten Konzentrationen von Hoechst 33342 ein toxischer Effekt auf ein Mindestmaß reduziert werden konnte, käme die FACS-Analyse im Anschluss wohl maßgeblich für eine im Endeffekt hervorgerufene Zellschädigung im Sinne eines additiven Effekts und damit für den Verlust der Non-Side Population ursächlich in Betracht. Dass Hoechst 33342 schädliche Effekte beispielsweise auf gliale Tumorzellen bzw. Hirntumorstammzellen hat konnte u.a. von Shen et al. 2008 an der C6-Gliomzelllinie gezeigt werden.

Als Kontrollgruppe wurde folglich die gesortete Side Population unter Standardbedingungen gehalten und die unter N2-Medium inkubierte Side Population hiergegen verglichen.

Die Ergebnisse des Zellvitalitätsassays zeigten eine erhöhte Radiosensitivität bis 48h, bei 72h eine erhöhte Radioresistenz. In den colony formation assays war langfristig eine erhöhte Radiosensitivität erkennbar.

Die Ergebnisse des colony formation assay stehen überwiegend im Widerspruch zur gegenwärtigen Literatur, die Ergebnisse des Zellvitalitätsassays fügen sich hingegen in die Literatur ein. Unabhängig davon aber waren bereits von Taghian et al. 1992 21 Gliomzelllinien in ihrem Verhalten auf Bestrahlung untersucht worden, wobei einige Zelllinien eine erhöhte Radiosensitivität aufwiesen. In einer von MCCord et al. 2009 veröffentlichten Arbeit wurde die Radioresistenz von CD133-positiven, glialen Tumorstammzellen in Frage gestellt. Die Autoren postulierten, dass die bisherigen Ergebnisse zur Strahlenresistenz bei Tumorstammzellen wesentlich durch die verwendeten Tumormodelle zu Stande kämen.

Wie Rasper et al. aus der Arbeitsgruppe Schlegel 2009 zeigen konnten (Publikation gegenwärtig im Reviewverfahren) sind in N2 kultivierte LN 18-Zellen lediglich für

einen Zeitraum von ca. zwei bis drei Tagen mit stammzellcharakterisierenden Eigenschaften assoziiert, danach überwiegt eine neuronale Merkmalsausprägung.

Die Side Population wurde unter Bedingungen einer FCS-Kultivierung gewonnen, die weitere Kultivierung erfolgte sowohl in N2- als auch in FCS-Medium. Unter Standardbedingungen ist durch asymmetrische Teilungsvorgänge keine langfristig stabile Stammzellanreicherung möglich. Genauso wenig allerdings unter dem Selektionsdruck einer N2-Kultivierung, die neuronale Differenzierungsvorgänge zur Folge hatte, wie sich anhand der Neurosphärenkultur und dem Nachweis von β III-Tubulin zeigte (Singh et al., 2003). Allerdings ist hierdurch anzunehmen, dass auch die verminderte Proliferation differenzierterer Zellen zum Ergebnis im colony formation assay beiträgt.

Werden diese Punkte in die gefundenen Ergebnisse implementiert, so können die Ergebnisse kurzfristiger Zeiträume aus dem Zellvitalitätstest den noch stammzellnahen Charakter der Gliomzellen mit erhöhter Behandlungsresistenz erfasst haben und die Ergebnisse im colony formation assay die Folge einer Kombination aus eingeschränkter Proliferation und vorübergehend erhöhter Behandlungssensitivität sein.

13. Zusammenfassung

Die klinischen Erfahrungen und die Prognose von Glioblastomen sind ungeachtet neuer Behandlungsstrategien verheerend. Unter Ausschöpfung gängiger Radiochemotherapie und operativer Maßnahmen liegen die 2-Jahres-Überlebensrate bei ca. 25% und das mediane Überleben bei ca. 14 Monaten (Stupp et al., 2009 / Lefranc et al., 2009). Dies wird einerseits auf eine veränderte intrazelluläre Signaltransduktion als andererseits auf die Existenz einer Tumorstammzellpopulation in glialen Tumoren zurückgeführt.

Für Störungen der intrazellulären Signaltransduktion konnten u.a. genetische Veränderungen wie TP53- oder PTEN-Mutationen als auch EGF-Rezeptor-Genamplifikationen ausgemacht werden (Ohgaki und Kleihues, 2007). Der EGF-Rezeptor/PI3-Kinase/Proteinkinase B und mTOR-Signalweg als auch der MAP-

Kinase-Signalpfad sind für anti-apoptotische Mechanismen und damit für die Therapieresistenz von malignen Gliomen wesentlich verantwortlich (Huang et al., 2009 / Faivre et al., 2006).

In Hirntumoren bzw. in glialen Tumoren konnte außerdem eine Subpopulation von Tumorstammzellen identifiziert werden (Qiang et al., 2009 / Singh et al., 2003), die durch herkömmliche Therapien schlecht erreicht werden und damit die Rezidiventstehung und die infauste Prognose maßgeblich fördern (Murat et al., 2008). Neue Behandlungsstrategien richten sich daher in den letzten Jahren gezielt gegen Strukturen der intrazellulären Signaltransduktion, beispielsweise als sog. ‚targeted therapy‘ durch z.B. monoklonale Antikörper (z.B. Iressa[®]), um proliferative und anti-apoptotische Signalwege besser ausschalten zu können (Zwick et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte an vier Gliomzelllinien mit unterschiedlichen Expressionsmustern des EGF-Rezeptors, des p53- und des PTEN-Proteins sowie der Proteinkinase B/Akt die funktionelle Regulation des PI3-Kinase/Akt/mTOR- und des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges nach experimenteller Bestrahlung untersucht werden. Ziel war es, neue Einblicke in die Möglichkeiten der Blockade proliferativer und anti-apoptotischer Signalwege unter Bestrahlungsbedingungen zu bekommen, um hierüber eine Therapie optimieren zu können

Die Blockade der PI3-Kinase durch LY294002 wurde als effektivste Angriffsmöglichkeit für eine Radiochemotherapie identifiziert. Am deutlichsten in Zelllinien mit verändertem p53-Status. Der EGF-Rezeptor und mammalian Target-of-Rapamycin sind prinzipiell ebenfalls effektive Ziele für eine Behandlung, allerdings lagen hier größere Schwankungen vor und die Resultate blieben partiell hinter den Erwartungen zurück.

Durch die PI3-Kinase wird die Bedeutung der durch sie vermittelten Signale für die Tumorgenese des Glioblastoms unterstrichen (Rajasekhar et al., 2003 / Holland et al., 2000). Die PI3-Kinase/Akt-Signaltransduktion trägt zu Überlebensmechanismen, Tumorstammzellen, Tumorstammzellen und der Ausprägung astrozytärer Merkmale in Glioblastomen bei (Hu et al., 2005 / Rajasekhar et al., 2003) und darüber hinaus beeinflusst der PI3K/Akt-Signalweg das spezifische Verhalten glialer Tumorstammzellen (Bleau et al., 2009), wie sie in der Zelllinie LN 18 identifiziert werden konnten. Die kombinierte

Blockade der PI3-Kinase und der ‚downstream‘-Proteine wie etwa mTOR könnte somit zu einem optimierten Therapiansprechen beitragen (Fan et al., 2006), wobei allein die Akt-spezifische Inhibition, im Speziellen bei glialen Tumorstammzellen, eine Behandlungsverbesserung zeigt (LoPiccolo, 2008 / Eyler et al., 2008).

Die Behandlung mit Rapamycin und damit Inhibition von mTOR erwies sich als abhängig von p53. Lediglich p53-mutierte Zelllinien sprachen auf Rapamycin suffizient an, wohingegen dies für Zelllinien mit Wildtyp-p53 nicht gezeigt werden konnte.

Durch die Blockade des EGF-Rezeptors durch Tyrphostin AG1478 und kombinierte Bestrahlung waren nicht erwartungsgemäße Ergebnisse erzielt worden, da der Effekt zu schwach ausfiel. Dies war überraschenderweise in LN 18 am deutlichsten, aus der in den weiteren Experimenten als einzige Zelllinie eine Side Population gewonnen werden konnte. Unabhängig davon war ein unterschiedliches Ansprechen auf EGFR-Inhibition auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet worden (Griffero et al., 2009).

Eine erwartete Strahlenresistenz der Side Population in LN 18 konnte nur partiell gezeigt werden. Dies kann eventuell auf testspezifische Eigenheiten zurückgeführt werden. Wie dargestellt wurde, kommt hier einem zeitlichen Aspekt auch eine besondere Bedeutung zu und die Zeitpunkte sowohl der Behandlung als auch der Analyse beeinflussen das Resultat. Es konnte auch demonstriert werden, dass die Testverfahren zur Identifikation einer Radiosensitivität von Tumorstammzellen optimierbar sind. Ein Ziel könnte sein, eine verbesserte spezifischere Anreicherung von Tumorstammzellen zu gewährleisten. Hierdurch wären genauere Untersuchungen kurzer Zeiträume möglich, die einen nicht unerheblichen Anteil an den Resultaten haben.

13.1 Klinische Bedeutung und Ausblick

Im klinischen Alltag haben die diskutierten Punkte im Rahmen der sog. ‚targeted therapy‘ längst Einzug gehalten. Die wichtigsten Zielstrukturen sind nach wie vor der EGF-Rezeptor und die beiden Signalwege über PI3-Kinase/Akt/mTor/p70S6-Kinase

und Raf/Ras/MEK/ERK/MAP-Kinase. Neben Störungen, die Kinasen betreffen, sind Veränderungen von Kontrollproteinen (PTEN/p53), Feedback-Regulationsmechanismen (mTOR/Insulinrezeptor) oder Mutationen (beispielsweise Ras) für Signaltransduktionsprozesse von Bedeutung (Huang et al., 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass eine genaue, funktionelle und multifaktorielle Tumorcharakterisierung essentiell sein dürfte, um über das Verständnis der molekularbiologischen Funktionen glialer Tumoren einen weiteren Schritt zur adäquaten Behandlung gehen zu können.

Mawrin et al. konnten 2003 eine Korrelation zwischen der MAP-Kinase-Aktivität unter einem überexprimierten EGF-Rezeptor und einer schlechteren Prognose für Glioblastompatienten erkennen, wobei die Überexpression alleine bereits mit einer negativeren Prognose assoziiert ist (Bondy et al., 2008). Ebenso steht der Akt-vermittelte Signalweg mit einer Prognosekorrelation in Verbindung (Pelloski et al., 2006). Für neue Behandlungsstrategien könnten sich somit kombinierte Blockaden mehrerer Signalwege, die bei einer ‚einzelnen‘ Inhibition sonst alternativ aktiviert wären, sinnvoll auf die Prognose auswirken. Kombinierte, auf multiplen Ebenen gleichzeitig angreifende Therapien könnten zukünftig neue Behandlungsstrategien eröffnen und die bisherigen ergänzen.

Desweiteren könnte die vorgestellte Arbeit einen Beitrag liefern, die Rolle der Tumorstammzellen für das neuroonkologische Verständnis zu unterstützen. Der Wissensstand um Tumorstammzellen wird beständig erweitert. Ein zusammenfassender Überblick über die Rolle und Evidenz der Tumorstammzellen für die Pathobiologie des Glioblastoms und dessen Behandlung wurde beispielsweise von Fan et al. in 2007 publiziert.

Aufbauend auf den bisherigen Erfahrungen zur ‚targeted therapy‘ wäre für zukünftige Behandlungsstrategien ein erweitertes Konzept denkbar. Die bloße Inhibition relevanter Strukturen der Signaltransduktion könnte als ein zu schlichter Eingriff in die zelluläre Maschinerie begriffen werden. Ein optimiertes Konzept würde daher regulative Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion gezielter zu modulieren versuchen.

14. Literaturverzeichnis

Asklund T, Appelskog IB, Ammerpohl O, Langmoen IA, Dilber MS, Aints A, Ekström TJ, Almqvist PM, Gap junction-mediated bystander effect in primary cultures of human malignant gliomas with recombinant expression of the HSVtk gene, *Exp Cell Res.*, Apr 1; 284(2): 185-95, 2003.

Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, Nicolin A, mTOR: a protein kinase switching between life and death, *Pharmacol Res.*, Dec; 50(6): 545-9, 2004.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN, Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature.*, Dec 7; 444 (7120): 756-60, 2006.

Baumann M, Krause M, Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results, *Radiother Oncol.*, Sep; 72 (3): 257-66, 2004.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnol Annu Rev.*;11: 127-52, 2005.

Besson A, Robbins SM, Yong VW, PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis, *Eur J Biochem.*, Aug;263 (3): 605-11, 1999.

Bidlingmaier S, Zhu X, Liu B, The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells, *J Mol Med.*, Sep; 86 (9): 1025-32, 2008.

Bleau AM, Hambardzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, Holland EC, PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells, *Cell Stem Cell.*, Mar 6;4 (3): 226-35, 2009.

Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, Kruchko C, McCarthy BJ, Rajaraman P, Schwartzbaum JA, Sadetzki S, Schlehofer B, Tihan T, Wiemels JL, Wrensch M, Buffler PA; Brain Tumor Epidemiology Consortium, Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium, *Cancer.*, Oct 1; 113 (7 Suppl): 1953-68, 2008.

Bonnet D, Dick JE, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nat Med.*, Jul; 3 (7): 730-7, 1997.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B, Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers, *Nature.*, May 28-Jun 3; 327 (6120): 293-7, 1987.

Bowers G, Reardon D, Hewitt T, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, Lammering G, Amir C, Schmidt-Ullrich RK, The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells, *Oncogene.*, Mar 15; 20 (11): 1388-97, 2001.

Burnet NG, Lynch AG, Jefferies SJ, Price SJ, Jones PH, Antoun NM, Xuereb JH, Pohl U, High grade glioma: imaging combined with pathological grade defines management and predicts prognosis, *Radiother Oncol*, Dec; 85 (3): 371-8, 2007.

Calbiochem, Akt/PI 3-Kinase Signaling in Cell Death and Cell Survival, Second Edition, EMD Biosciences, Merck, 2007.

Cantley LC, Neel BG, New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Apr 13; 96 (8): 4240-5, 1999.

Cell Signaling Technology, <http://www.cellsignal.com/>, 2009.

Chaturvedi D, Gao X, Cohen MS, Taunton J, Patel TB, Rapamycin induces transactivation of the EGFR and increases cell survival, *Oncogene.*, Mar 5; 28 (9): 1187-96, 2009.

Chen YL, Law PY, Loh HH, Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy, *Curr Med Chem Anticancer Agents.*, Nov; 5 (6): 575-89, 2005.

Cohen S, Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal, *J Biol Chem.*, May; 237: 1555-62, 1962.

Cohnheim J, *Path Anat Physiol Klin Med.* 40: 1-79, 1867.

Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM, Serine/threonine protein kinases and apoptosis, *Exp Cell Res.*, Apr 10; 256 (1): 34-41, 2000.

Crowe DL, Parsa B, Sinha UK, Relationships between stem cells and cancer stem cells, *Histol Histopathol.*, Apr 19; (2): 505-9, 2004.

Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U, Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors, *Cancer Res.* 1992 Oct 1; 52 (19): 5334-41, 1992.

Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U, Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments, *J Cell Sci.* 1992 Oct;103 (Pt 2): 589-97, 1992.

Damberg R, Kidson C, Differential radiosensitivity of mouse embryonic neurons and glia in cell culture, *J Neuropathol Exp Neurol.*, May; 36 (3): 576-85, 1977.

Dancey JE, Therapeutic targets: MTOR and related pathways, *Cancer Biol Ther.*, Sep; 5 (9): 1065-73, 2006.

Dean M, The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily, Human Genetics Section, Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute-Frederick, Created: November 18, 2002.

deGraffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, Donzis EJ, Middleton AK, Silva JM, Roth RA, Hidalgo M, Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity, *Clin Cancer Res.*, Dec 1; 10 (23): 8059-67, 2004.

Dráberová E, Lukás Z, Ivanyi D, Viklický V, Dráber P, Expression of class III beta-tubulin in normal and neoplastic human tissues, *Histochem Cell Biol.*, Mar; 109 (3): 231-9, 1998.

Dresemann G, Weller M, Rosenthal MA, Wedding U, Wagner W, Engel E, Heinrich B, Mayer-Steinacker R, Karup-Hansen A, Fluge O, Nowak A, Mehdorn M, Schleyer E, Krex D, Olver IN, Steinbach JP, Hosius C, Sieder C, Sorenson G, Parker R, Nikolova Z, Imatinib in combination with hydroxyurea versus hydroxyurea alone as oral therapy in patients with progressive pretreated glioblastoma resistant to standard dose temozolomide, *J Neurooncol.*, Aug 18, 2009.

Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, James CD, Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification, *Oncogene.*, Aug; 9 (8): 2313-20, 1994.

Ellis AG, Doherty MM, Walker F, Weinstock J, Nerrie M, Vitali A, Murphy R, Johns TG, Scott AM, Levitzki A, McLachlan G, Webster LK, Burgess AW, Nice EC, Preclinical analysis of the anilinoquinazoline AG1478, a specific small molecule inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase, *Biochem Pharmacol.*, May 14; 71 (10): 1422-34, 2006.

Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN, Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition, *Stem Cells.* 2008 Dec; 26 (12): 3027-36, 2008.

Faivre S, Kroemer G, Raymond E, Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents, *Nat Rev Drug Discov.*, Aug;5 (8): 671-88, 2006.

Faivre S, Djelloul S, Raymond E, New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors, *Semin Oncol.* Aug; 33 (4): 407-20, 2006.

Fan X, Salford LG, Widegren B, Glioma stem cells: evidence and limitation, *Semin Cancer Biol.*, Jun; 17 (3): 214-8, 2007.

Fargeas CA, Corbeil D, Huttner WB, AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature, *Stem Cells*; 21 (4): 506-8, 2003.

Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA, Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase, *J Biol Chem.*, Sep 24; 279 (39): 41189-96, 2004.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J, Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E, *Genes Dev.*, Jun 15; 16 (12): 1472-87, 2002.

Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chinè S, Lucchi M, Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR, Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G, Ciardiello F, Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival, *Clin Cancer Res.*, Jan; 4 (1): 241-9, 1998.

Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD, Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas, *Cancer Res.*, Mar 1; 60 (5): 1383-7, 2000.

Fu J, Liu ZG, Liu XM, Chen FR, Shi HL, Pangjessie CS, Ng HK, Chen ZP, Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy, *Chin Med J (Engl.)*, Jun 5; 122 (11): 1255-9, 2009.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK, Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment, *Genes Dev.*, Nov 1; 21 (21): 2683-710, 2007.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A, Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma, *Cancer Res.*, Oct 1;64 (19): 7011-21, 2004.

Gan HK, Kaye AH, Luwor RB, The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme, *J Clin Neurosci.*, Jun;16 (6): 748-54, 2009.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC, Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo, *J Exp Med.*, Apr 1; 183 (4): 1797-806, 1996.

Golding SE, Morgan RN, Adams BR, Hawkins AJ, Povirk LF, Valerie K, Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells, *Cancer Biol Ther.*, Apr; 8 (8): 730-8, 2009.

Grandis JR, Zeng Q, Drenning SD, Tweardy DJ, Normalization of EGFR mRNA levels following restoration of wild-type p53 in a head and neck squamous cell carcinoma cell line, *Int J Oncol.*, Aug; 13 (2): 375-8, 1998.

Grant S, Cotargeting survival signaling pathways in cancer, *J Clin Invest.*, Sep; 118 (9): 3003-6, 2008.

Griffero F, Daga A, Marubbi D, Capra MC, Melotti A, Pattarozzi A, Gatti M, Bajetto A, Porcile C, Barbieri F, Favoni RE, Lo Casto M, Zona G, Spaziante R, Florio T, Corte G, Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors, *J Biol Chem.*, Mar 13; 284 (11): 7138-48, 2009.

Grinspan JB, Stern JL, Franceschini B, Pleasure D, Trophic effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on differentiated oligodendroglia: a mechanism for regeneration of the oligodendroglial lineage, *J Neurosci Res.*, Dec 15; 36 (6): 672-80, 1993.

Grinspan JB, Reeves MF, Coulaloglou MJ, Nathanson D, Pleasure D, Re-entry into the cell cycle is required for bFGF-induced oligodendroglial dedifferentiation and survival, *J Neurosci Res.*, Nov 15; 46 (4): 456-64, 1996.

Gross MW, Kraus A, Nashwan K, Mennel HD, Engenhart-Cabillic R, Schlegel J, Expression of p53 and p21 in primary glioblastomas, *Strahlenther Onkol.*, Mar; 181 (3): 164-71, 2005.

Grossman SA, Batara JF, Current management of glioblastoma multiforme, *Semin Oncol*, Oct; 31 (5): 635-44, 2004.

Grundmann E, The concept of Julius Cohnheim on tumor formation and metastasis from the viewpoint of new research results, *Zentralbl Allg Pathol.*;130 (4): 323-31, 1985.

Günther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K, Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria, *Oncogene.*, May 1; 27 (20): 2897-909, 2008.

Gulati N, Karsy M, Albert L, Murali R, Jhanwar-Uniyal M, Involvement of mTORC1 and mTORC2 in regulation of glioblastoma multiforme growth and motility, *Int J Oncol.*, Oct; 35 (4): 731-40, 2009.

Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A, Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation, *Oncogene.*, Dec 4; 15 (23): 2755-65, 1997.

Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Cheng Y, Bernhard EJ, Muschel RJ, McKenna WG, The Ras radiation resistance pathway, *Cancer Res.*, May 15; 61 (10): 4278-82, 2001.

Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K, Downward J, Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice, *Cell.*, Jun 1; 129 (5): 957-68, 2007.

Han Y, Caday CG, Umezawa K, Nanda A, Preferential inhibition of glioblastoma cells with wild-type epidermal growth factor receptors by a novel tyrosine kinase inhibitor ethyl-2,5-dihydroxycinnamate, *Oncol Res.*; 9 (11-12): 581-7, 1997.

Harris MA, Yang H, Low BE, Mukherje J, Guha A, Bronson RT, Shultz LD, Israel MA, Yun K, Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma, *Cancer Res.*, Dec 15; 68 (24): 10051-9, 2008.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y, Apoptosis - the p53 network, *J Cell Sci.*, Oct 15; 116 (Pt 20): 4077-85, 2003.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, *N Engl J Med.*, Mar 10; 352 (10): 997-1003, 2005.

Heimberger AB, Wang E, McGary EC, Hess KR, Henry VK, Shono T, Cohen Z, Gumin J, Sawaya R, Conrad CA, Lang FF, Mechanisms of action of rapamycin in gliomas, *Neuro Oncol.*, Jan; 7 (1): 1-11, 2005.

Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Institut für Funktionelle Genomforschung, FACS Facility Labor, http://www.biologie.uniduesseldorf.de/Institute/Funktionelle_Genomforschung/FACS_Facility/Infos, 2008.

HelmholtzZentrum münchen, Institut für Molekulare Immunologie, Serviceeinheit monoklonale Antikörper, Zellsortierservice, <http://www.helmholtz-muenchen.de/imi/zs/index.html>, 2007.

Hill MM, Feng J, Hemmings BA, Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1, *Curr Biol.*, Jul 23; 12 (14): 1251-5, 2002.

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK, A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Sep 28; 101 (39): 14228-33, 2004.

Hockfield S, McKay RD, Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system, *J Neurosci.*, Dec; 5 (12): 3310-28, 1985.

Hofer S, Herrmann R, Chemotherapy for malignant brain tumors of astrocytic and oligodendroglial lineage, *J Cancer Res Clin Oncol*, Feb; 127 (2): 91-5, 2001.

Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN, Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice, *Nat Genet.*, May; 25 (1): 55-7, 2000.

Hopkin K, A surprising function for the PTEN tumor suppressor, *Science.*, Nov 6; 282 (5391): 1027,1029-30, 1998.

Hu L, Zaloudek C, Mills GB, Gray J, Jaffe RB, In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002), *Clin Cancer Res.*, Mar; 6 (3) : 880-6, 2000.

Hu X, Pandolfi PP, Li Y, Koutcher JA, Rosenblum M, Holland EC, mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma, *Neoplasia.*, Apr;7 (4) :356-68, 2005.

Huang S, Liu LN, Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Houghton PJ, p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin, *Cancer Res.*, Apr 15; 61 (8): 3373-81, 2001.

Huang TT, Sarkaria SM, Cloughesy TF, Mischel PS, Targeted therapy for malignant glioma patients: lessons learned and the road ahead, *Neurotherapeutics.*, Jul; 6 (3): 500-12, 2009.

Izzard RA, Jackson SP, Smith GC, Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent protein kinase, *Cancer Res.*, Jun 1; 59 (11): 2581-6, 1999.

Jin F, Li HS, Zhao L, Wei YJ, Zhang H, Guo YJ, Pang R, Jiang XB, Zhao HY, Expression of anti-apoptotic and multi-drug resistance-associated protein genes in cancer stem cell isolated from TJ905 glioblastoma multiforme cell line, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*, Aug 26; 88 (33): 2312-6, 2008.

Junttila MR, Li SP, Westermarck J, Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival, *FASEB J.*, Apr; 22 (4): 954-65, 2008.

Kang MK, Hur BI, Ko MH, Kim CH, Cha SH, Kang SK, Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma, *BMC Neurosci.*, Jan 30; 9:15, 2008.

Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE, Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells, *J Biol Chem.*, May 25; 276 (21): 18169-77, 2001.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW, Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.*, Dec 1; 51 (23 Pt 1): 6304-11, 1991.

Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mörk SJ, Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology, *J Child Neurol.*, Dec; 18 (12): 851-66, 2003.

Katsetos CD, Dráberová E, Smejkalová B, Reddy G, Bertrand L, de Chadarevian JP, Legido A, Nissanov J, Baas PW, Dráber P, Class III beta-tubulin and gamma-tubulin are co-expressed and form complexes in human glioblastoma cells, *Neurochem Res.*, Aug; 32 (8): 1387-98, 2007.

Katsetos CD, Dráberová E, Legido A, Dumontet C, Dráber P, Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. class III beta-tubulin, *J Cell Physiol.*, Jul 31, 2009.

Kaur H, Park CS, Lewis JM, Haugh JM, Quantitative model of Ras-phosphoinositide 3-kinase signalling cross-talk based on co-operative molecular assembly, *Biochem J.*, Jan 1; 393 (Pt 1): 235-43, 2006.

Kleihues P, Ohgaki H, Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis, *Neuro Oncol.*, Jan; 1 (1): 44-51, 1999.

Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciano P, Downward J, Parker PJ, The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras, *Curr Biol.*, Sep 1;4(9):798-806, 1994.

Kolchinsky A, Roninson IB, Drug resistance conferred by MDR1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines, *Anticancer Res.*, Sep-Oct; 17 (5A): 3321-7, 1997.

Kondo T, Setoguchi T, Taga T, Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Jan 20; 101 (3): 781-6, 2004.

Kubiatowski T, Jang T, Lachyankar MB, Salmons R, Nabi RR, Quesenberry PJ, Litofsky NS, Ross AH, Recht LD, Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas, *J Neurosurg.*, Sep; 95 (3): 480-8, 2001.

Kraus JA, Glesmann N, Beck M, Krex D, Klockgether T, Schackert G, Schlegel U, Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme, *J Neurooncol.*, Jun; 48 (2): 89-94, 2000.

Lacroix M, Abi-Said D, Fourny DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R, *J Neurosurg.* 2003 Jan;98(1):225-6; author reply 226. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival, *J Neurosurg.*, Aug; 95 (2): 190-8, 2001.

Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.*, Aug 15; 227 (5259): 680-5, 1970.

Law BK, Rapamycin: an anti-cancer immunosuppressant, *Crit Rev Oncol Hematol.*, Oct; 56 (1): 47-60, 2005.

Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, Lillehei KO, Bernstein M, Brem H, Sloan A, Berger MS, Chang S; Glioma Outcomes Investigators, Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project, *J Neurosurg.*, Sep; 99 (3): 467-73, 2003.

Lefranc F, Rynkowski M, DeWitte O, Kiss R, Present and potential future adjuvant issues in high-grade astrocytic glioma treatment, *Adv Tech Stand Neurosurg.*;34:3-35, 2009.

Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Kapitel Gliome, <http://www.dgn.org/leitlinien-der-dgn-2008-69.html>, Stand 2008.

Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, Soreq H, Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors, *Cancer Res.*, Feb; 44 (2): 753-60, 1984.

Liu W, James CD, Frederick L, Alderete BE, Jenkins RB, PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas, *Cancer Res.*, Dec 1; 57 (23): 5254-7, 1997.

Loew S, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME, The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms, *Anticancer Agents Med Chem.*, Jul; 9 (6): 703-15, 2009.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PS, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P, The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, *Acta Neuropathol.*, 114:97–109 DOI 10.1007/s00401-007-0243-4, 2007.

Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Benito R, Mata M, Pereda J, Sastre J, Roldan P, Gonzalez-Darder J, Cerdá-Nicolás M, The activation of ERK1/2 MAP kinases in glioblastoma pathobiology and its relationship with EGFR amplification, *Neuropathology.*, Oct; 28 (5): 507-15, 2008.

Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T, p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes, *Nature.*, Apr 29; 362 (6423): 847-9, 1993.

Lynch DK, Ellis CA, Edwards PA, Hiles ID, Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism, *Oncogene.*, Dec 23; 18 (56): 8024-32, 1999.

Mangiola A, Lama G, Giannitelli C, De Bonis P, Anile C, Lauriola L, La Torre G, Sabatino G, Maira G, Jhanwar-Uniyal M, Sica G, Stem cell marker nestin and c-Jun NH2-terminal kinases in tumor and peritumor areas of glioblastoma multiforme: possible prognostic implications, *Clin Cancer Res.*, Dec 1; 13 (23): 6970-, 2007.

Matsuda M, Yamamoto T, Matsumura A, Kaneda Y, Highly efficient eradication of intracranial glioblastoma using Eg5 siRNA combined with HVJ envelope, *Gene Ther.*, Aug 13, 2009.

Mawrin C, Diete S, Treuheit T, Kropf S, Vorwerk CK, Boltze C, Kirches E, Firsching R, Dietzmann K, Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme, *Int J Oncol.*, Sep; 23 (3): 641-8, 2003.

Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, Tonks NK, Donner DB, PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy, *J Biol Chem.*, Feb 15; 277 (7): 5484-9, 2002.

McAllister RM, Reed G, Colonial growth in agar of cells derived from neoplastic and non-neoplastic tissues of children, *Pediatr Res.*, Sep; 2 (5): 356-60, 1968.

McCord AM, Jamal M, Williams ES, Camphausen K, Tofilon PJ, CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines, *Clin Cancer Res.*, Aug 15; 15 (16): 5145-53, 2009.

McDermott MW, Berger MS, Kunwar S, Parsa AT, Sneed PK, Larson DA, Stereotactic radiosurgery and interstitial brachytherapy for glial neoplasms, *J Neurooncol*, Aug-Sep; 69 (1-3): 83-100, 2004.

MerckSerono, http://www.merckserono.net/corp.merckserono/en/images/20090531_en1_tcm112_41492.pdf, 2009), CENTRIC study, 2009.

Miller CR, Perry A, Glioblastoma, *Arch Pathol Lab Med.* Mar; 131 (3): 397-406, 2007.

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW, A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning, *Blood.*, Dec 15; 90 (12): 5013-21, 1997.

Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D, Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells, *Neuron*. 1994 Nov; 13 (5): 1071-82, 1994.

Moser BA, Dennis PB, Pullen N, Pearson RB, Williamson NA, Wettenhall RE, Kozma SC, Thomas G, Dual requirement for a newly identified phosphorylation site in p70s6k, *Mol Cell Biol.*, Sep; 17 (9): 5648-55, 1997.

Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods.*, Dec 16; 65 (1-2): 55-63, 1983.

Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MC, Hainfellner JA, Heppner FL, Dietrich PY, Zimmer Y, Cairncross JG, Janzer RC, Domany E, Delorenzi M, Stupp R, Hegi ME, Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma, *J Clin Oncol.*, Jun 20; 26 (18): 3015-24, 2008.

Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R, Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas, *Clin Cancer Res.*, Dec 15; 12 (24): 7261-70, 2006.

Newton HB, Molecular neuro-oncology and development of targeted therapeutic strategies for brain tumors. Part 2: PI3K/Akt/PTEN, mTOR, SHH/PTCH and angiogenesis, *Expert Rev Anticancer Ther.*, Feb; 4 (1): 105-28, 2004.

Nogales E, Wang HW, Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why?, *Curr Opin Cell Biol.*, Apr; 18 (2): 179-84, 2006.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P, Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study, *Cancer Res.*, Oct 1; 64 (19): 6892-9, 2004.

Ohgaki H, Kleihues P, Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma, *Am J Pathol.*, May; 170 (5): 1445-53, 2007.

Opel D, Westhoff MA, Bender A, Braun V, Debatin KM, Fulda S, Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis, *Cancer Res.*, Aug 1; 68 (15): 6271-80, 2008.

O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N, mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt, *Cancer Res.*, Feb 1; 66 (3): 1500-8, 2006.

Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, Kim MS, Lee SH, Park IC, Rhee CH, Hong SI, Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways, *Cancer Research* 66, 8511-8519, September 1, 2006.

Pecoriono L, *Molecular Biology Of Cancer, Mechanisms, Targets and Therapeutics*, Second Edition, Oxford University Press, New York, USA, 2008.

Pelloski CE, Lin E, Zhang L, Yung WK, Colman H, Liu JL, Woo SY, Heimberger AB, Suki D, Prados M, Chang S, Barker FG 3rd, Fuller GN, Aldape KD, Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma., *Clin Cancer Res.*, Jul 1; 12 (13): 3935-41, 2006.

Pérez Castillo A, Aguilar-Morante D, Morales-García JA, Dorado J, Cancer stem cells and brain tumors, *Clin Transl Oncol.*, May; 10 (5): 262-7, 2008.

Pichlmeier U, Bink A, Schackert G, Stummer W; ALA Glioma Study Group, Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients, *Neuro Oncol*, Dec; 10 (6): 1025-34, 2008.

Podsypanina K, Lee RT, Politis C, Hennessy I, Crane A, Puc J, Neshat M, Wang H, Yang L, Gibbons J, Frost P, Dreisbach V, Blenis J, Gaciong Z, Fisher P, Sawyers C, Hedrick-Ellenson L, Parsons R, An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten^{+/-} mice, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Aug 28; 98 (18): 10320-5, 2001.

Polakiewicz RD, Schieferl SM, Gingras AC, Sonenberg N, Comb MJ, mu-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control, *J Biol Chem.*, Sep 4; 273 (36): 23534-4, 1998.

Pouly S, Matthieu JM, Honegger P, Mature oligodendrocytes in three-dimensional brain cell culture respond to protein kinase C stimulation by dedifferentiation, proliferation and remyelination, *Schweiz Arch Neurol Psychiatr*; 145 (3): 27-9, 1994.

Preston-Martin S, Epidemiology of primary CNS neoplasms, *Neurol Clin.*, May; 14 (2): 273-90, 1996.

Prives C, Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit, *Cell.*, Oct 2; 95 (1): 5-8, 1998.

Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G, Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1, *Science.*, Jan 30; 279 (5351): 707-10, 1998.

Qiang L, Yang Y, Ma YJ, Chen FH, Zhang LB, Liu W, Qi Q, Lu N, Tao L, Wang XT, You QD, Guo QL, Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines, *Cancer Lett.*, Jun 28; 279 (1): 13-21, 2009.

Raman M, Chen W, Cobb MH, Differential regulation and properties of MAPKs, *Oncogene.*, May 14; 26 (22): 3100-12, 2007.

Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD, Molecular pathogenesis of malignant gliomas, *Curr Opin Oncol.*, May; 11 (3): 162-7, 1999.

Renart J, Reiser J, Stark GR, Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Jul; 76 (7): 3116-20, 1979.

Riemenschneider MJ, Betensky RA, Pasedag SM, Louis DN, AKT activation in human glioblastomas enhances proliferation via TSC2 and S6 kinase signalling, *Cancer Res.*, Jun 1; 66 (11): 5618-23, 2006.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N, Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Crit Rev Oncol Hematol.*, Jul; 19 (3): 183-232, 1995.

Sathornsumetee S, Hjelmeland AB, Keir ST, McLendon RE, Batt D, Ramsey T, Yusuff N, Rasheed BK, Kieran MW, Laforme A, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN, AAL881, a novel small molecule inhibitor of RAF and vascular endothelial growth factor receptor activities, blocks the growth of malignant glioma, *Cancer Res.*, Sep 1; 66 (17): 8722-30, 2006.

Scherer SJ, Welter C, Zang KD, Dooley S, Specific in vitro binding of p53 to the promoter region of the human mismatch repair gene hMSH2, *Biochem Biophys Res Commun.*, Apr 25; 221 (3): 722-8, 1996.

Schlegel J, Stumm G, Brändle K, Merdes A, Mechttersheimer G, Hynes NE, Kiessling M, Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma, *J Neurooncol.* ; 22 (3): 201-7, 1994.

Schlegel J, Piontek G, Budde B, Neff F, Kraus A, The Akt/protein kinase B-dependent anti-apoptotic pathway and the mitogen-activated protein kinase cascade are alternatively activated in human glioblastoma multiforme, *Cancer Lett.*, Sep 29;158 (1): 103-8, 2000.

Schlegel J, Durchschlag G, Piontek G, Grosu AL, Activation of the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B-dependent antiapoptotic pathway plays an important role in the development of radioresistance of human glioma cells, *Ann N Y Acad Sci.* Nov; 973: 224-7, 2002.

Semba S, Itoh N, Ito M, Harada M, Yamakawa M, The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells, *Clin Cancer Res.*, Jun; 8 (6): 1957-63, 2002.

Shen G, Shen F, Shi Z, Liu W, Hu W, Zheng X, Wen L, Yang X, Identification of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods, *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, Jul-Aug; 44 (7): 280-9, 2008.

Shervington A, Lu C, Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells, *Cancer Invest.*, Jun; 26 (5): 535-42, 2008.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, *Cancer Res.*, Sep 15; 63 (18): 5821-8, 2003.

Smith R, Bagga V, Fricker-Gates RA, Embryonic neural progenitor cells: the effects of species, region, and culture conditions on long-term proliferation and neuronal differentiation, *J Hematother Stem Cell Res.* 2003 Dec;12(6):713-25, 2003.

Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO, Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma, *Cancer Res.*, Sep 15; 61 (18): 6674-8, 2001.

Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T; ALA-Glioma Study Group, Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias, *Neurosurgery*, Mar; 62 (3): 564-76, 2008.

Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-GliomaStudy Group, Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, *Lancet Oncol.*, May; 7 (5): 392-401, 2006.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn M JB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, and Mirimanoff RO for the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *N Engl J Med*; 352:987-96, 2005.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial, *Lancet Oncol.*, May;10 (5): 459-66, 2009.

Strojnik T, Kavalarič R, Lah TT, Experimental model and immunohistochemical analyses of U87 human glioblastoma cell xenografts in immunosuppressed rat brains, *Anticancer Res.*, Jul-Aug; 26 (4B): 2887-900, 2006.

Taga T, Identification of cancer stem cells in the side population, *Gan To Kagaku Ryoho*. 2006 Mar; 33 (3): 295-9, 2006.

Taghian A, Suit H, Pardo F, Gioioso D, Tomkinson K, DuBois W, Gerweck L, In vitro intrinsic radiation sensitivity of glioblastoma multiforme, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*;23 (1): 55-62, 1992.

Tait MJ, Petrik V, Loosemore A, Bell BA, Papadopoulos MC, Survival of patients with glioblastoma multiforme has not improved between 1993 and 2004: analysis of 625 cases, *Br J Neurosurg.*, Oct; 21 (5): 496-500, 2007.

Tan Y, Luo R, Structural and functional implications of p53 missense cancer mutations, *PMC Biophys.*, Jun 26; 2 (1): 5, 2009.

Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, Rocco G, Pirozzi G, The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer, *Eur J Cardiothorac Surg.*, Sep; 36 (3): 446-53, 2009.

Toker A, Newton AC, Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site, *J Biol Chem.*, Mar 24; 275 (12): 8271-4, 2000.

Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H, PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas, *J Neuropathol Exp Neurol.*, Jul; 57 (7): 684-9, 1998.

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL, Direct isolation of human central nervous system stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Dec 19; 97 (26): 14720-5, 2000.

Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, Li H, Diserens AC, Wojcik BE, Huang HJ, Friedmann T, de Tribolet N, Cavenee WK, Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells, *Cancer Res.*, Feb 1; 54 (3): 649-52, 1994.

Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA, Rabinovsky R, McNear CJ, Kim JJ, Hennessey BT, Tseng H, Pochanard P, Kim SY, Dunn IF, Schinzel AC, Sandy P, Hoersch S, Sheng Q, Gupta PB, Boehm JS, Reiling JH, Silver S, Lu Y, Stemke-Hale K, Dutta B, Joy C, Sahin AA, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Rameh LE, Jacks T, Root DE, Lander ES, Mills GB, Hahn WC, Sellers WR, Garraway LA, AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer, *Cancer Cell.*, Jul 7; 16 (1): 21-32, 2009.

Vazquez F, Sellers WR, The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signalling, *Biochim Biophys Acta.*, Feb 14; 1470 (1): M21-35, 2000.

Vichalkovski A, Baltensperger K, Thomann D, Porzig H, Two different pathways link G-protein-coupled receptors with tyrosine kinases for the modulation of growth and survival in human hematopoietic progenitor cells, *Cell Signal.* 2005 Apr; 17 (4): 447-59, 2005.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF, A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002), *J Biol Chem.*, Feb 18; 269 (7): 5241-8, 1994.

Von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN, Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis, *Brain Pathol.*, Jan; 3 (1): 19-26, 1993.

Wang J, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH, Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line, *Cancer Res.*, Apr 15; 67 (8): 3716-24, 2007.

Wang J, Sakariassen PØ, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Bøe SO, Svendsen A, Prestegarden L, Røslund G, Thorsen F, Stuhr L, Molven A, Bjerkvig R, Enger PØ, CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells, *Int J Cancer.*, Feb 15; 122 (4): 761-8, 2008.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H, Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas, *Brain Pathol.*, Jul; 6 (3): 217-23, 1996.

Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB, Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Nov 11; 94 (23): 12425-30, 1997.

Weller M, Interdisziplinäre S 2 – Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters, Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO), Deutsche Krebsgesellschaft e.V., W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, 2004.

Weller M, Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Kapitel Gliome, <http://www.dgn.org/leitlinien-der-dgn-2008-69.html>, Stand 2008.

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM, Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells, *Cell Mol Life Sci.*, Oct; 61 (19-20): 2510-22, 2004.

Yang LY, Zheng JK, Liu XM, Hui GZ, Guo LH, The in vitro myelin formation in neurospheres of human neural stem cells, *Chin J Traumatol.*, Dec; 6 (6): 341-5, 2003.

Yang LY, Wang CY, Zheng JK, Wen JC, Li WY, Huang XP, Long-term culture and differentiation of human glioma stem cells, *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, Jan; 37 (1): 141-4, 2006.

Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS, Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme, *Oncogene.*, Dec 16; 23 (58): 9392-400, 2004.

Yoon H, Kim DJ, Ahn EH, Gellert GC, Shay JW, Ahn CH, Lee YB, Antitumor activity of a novel antisense oligonucleotide against Akt1, *J Cell Biochem.*, Aug 19, 2009.

Zinda MJ, Johnson MA, Paul JD, Horn C, Konicek BW, Lu ZH, Sandusky G, Thomas JE, Neubauer BL, Lai MT, Graff JR, AKT-1, -2, and -3 are expressed in both normal and tumor tissues of the lung, breast, prostate, and colon, *Clin Cancer Res.*, Aug; 7 (8): 2475-9, 2001.

Zwick E, Bange J, Ullrich A, Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs, *Trends Mol Med.*, Jan; 8 (1): 17-23, 2002.

15. Erklärung

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

Charakterisierung der intrazellulären Signaltransduktion und Nachweis von Tumorstammzellen in humanen, malignen Gliomen nach experimenteller Strahlentherapie

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

- (X) Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- () Die vollständige Dissertation wurde in veröffentlicht. Die Fakultät für Medizin hat der Vorveröffentlichung zugestimmt.
- (X) Ich habe den angestrebten Doktorgrad **noch nicht** erworben und bin **nicht** in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
- () Ich habe bereits am bei der Fakultät für der Hochschule unter der Vorlage einer Dissertation mit dem Thema die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:
.....

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den.....

.....

Unterschrift

16. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Jürgen Schlegel für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und seine wissenschaftliche Anleitung. Er ermöglichte mir dadurch, mich mit einem faszinierenden Thema zu befassen. Auch danke ich ihm für die stets angenehme und freundliche Atmosphäre, in der sich Gespräche, Gedanken und Arbeit frei entfalten durften.

Ebenso gilt mein Dank dem Ärzte- und Physikerteam der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der TU München (Direktor: Prof. Dr. M. Molls) für die Bereitstellung der apparativen Ausstattung und die kooperative Betreuung während der Bestrahlungsexperimente.

Herrn Dr. Joachim Ellwart und seinem Team des Zellsortierservice des Helmholtzzentrum München danke ich für die Durchführung der vielen FACS-Analysen sowie der technischen und fachlichen Beratung während der Experimente.

Frau Petra Heinrich aus dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie (Direktor: Prof. Dr. K. Kuhn) der TU München war durch ihre geduldige und kreative Betreuung in statistischen Fragen von großer Hilfe für mich.

Aus dem Fachgebiet Neuropathologie möchte ich meinen speziellen und aufrichtigen Dank an Guido Piontek richten, der sich zu keiner Tages- und Nachtzeit zu schade war, für meine Anliegen eine Lösung zu finden. Seiner Hilfe verdanke ich wesentliche Teile dieser Dissertation.

Roland Bodics hat mich auf das Dissertationsthema erst aufmerksam gemacht und damit die Arbeit von Anfang an gefördert.

Zuletzt danke ich meiner Familie und im Besonderen meiner Frau Sinja sowie meiner Tochter Theresa von Herzen, die mich stets durch Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet haben und deren Unterstützung für diese Arbeit elementar war.