



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

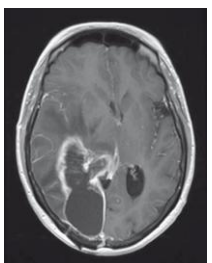


Universität Hamburg

Dissertation

Hans Dietrich Herrmann Labor für Hirntumorbiologie
in Kooperation
mit der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

Hans Dietrich Herrmann Labor
für Hirntumorbiologie



Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Lehrstuhl für Neurologie

der Klinik und Poliklinik für Neurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Westphal

Betreuer: Prof. Dr. med. Katrin Lamzus

„Charakterisierung und Aufrechterhaltung der Amplifikation des
Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gens in Zellkulturen aus dem
humanen Glioblastoma Multiforme unter modifizierten Stammzell-
Bedingungen“

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von

für meine Söhne....
Maurice und Maxime

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Hans Dietrich Herrmann Labor für Hirntumorbiologie

der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Westphal

Betreuerin: Prof. Dr. med. Katrin Lamszus

„Charakterisierung und Aufrechterhaltung der Amplifikation des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gens in Zellkulturen aus dem humanen Glioblastoma Multiforme unter modifizierten Stammzell- Bedingungen“

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Clemens Wülfing, geboren in Bielefeld

Hamburg, 2011

inhaltsverzeichnis

1. Gliedung

1.1. Gliedung

1.1.1. Gliedung

1.1.1.1. Gliedung

1.1.1.2. Gliedung

1.1.2. Gliedung

1.1.2.1. Gliedung - Histologische Charakterisierung, Klinik und Therapie

1.1.2.2. Gliedung - Molekularbiologische Grundlagen und Differenzierung

1.1.2.3. Gliedung

1.1.2.4. Gliedung

1.1.2.5. Gliedung

1.1.2.6. Gliedung

1.1.2.7. Gliedung

1.1.2.8. Gliedung

1.2. Gliedung

1.2.1. Gliedung

1.2.2. Gliedung

1.2.3. Gliedung

1.2.4. Gliedung

1.2.5. Gliedung

1.2.6. Gliedung

1.2.7. Gliedung

1.2.8. Gliedung

1.2.9. Gliedung

1.2.10. Gliedung

1.2.11. Gliedung

1.2.12. Gliedung

1.2.13. Gliedung

1.2.14. Gliedung

1.2.15. Gliedung

1.2.16. Gliedung

1.2.17. Gliedung

1.2.18. Gliedung

1.2.19. Gliedung

1.2.20. Gliedung

1.2.21. Gliedung

1.2.22. Gliedung

1.2.23. Gliedung

1.2.24. Gliedung

1.2.25. Gliedung

1.2.26. Gliedung

1.2.27. Gliedung

1.2.28. Gliedung

1.2.29. Gliedung

1.2.30. Gliedung

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 18. 10. 2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Katrin Kammer

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in: Prof. Dr. C. Kugel

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in: Prof. Dr. R. Jendrich

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	8
 1. Einleitung	 12
1.1. Hirntumore	12
Gliome	12
Astrozytome	13
1.2. Glioblastoma multiforme	14
1.2.1. „Phänotyp“ des Glioblastoms - Histologische Charakterisierung, Klinik und Therapie	14
1.2.2. „Genotyp“ des Glioblastoms – Molekularbiologische Grundlagen und Diversifizierung	15
Epigenetische Veränderungen	16
Neoangiogenese / Invasion	16
Zellzyklus / Rb-Protein	17
DNA-Schäden / p53-Protein	17
Signaltransduktion / PTEN	18
Glioblastom Typ 1 und Typ 2	19
1.3. Proteinkinasen und Rezeptortyrosinkinasen	21
1.4. Die Erb-B Familie	22
1.5. Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)	24
1.5.1. Struktur und Physiologie	25
Extrazellulärer Teil	25
Transmembran- und juxtamembraner Teil	25
Intrazellulärer Teil	26
Aktivierung	27
Ras / MAP-Kinasen	29
Phospholipid-Metabolismus / PI3K	29
Src / STAT's und Crosstalk	30
Trafficking	30
1.5.2. Pathophysiologie und Therapieansätze	31
Protein-Expression und Gen-Mutationen	32
wt-EGFR und EGFRvIII	33
Therapie	35
1.5.3. Amplifikation	36
1.5.4. Zielsetzung dieser Arbeit	37
 2. Material und Methoden	 39
2.1. Material	39
2.1.1. Verbrauchsmaterialien	39
2.1.2. Chemikalien	40
2.1.3. Geräte	46
2.2. Methoden	48
2.2.1. Verarbeitung von frischem Tumormaterial	48
2.2.2. Serumfreie Zellkultur mit variabler EGF-Konzentration	48

2.2.3. Einfrieren / Auftauen von Zellen	48
2.2.4. Auswertung der Wachstumsrelationen.....	49
2.2.5. Nachweis der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation	49
2.2.5.1. Präparation genomischer DNA.....	49
2.2.5.2. DNA-Nachweis mittels photometrischer Messung.....	49
2.2.5.3. PCR und Gelelektrophorese	50
2.2.5.4. Quantitative Real-Time PCR	51
2.2.5.5. FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	53
2.2.6. Proliferationskinetik	54
2.2.7. Differenzierungspotential.....	54
2.2.7.1. chemisch induzierte Zelldifferenzierung	54
2.2.7.2. FACS: Fluorescence-Activated-Cell-Sorting.....	54
2.2.8. Tumorigenität in vivo	55
2.2.8.1. Xenotransplantation der Tumorzellen und Explantation der Maushirne	55
2.2.8.2 HE-Färbung und histologische Auswertung	55
 3. Ergebnisse	57
3.1. Etablierung der Glioblastom-Stammzellkulturen	57
3.2. Wachstumsmuster	58
3.3. Wachstumsrelationen	60
3.3.1. Interne Wachstumsrelationen.....	61
3.3.1.1. GB-02:	61
3.3.1.2. GB-03	62
3.3.1.3. GB-17	63
3.3.1.4. GB-18	64
3.3.1.5. GB-19	65
3.3.1.6. GB-22	65
3.3.1.7. GB-10	66
3.3.1.8. GB-11	66
3.3.1.9. GB-15	67
Zusammenfassung	67
3.3.2. externe Wachstumsrelationen.....	68
3.3.2.1. Kultivierung mit 0 ng/ml EGF	68
3.3.2.2. Kultivierung mit 5 ng/ml EGF	69
3.3.2.3. Kultivierung mit 10 ng/ml EGF	70
3.3.2.4. Kultivierung mit 15 ng/ml EGF	72
3.3.2.5. Kultivierung mit 20 ng/ml EGF	72
Zusammenfassung	73
3.4. Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens.....	74
3.4.1. Amplifikation im ursprünglichen Tumorgewebe.....	74
3.4.1.1. Analyse mittels differentieller PCR	75
3.4.1.2. Analyse mittels Real-Time PCR.....	75
3.4.2. Veränderungen der Amplifikation innerhalb der mGS-Kulturen.....	77
3.4.2.1. GB-02	78
3.4.2.2. GB-03	79
3.4.2.3. GB-10	80
3.4.2.4. GB-15	81

3.4.2.5. GB-22	82
3.4.2.6. GB-11, GB-18 und GB-19 als Kontrolle.....	83
3.4.2.7. GB-10 und GB-15 – Frühe und späte Passage	84
Zusammenfassung	86
3.5. Charakterisierung von GB-03	86
3.5.1. FISH-Analyse	87
3.5.2. Proliferationskinetik	88
3.5.3. Differenzierungspotential.....	89
3.5.3.1. GB-03/EGF(0)	90
3.5.3.2. GB-03/EGF(5)	91
3.5.3.3. GB-03/EGF(10)	92
Zusammenfassung	93
3.5.4. Tumorigenität in vivo	93
 4. Diskussion.....	 97
4.1. Wachstum und EGF-Konzentration	97
4.2. Amplifikation des EGFR-Gens und EGF-Konzentration	102
4.3. GB-03: Hirntumorstammzellen mit EGFR-Genamplifikation ?	110
 5. Ausblick	 113
 6. Zusammenfassung	 114
 7. Literatur.....	 115

Abkürzungen

Abkürzungen, die in der Arbeit verwendet werden, in alphabetischer Reihenfolge:

ADAM	Eine Disintegrin- und Metalloprotease-Domäne enthaltendes Protein
AK	Antikörper
Akt	Synonym für PKB (Proteinkinase B) – Die Abkürzung leitet sich her aus einer „Ak“-Klasse von Lymphomen des Thymus bei der Maus, deren Ursache später auf einen „t“-ransformierenden Retrovirus zurückgeführt werden konnte. Dieses virale Onkogen trug als erstes den Namen „Akt“.
AR	Amphiregulin (Ligand für Erb-B-Rezeptoren)
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Der Bcl-2 Familie assoziiertes X-Protein
Bcl-2	Den im B-Zell-Lymphom gefundenen Genen und Proteinen verwandte Gen- und Proteinfamilie
Bcl-xL	Ein für die Apoptose wichtiges Protein der Bcl-Familie
BTC	Betacellulin (Ligand für Erb-B-Rezeptoren)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Caspasen	Familie von Cystein-abhängigen Proteasen des Apoptosoms
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CKI	Inhibitor der Cyclin abhängigen Kinase
c-myb	Ein Onkogen benannt nach einem viralen Onkogen innerhalb der Myeloblastosis bei Vögeln
COX-2	Cyclooxygenase-2
CpG-Insel	Cytosin-Guanin Dinukleotid Cluster
DAG	Diacylglycerin
(wt)-EGF(R)	(Wildtyp des) Epidermalen Wachstumsfaktor(Rezeptors)

EGFRvIII	Häufigste Variante des EGFR im Glioblastom
EPR	Epiregulin (Ligand für Erb-B-Rezeptoren)
Eps	EGFR-assoziiertes Protein, welches die Endozytose vermittelt
Erb-B	Eine dem Onkogen des die erythroblastöse Leukämie bei Vögeln hervorrufenden Virus homologe Proteinstruktur.
Erk	Durch ein extrazelluläres Signal regulierte MAP-Kinase, die Transkriptionsfaktoren im Kern aktiviert
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluoreszenz-abhängiges Verfahren der Durchflußzytometrie zum Sortieren von Zellen nach bestimmten Eigenschaften und quantitativen Messungen.
FGF(R)	Fibroblasten-Wachstumsfaktor(Rezeptor)
GalC	Galaktocerebrosidase C
GFAP	Saures Gliafaser-Protein
GH(R)	Wachstumshormon(Rezeptor)
Grb-2	Wachstumsfaktor gebundenes Signalprotein (Ein Adaptorprotein für den EGFR)
HB-EGF	Heparin-bindendes EGF (Ligand für Erb-B-Rezeptoren)
HIF-1	Durch Hypoxie induzierter Faktor
IGF(R)	Dem Insulin-Rezeptor ähnlicher Wachstumsfaktor(Rezeptor)
IgG	Immunglobulin G
iNOS	Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthase
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IR	Insulinrezeptor
Jak	Januskinase
LOH	Verlust eines Gen-Allels, was gleichzeitig dem Verlust der Heterozygotität für dieses Gen entspricht
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2

MAP-Kinasen	„Mitogen-aktivierte Proteinkinasen“ – eine Familie von Serin/Threonin Kinasen
MDM2	Gen und Protein, welches p53 inhibiert
MGMT	Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mGS	„Glioblastom-Stammzellkultur unter modifizierten Stammzellbedingungen“
MMP	Matrix-Metalloproteinase
m-Sos	„Son of Sevenless“ Protein bei Mammalia, ein Austauschfaktor für das Protein Ras
mTOR	Serin/Threonin Kinase
NF	Neurofilamente
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor κ-B
NRG	Neuregulin (Ligand für Erb-B-Rezeptoren)
p14/ARF	Alternativer Leserahmen des Gens p16/INK4a
p16/INK4a	Genlocus für Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK4) des Zellzyklus
PDGF(R)	Blutplättchen-Wachstumsfaktor(Rezeptor)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4-5-Diphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3-4-5-Triphosphat
PKB	Proteinkinase B (Synonym für Akt)
PKC	Proteinkinase C, eine Serin/Threonin-Kinase
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTB-Domäne	Phosphotyrosin-bindende Domäne
PTEN	Phosphatase, welche den PI3K-Weg inhibiert
Ras	Eine GTPase, deren Name sich von in Sarkomen bei Ratten gefundenen Proteinen ableitet

Rb-Protein	Retinoblastom-Protein
SH2-Domäne	Eine dem src-Protein homologe Domäne (Phosphotyrosin-bindende Domäne)
Shc	Ein dem Src-Protein homologe Domäne enthaltenes Signalprotein (Ein Adaptorprotein für den EGFR)
SOX-2	"[Sex determining region Y]-box 2" - Transkriptionsfaktor
Src	Ein aus „sarcoma“ und „cellular“ abgeleiteter Name einer zytosolischen Tyrosinkinase vom Nicht-Rezeptortyp (Ein Adaptorprotein für den EGFR).
STAT	„signal transducers and activators of transcription“ - Transkriptionsfaktoren
TGF- α	Transformierender Wachstumsfaktor-Alpha (Ligand für Erb-B-Rezeptoren)
TIMP	Gewebe-spezifische Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen
VEGF(R)	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor(Rezeptor)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Hirntumore

Hirntumore sind neoplastische Erkrankungen innerhalb des Zentralen Nervensystems (ZNS), die sich entweder aus dem neuroektodermalen Gewebe selbst ableiten, oder aber ihren Ursprung in ZNS fremden Geweben haben. Daher unterscheidet man zunächst sekundäre Hirntumore, die aufgrund einer Metastasierung eines Primärtumors eines anderen Körpergewebes entstanden sind, von primären, die ihren Ursprung in einem Gewebetyp des ZNS haben. Primäre Hirntumore haben bei Männern (6-11 / 100.000) eine etwas höhere Inzidenz als bei Frauen (4-11 / 100.000) und gehören somit zu den seltenen Tumorarten (*Parkin et al., 2005*), sie sind insgesamt für weniger als 2% der Krebstodesfälle verantwortlich (*Surawicz et al., 1999*), zeigen jedoch in den letzten Jahren eine steigende Inzidenz unbekannter Ätiologie. Ihren Ursprung können primäre Hirntumore in den Nervenzellen, den Meningen, den Hirnanhangsgebilden Hypophyse und Corpus pineale, den Hirngefäßen, dem Plexus choroideus oder aber dem komplexen Hirnstützgewebe, den Gliazellen haben (*Schlegel, Weller, und Westphal et al., 2003*). Zu dieser Glia wiederum gehören Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen, wohingegen die Mikroglia einen Bestandteil des Immunsystems bildet. Alle primären Hirntumore, die histologisch gliale Charakteristika aufzeigen, werden zusammengefaßt als Gliome und machen etwa 40% aller Hirntumore aus (*Kleihues et al., 1995*). Im Folgenden soll aufgrund Ihrer besonderen Bedeutung diese Gruppe näher betrachtet werden.

Gliome

Die Klassifizierung der Gliome erfolgt neuropathologisch nach der histologischen Diagnose, diese bildet auch die Grundlage der Feststellung des Malignitätsgrades und der Einteilung nach der WHO-Klassifikation (*Zülch et al., 1979; Kleihues et al., 2002; Louis et al., 2007*). Nach dem histologischen Bild werden in der WHO Klassifikation 4 verschiedene Grade unterschieden, WHO Grad I bis WHO Grad IV. Eine Übersicht gibt Tabelle 1.1.A. Die für den WHO Grad entscheidenden histologischen Merkmale sind die Zelldifferenzierung, Zelldichte, nukleäre Polymorphie, mitotische Aktivität, Invasion des umgebenden Hirnparenchyms, mikrovaskulären Endothelproliferate und Gewebnekrosen (*Kleihues, Burger, und Scheithauer et al., 1993; Kleihues et al., 1995*). Da alle Tumoren ab dem WHO Grad II diffus infiltrierend wachsen, sind diese chirurgisch nicht mehr vollständig resizierbar, und zeigen daher im Verlauf fast immer eine Rezidivbildung. Desweiteren neigen Gliome des WHO Grades II zur malignen Progression, was in der Folge die Entstehung von Tumoren des WHO Grades III und des WHO Grades IV bedingt (*Maher et al., 2001*). Man unterscheidet je nach Ursprungsgewebe des Hirntumors die seltenen Ependymome und Oligodendrogliome von den häufigen Astrozytomen, wobei – ebenfalls selten – auch Mischformen vorkommen. Ependymome treten häufig im Kindes- und Jugendalter auf, und aufgrund der anatomischen Lokalisation der Ursprungszellen meist peri- oder intraventrikulär (*Staneczek und Janisch et al., 1994*). Oligodendrogliome und die Mischformen der Oligoastrozytome treten häufig im Alter von 40-50 Jahren auf, oft in Verbindung mit Epilepsien und sind meistens im Cortex oder dem Marklager zu finden. Wie auch die Ependymome zeigen sie maximal den WHO Grad III, und machen gemeinsam mit diesen nicht mehr als 10% der Gliome aus (*von, Louis, und Wiestler et al., 1995a; Ohgaki und Kleihues et al., 2005*).

<u>Tumortyp</u>			<u>WHO Grad</u>	<u>Häufigkeit</u>	<u>Alter</u>	<u>Mittlere Überlebenszeit</u>
Gliome	Astrozytome	Pilozytische Astrozytome	I	20-30% der Gliome, Grad I ist häufigster Hirntumor im Kindesalter	3-20 Jahre	Kurativ heilbar
		Diffuse Astrozytome	II		30-50 Jahre	6-8 Jahre
		Anaplastische Astrozytome	III			3 Jahre
		Glioblastome	IV	50% der Gliome	60-70 Jahre	1 Jahr
	Oligoastrozytome		II-III	3-8% der Gliome	35-50 Jahre	Grad II: 10-16 Jahre/ Grad III: 2-10 Jahre
	Oligodendrogliome					
	Ependymome		I-III	2-6% der Gliome, 10% aller kindlichen Tumore	Kinder- und Jugendalter	Uneinheitlich

Tabelle 1.1.A: Übersicht über die klinisch häufigsten Hirntumore. Einteilung modifiziert nach (Schlegel, Weller, und Westphal et al., 2003)

Astrozytome

Die deutliche Mehrheit der Gliome bildet mit 70-80% die Gruppe der Astrozytome, welche sich entsprechend der WHO-Klassifikation in allen 4 Malignitätsgraden zeigen können. Mit Ausnahme des subependymalen Riesenzell-Astrozytoms und pleomorphen Xanthoastrozytoms sowie des pilozytischen Astrozytoms WHO Grad I wachsen alle anderen Astrozytome der WHO Grade II bis IV diffus infiltrierend in das umgebende Hirnparenchym, sind somit nicht kurativ therapierbar, und haben in der Regel eine infauste Prognose. Grundsätzlich werden anhand der histologischen Merkmale die niedrigmalignen Astrozytome der WHO Grade I und II von den hochmalignen der WHO Grade III und IV unterschieden (Kleihues et al., 2002; Louis et al., 2007).

Das Astrozytom WHO Grad I oder auch pilozytische Astrozytom ist ein scharf begrenzter Tumor des Kindes- und Jugendalters, der aufgrund des langsamen Wachstums und der fehlenden diffusen Infiltration durch eine vollständige chirurgische Resektion in den meisten Fällen heilbar ist. Dieses Astrozytom, welches in mehr als der Hälfte aller Fälle in den cerebellären Hemisphären oder Mittellinien-Strukturen wie Hypothalamus oder Hirnstamm lokalisiert ist, zeigt nur in Ausnahmefällen eine Tendenz zur malignen Progression und hat ein charakteristisches histologisches Zwei-Komponentenmuster. Pilozytische Astrozytome treten in bis zu 30% der Fälle von Neurofibromatose Typ 1 auf (von, Louis, und Wiestler et al., 1995b; Davis, McCarthy, und Berger et al., 1999; Kleihues und Cavenee et al., 2000; Louis et al., 2007).

Das Astrozytom WHO Grad II oder auch diffuses Astrozytom ist ein nicht mehr abgegrenzter Tumor des Erwachsenenalters (Häufigkeitsgipfel 30-40 Jahre), der zwar langsam wächst, jedoch aufgrund

seiner diffusen Infiltration des umgebenden Hirnparenchyms im Verlauf von 5 Jahren eine Tendenz zur malignen Progression zu einem Astrozytom WHO Grad III oder sekundärem Astrozytom WHO Grad IV (Glioblastom) zeigt (Maher et al., 2001). Eine kurative Therapie ist aufgrund der Invasivität nicht möglich, es treten fast immer Rezidive auf, so daß die mittlere Überlebenszeit 6-8 Jahre beträgt (Davis, McCarthy, und Berger et al., 1999; Kleihues und Cavenee et al., 2000; Louis et al., 2007).

Das Astrozytom WHO Grad III oder anaplastische Astrozytom ist ein ebenfalls diffus in das umgebende Gewebe infiltrierender, im Gegensatz zum Astrozytom WHO Grad II jedoch schnell wachsender Tumor, der meistens zwischen dem 40. und 45. Lebensjahr auftritt, und der im Verlauf fast immer eine Progression zu einem sekundären Glioblastom zeigt (Maher et al., 2001), die mittlere Überlebenszeit beträgt hier nur noch 3 Jahre. Es ist wie das Astrozytom WHO Grad II meist in den Großhirnhemisphären gelegen, zeigt im Gegensatz zu diesem aber deutlichere histologische Auffälligkeiten wie erhöhte Zelldichte, mitotische Aktivität und Kernpolymorphismen (Davis, McCarthy, und Berger et al., 1999; Kleihues und Cavenee et al., 2000; Louis et al., 2007).

Das Astrozytom WHO Grad IV oder Glioblastoma multiforme, im folgenden verkürzt als Glioblastom bezeichnet, zeigt den höchsten Malignitätsgrad und ist gleichzeitig die häufigste Hirntumorentität, indem es mehr als die Hälfte aller Gliome aber auch Astrozytome ausmacht. Aufgrund der Bedeutung des Glioblastoms in der Klinik, aber auch weil es die Grundlage dieser Arbeit bildet, soll im folgenden Abschnitt detailliert darauf eingegangen werden.

1.2. Glioblastoma multiforme

1.2.1. „Phänotyp“ des Glioblastoms - Histologische Charakterisierung, Klinik und Therapie

Das Glioblastom ist der häufigste primäre Hirntumor, und zugleich der bösartigste, die klinischen Symptome sind bei Diagnosestellung kaum älter als ein paar Monate, und die Prognose trotz jahrzehntelanger Forschung immer noch infaust. Bevorzugt tritt es bei Patienten im Alter zwischen 65 und 70 Jahren auf, bei denen es dann nach der Diagnose innerhalb von durchschnittlich 13 Monaten zum Tode führt. Als heutige palliative Standardtherapie wird die möglichst umfassende chirurgische Resektion des Tumors mit anschließender adjuvanter Radio- und Chemotherapie angewandt, mit der eine durchschnittliche Verlängerung der Überlebenszeit von 3 Monaten erreicht wurde. Chemotherapeutika, die die Überlebenszeit um wenige Monate erhöhen konnten, sind entweder Temozolomid (Temodal) oder aber Nitrosoharnstoffderivate wie Nimustin (ACNU), Carmustin (BCNU) oder Lomustin (CCNU). Temozolomid als alkylierendes Agens zeigt bei den Patienten unterschiedliche Erfolge, was im Wesentlichen durch den Mechanismus der Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) begründet ist, auf den in 1.2.2 noch detaillierter eingegangen wird (Davis, McCarthy, und Berger et al., 1999; Kleihues und Cavenee et al., 2000; Stupp und Regg et al., 2003; Hegi et al., 2005; Louis et al., 2007). Glioblastome sind meistens in den Großhirnhemisphären lokalisiert, häufig im fronto-temporalen Bereich. Aufgrund ihres schnellen und invasiven Wachstums führen Glioblastome zu einer massiven Verdrängung und Kompression des umgebenden Hirngewebes. Desweiteren infiltrieren migrierende Tumorzellen vorwiegend entlang myelinisierter Bahnen nahezu das gesamte Cerebrum, oft bis in die kontralaterale Hemisphäre. Kennzeichnend für die histologische Diagnosestellung sind neben den auch für die Astrozytome der WHO Grade II und III beschriebenen Merkmalen vor allem mikrovaskuläre Endothelproliferate sowie Gewebnekrosen, die zu einem pseudopalisadenartigen Randwall führen. Klinisch kann der Tumor ohne vorherige bekannte Läsion auftreten, man spricht dann vom primären oder „de novo“ Glioblastom, dieses findet sich wie oben erwähnt meist bei älteren Patienten ab dem 65. Lebensjahr. Die andere

Möglichkeit ist die Diagnose als rezidivierende Folgeläsion eines bekannten Astrozytoms des WHO Grades II oder III, wobei die Dauer der Progression von Grad II zu IV etwa 5 Jahre, von Grad III zu IV etwa 2 Jahre beträgt. Der in diesem Fall als sekundäres Glioblastom bezeichnete Tumor betrifft überwiegend Patienten mittleren Alters ab dem 40. Lebensjahr. In über 95% aller Fälle wird ein primäres Glioblastom diagnostiziert, daher gilt das sekundäre als selten, jedoch ist die Unterscheidung nicht immer eindeutig zu treffen, da auch ein primäres Glioblastom bei Erstdiagnose durchaus aus einem vormals aufgrund fehlender klinischer Symptomatik nicht diagnostizierten langsam wachsenden Astrozytom niedrigeren Malignitätsgrades hervorgegangen sein kann (*Kleihues und Cavenee et al., 2000; Maher et al., 2001; Ohgaki et al., 2004; Ohgaki et al., 2005; Louis et al., 2007; Ohgaki und Kleihues et al., 2007*).

1.2.2. „Genotyp“ des Glioblastoms – Molekularbiologische Grundlagen und Diversifizierung

Die Unterscheidung zwischen zwei unterschiedlichen Wegen der Pathogenese eines Glioblastoms wurde erstmals von Scherer 1940 vorgeschlagen, dennoch dauerte es mehr als ein halbes Jahrhundert, bis heute primäres und sekundäres Glioblastom in ihrer molekularen Entstehung besser verstanden sind, wobei diese Diversifizierung nicht immer eindeutig getroffen werden kann. Interessanterweise wurde noch 1979 das Glioblastom nicht als Astrozytom, sondern als undifferenzierter embryonaler Tumor klassifiziert (*Scherer et al., 1940; Zülch et al., 1979; Peiffer und Kleihues et al., 1999*). Zunächst ist festzuhalten, daß zum Verständnis der Entstehung von Neoplasien grundsätzlich zwei Fragen von elementarem Interesse sind, zum einen die Frage nach der oder den Ursprungszelle(n), zum anderen das Nachvollziehen der Pathogenese, wann folglich welche Mutationen in welchen Zellen stattgefunden haben, mit welchen Auswirkungen auf das pathophysiologische Gleichgewicht im gesamten Tumor. Die Frage nach dem Ursprung zeichnet gerade in den letzten Jahren ein immer deutlicheres Bild, bei dem die Rolle der gewebespezifischen Stammzellen in adultem somatischen Gewebe in den Vordergrund rückt. Die mittlerweile für viele maligne Neoplasien gefundene Tatsache, daß nur eine vergleichsweise kleine Population an Zellen in der Lage ist, einen Tumor aufrecht zu erhalten, bedingt das sich momentan formende Konzept sogenannter Tumorstammzellen, deren Herkunft aus mutierten Stammzellen verstärkt diskutiert wird. So auch bei Hirntumoren und dem Glioblastom, bei denen man entsprechend von Hirntumor- oder Glioblastomstammzellen spricht. Die Identifizierung und bessere Charakterisierung dieser Zellen mag für die Zukunft ein wichtiger Ansatz sein, um ein besseres Verständnis für die Pathogenese und darauf basierender neuer möglicher Therapieansätze zu entwickeln (*Singh et al., 2004; Gunther et al., 2008; Westphal und Lamszus et al., 2009; Lamszus und Gunther et al., 2010*). Besser definiert ist die Pathogenese zumindest bezüglich der hierbei involvierten Gene, bei denen zwei verschiedene Typen unterschieden werden: Zum einen dominant wirkende Gene, bei denen bereits die Mutation eines Allels ausreicht, das Wachstum der Tumorzellen zu deregulieren und zu verstärken, diese werden als Proto-Onkogene bezeichnet (*Bishop et al., 1990*). Zum anderen die rezessiv wirkenden Tumorsuppressorgene, deren Produkte meistens das Zellwachstum inhibieren, und die erst bei Mutation oder Verlust beider Allele ihren regulierenden Einfluß verlieren (*Sherr et al., 2004*). Daher sind auch an der Entstehung des primären und sekundären Glioblastoms vielfältige unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung von Onkogenen und Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen beteiligt, die im Folgenden näher betrachtet werden. Sie betreffen unterschiedlichste Bereiche der Zellphysiologie wie die Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Migration oder inter- und intrazelluläre Kommunikation. Es hat sich gezeigt, daß trotz der vielfältig verschachtelten und miteinander verwobenen intrazellulären Signale die genetischen Veränderungen meistens drei verschiedene und für die Zelle wesentliche Regulationsstellen betreffen, den Zellzyklus über das Rb-

Protein (Retinoblastom-Protein), die DNA-Reparaturmechanismen über das p53-Protein und die intrazelluläre Signaltransduktion eines auto-, para-, juxta- oder endokrinen Signals über Rezeptortyrosinkinasen. Darüberhinaus lassen sich die Mechanismen der Tumorigenese zwei übergeordneten Bereichen zuordnen, zum einen epigenetischen Mechanismen wie das durch Methylierung hervorgerufene aberrante „Silencing“ von Genen, sowie die Mutationen, die dem Tumor die Neoangiogenese und die Invasion in das gesunde Gewebe ermöglicht (*Sanson, Thillet, und Hoang-Xuan et al., 2004; Ohgaki und Kleihues et al., 2007*). Letztere sollen zunächst kurz erörtert werden, um anschließend die drei wesentlichen Regulationsstellen näher zu beschreiben.

Epigenetische Veränderungen

Die Methylierung der DNA ist normalerweise ein physiologischer Prozess, bildet er nicht zuletzt die Grundlage der Inaktivierung eines X-Chromosoms in der Embryonalentwicklung der Mammalia (*Payer und Lee et al., 2008*). Bei der Tumorigenese kann nun durch aberrante Methylierung in den Promoterregionen von Tumorsuppressorgenen und die damit verbundene Inaktivierung eine maligne Transformation begünstigt werden. Dieses „Gen-Silencing“ geschieht vor allem an dem Nukleotid Cytosin im Bereich von sogenannten CpG-Inseln (Cluster aus Cytosin-Guanin Dinukleotiden) (*Jones und Baylin et al., 2002; Issa et al., 2004*). Ein Beispiel hierfür ist die MGMT (O-6-Methylguanin-Methyltransferase) codiert vom MGMT-Gen, ein Enzym, welches normalerweise spezifisch promutagene Methylgruppen von der O-6-Position des Nukleotids Guanin an der DNA entfernt, um so karzinogenen Einflüssen vorzubeugen. MGMT kann aber auch im eigenen Promoterbereich Ziel einer mutagenen Methylierung sein, so daß zum Beispiel chemotherapeutisch mit Temozolomid behandelte Patienten, welche solch eine Mutation tragen, besser auf das alkylierende Medikament ansprechen und dessen Tumor-hemmende Wirkung verstärkt wird. Gleichzeitig jedoch bedeutet die inaktivierte MGMT eine erhöhte Anfälligkeit der DNA für Punktmutationen, hier vor allem von Guanin zu Adenin, was wiederum gerade an wichtigen Regulationsstellen wie dem p53-Protein die prokanzerogene Wirkung erhöht. Neben p53 sind aber auch viele andere Gene Ziel der aberranten Methylierung, deren Wirkungsweise unten näher erläutert wird, unter anderem p16/INK4a (Related inhibitors of cyclin dependent kinase 4) und p14/ARF (Alternative reading frame of p16/INK4a) (*Esteller und Herman et al., 2004; Hegi et al., 2005; Ohgaki und Kleihues et al., 2007*).

Neoangiogenese / Invasion

In intakten Geweben unterliegt die Angiogenese, die Bildung neuer Kapillargefäße und größerer vaskulärer Strukturen, einer starken Regulation. So führt unter anderem Hypoxie über HIF-1 (Hypoxia inducible factor -1), einen durch Sauerstoffmangel sowie Ubiquitin-Ligasen und das Proteasom regulierten Transkriptionsfaktor, zur Aktivierung von Genen, die in die Bildung neuer Gefäße involviert sind, wie zum Beispiel die für den Vaskulären Wachstumsfaktor VEGF (Vascular endothelial growth factor) und seinen Rezeptor VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor). Der VEGFR ist ein Protein aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen, auf die unter 1.3 noch ausführlicher eingegangen werden wird (*Ferrara und Gerber et al., 2001; Smith, Robbins, und Ratcliffe et al., 2008*). Ebenso ist die Fähigkeit zur Migration nur auf wenige Zellen beschränkt, die im Rahmen ihrer physiologischen Prozesse unterschiedliche Gewebe infiltrieren müssen, wie zum Beispiel bei der Immunität oder inflammatorischen Prozessen (*Ridley et al., 2003*). Bei Tumoren, so auch gerade bei Glioblastomen sind diese beiden Prozesse der Neoangiogenese und Gewebsinfiltration stark dereguliert. So führt allein die verstärkte Proliferation der Tumorzellen zu einer hypoxischen Mikroumgebung, was über den Mechanismus von HIF-1 zur vermehrten Gefäßneubildung führt.

Diese kann aber die Sauerstoffversorgung des neoplastischen Gewebes erneut nicht sicherstellen, so daß es letztendlich zu unreguliertem Zelltod kommt, was sich histologisch in der Ausbildung nekrotischer Areale zeigt. In der Folge häufen sich die Tumorzellen, die im Rahmen der Tumorigenese migratorische Eigenschaften neu erworben haben, in den Randbereichen an, was in dem histologischen Bild einer hyperzellulären Zone, dem sogenannten „pseudopallisadenartigen Randwall“ beim Glioblastom sein Korrelat findet (Krek *et al.*, 2000; Kleihues *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Sanson, Thillet, und Hoang-Xuan *et al.*, 2004). Migratorische Fähigkeiten, welche durch verschiedenste Mutationen verursacht werden können, stellen die Grundlage für die diffuse Gewebsinfiltration dar, welche gerade für die hochmalignen Astrozytome typisch ist. Die für diese Eigenschaft wichtigen Gene sind vorwiegend solche, die die chemotaktischen und haptotaktischen Interaktionen zwischen Komponenten des Zytoskeletts wie Aktin, und Integrinen sowie Komponenten der EZM (extrazelluläre Matrix) steuern, unter anderem die Familie der MMP's (Matrix-Metalloproteinasen). Die MMP's können als Kollagenasen oder Gelatinasen zum einen die Migration begünstigen, indem sie den Durchgang durch die EZM erleichtern, oder aber auch als Membran-gebundene MMPs Wachstumsfaktoren durch proteolytische Spaltung aktivieren (Rao *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2003; Ulbricht *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003a; Preusser, Haberler, und Hainfellner *et al.*, 2006). Diese Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, hier vor allem Tyrosinkinase-Rezeptoren nehmen durch ihre mannigfaltigen Wege der intrazellulären Signaltransduktion selbst Einfluss auf die Gene die in die Neoangiogenese und Tumordinvasion involviert sind (El-Obeid *et al.*, 1997; Maity *et al.*, 2000; Berra, Pages, und Pouyssegur *et al.*, 2000; Lal *et al.*, 2002), auf einen wichtigen Vertreter dieser großen Gruppe, den EGFR (Epidermal growth factor receptor) wird in 1.5 detailliert eingegangen.

Zellzyklus / Rb-Protein

Der Zellzyklus, und hier insbesondere der Übergang von der G1 zur S-Phase wird durch Cycline und CDK's (Cyclin dependent kinase) reguliert (Hartwell *et al.*, 2002; Hunt *et al.*, 2002; Nurse *et al.*, 2002). Eine zentrale Rolle spielt hierbei das Produkt des RB1-Gens (Retinoblastom-Gen-1), einem Tumorsuppressorgen, welches in der Region des Chromosoms 13q14.1-q14.2 codiert wird, das pRb-Protein (Retinoblastoma-Protein). Dieses verhindert, daß beschädigte DNA repliziert wird, indem es den durch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie induzierten Übergang von der G1- zur S-Phase durch Komplexbildung inhibiert und somit reguliert. Die Komplexe aus Cyclin D und CDK4/6 sowie aus Cyclin E und CDK2 können das pRb-Protein phosphorylieren, und damit inaktivieren (Murphree und Benedict *et al.*, 1984; Nevins *et al.*, 2001). Die Komplexe aus Cyclinen und CDK's können wiederum durch Inhibitoren der CDK's, CKI's (Cyclin dependent kinases inhibitors) selber gehemmt werden. Hierzu gehören im Wesentlichen zwei bekannte Gruppen, die der INK4a/ARF-Familie auf Chromosom 9p21, wie p16/INK4a oder p14/ARF und die der cip1/kip1-Familie wie p21^{cip1/waf1}, p27^{kip1} oder p57^{kip2} (Sherr und Roberts *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2007). Diese stellen unter anderem auch eine Verbindung zur zweiten Regulationsstelle, dem p53-Protein her.

DNA-Schäden / p53-Protein

Das Protein p53 - entdeckt bereits 1979 (Lane und Crawford *et al.*, 1979) - welches auch „der Wächter des Genoms“ genannt wird, spielt bei der Überwachung von DNA-Schäden und den damit zusammenhängenden Reparaturmechanismen eine zentrale Rolle. Es wird durch das TP53-Gen, einem Tumorsuppressorgen auf Chromosom 17p13.1 codiert, und häuft sich in Zellen an, die vermehrt DNA-schädigenden Einflüssen ausgesetzt wurden. Seine Akkumulation und damit

verbundene Aktivität wird zum einen durch direkte äußere Einwirkungen auf die Zellstrukturen, wie z.B. schädigendes UV-Licht oder chemische Noxen, aber auch über andere Proteine reguliert (*Bogler et al., 1995*). Eine wichtige Rolle hierbei spielt Mdm2 (Murine double minute oncogene 2) – selbst ein Produkt der Gene, die durch p53 reguliert werden –, welches in normalen Zellen den Level an p53 niedrig hält, indem es durch Ubiquitinierung p53 kontinuierlich dem Abbau im Proteasom zuführt. Mdm2 wiederum unterliegt selbst der Kontrolle durch Proteine des Zellzyklus, wie z.B. p14/arf. Über die Aktivierung der Gene der cip1/kip1-Familie, die unter anderem das Protein p21^{cip1/waf1} auf Chromosom 6p21.2 codieren, welches die Komplexe aus Cyclin E/CDK2 oder Cyclin D/CDK4 inhibiert, kann p53 selbst Einfluß auf den Zellzyklus nehmen (*Momand et al., 1992; Oliner et al., 1992; Picksley und Lane et al., 1993; Zauberman et al., 1995; Stott et al., 1998; Kamijo et al., 1998*). Aber auch die Apoptose und die daran beteiligten Proteine sind das Ziel der Regulation von p53. So kann es z.B. durch Regulation der Proteine der Bcl-2-Familie (B-cell-lymphoma-2) wie Bax (Bcl-2-associated X protein) Einfluss nehmen auf die durch Caspasen (Cysteine-dependent aspartate-directed proteases) vermittelte apoptotische Kaskade des Apotosoms (*Miyashita et al., 1994; Miyashita und Reed et al., 1995; Riedl und Salvesen et al., 2007*). Darüberhinaus wird es durch vielfältige Kinasen wie z.B. die MAP-Kinasen (Mitogen activated protein kinases) phosphoryliert und Phosphatasen dephosphoryliert, die oftmals der Downstream-Effektor einer durch ein externes Signal und den entsprechenden Zelloberflächenrezeptor ausgelösten Signaltransduktionskaskade sind (*Ohgaki und Kleihues et al., 2007*).

Signaltransduktion / PTEN

Wie bereits zuvor erwähnt spielen Rezeptortyrosinkinasen bei der intrazellulären Signaltransduktion eine entscheidende Rolle. Da diese den Mittelpunkt dieser Arbeit bilden, und ausführlich unter 1.3 erläutert werden, soll hier nur in der Übersicht aufgezeigt werden, welche molekulargenetischen Alterationen für die Pathogenese des Glioblastoms und seine Diversifizierung wichtig sind. Grundsätzlich kann eine Dysregulation der Signaltransduktion entweder durch Überexpression des Rezeptor-Proteins und seines Liganden auftreten, wobei häufig ein autokriner Loop entsteht, oder aber durch Genamplifikation des Rezeptors und/oder seiner Mutation, was wiederum meist zur Überexpression des Rezeptorproteins führt, sowie im Falle des mutierten EGFR auch einen ligandenunabhängigen konstitutiv aktiven Rezeptor zur Folge haben kann. Die dritte Möglichkeit ist eine Störung der Weitergabe des intrazellulären Signals durch Veränderungen der hieran beteiligten Komponenten wie zum Beispiel das PTEN-Protein (Phosphatase and tensin homologue protein) (*Sanson, Thillet, und Hoang-Xuan et al., 2004*).

Autokrine Loops konnten gezeigt werden, unter anderem für den EGFR und seinen Liganden TGF- α (Transforming growth factor alpha), für PDGFR (Platelet derived growth factor receptor) und seinen Liganden PDGF, aber auch für intrazelluläre Enzyme des Phosphotyrosininteraktoms wie die Tyrosinphosphatase- ζ und ihren Liganden Pleiotropin (*Maxwell et al., 1990; Tang, Steck, und Yung et al., 1997; Ulbricht et al., 2003*). Eine Genamplifikation findet sich vor allem im Glioblastom häufig für den EGFR, der in den meisten Fällen außer als wT-EGFR (Wild type epidermal growth factor receptor) auch noch in diversen Mutationsvarianten vorkommt, am häufigsten jedoch in Verbindung mit der Variante EGFRvIII mit Liganden-unabhängiger konstitutiver Aktivität (*Libermann et al., 1985; Huang et al., 2007a*). Bei der intrazellulären Weitergabe des externen Signals kommt dem PTEN-Protein, codiert durch das PTEN-Gen auf Chromosom 10q23.31 eine elementare Bedeutung zu, es reguliert die Aktivität einer wichtigen Signaltransduktionskaskade, dem PI3K-Weg. Das Schlüsselenzym PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase) katalysiert die Umwandlung von PI(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol-4,5-

bisphosphate) zu $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate), einem wichtigen sekundären Botenstoff, der im weiteren Verlauf zur Aktivierung weiterer Proteinkinasen und schließlich Transkriptionsfaktoren führt, die Einfluß auf vielfältige zelluläre Prozesse nehmen. PTEN inhibiert nun diesen Signalweg, indem es als dual-spezifische Phosphatase $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ wieder zu $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ dephosphoryliert (Li et al., 1997; Maehama und Dixon et al., 1998; Dahia et al., 2000; Knobbe, Merlo, und Reifenberger et al., 2002).

Glioblastom Typ 1 und Typ 2

Basierend auf den oben genannten Grundlagen wird nun auf molekulargenetischer Ebene verstärkt eine Unterscheidung zweier verschiedener Entstehungswege des Glioblastoms diskutiert. Diese Unterscheidung hat dazu geführt, daß heute das primäre (Typ 1 oder „de novo“) und das sekundäre (Typ 2) Glioblastom als unterschiedliche Krankheitsformen angesehen werden, die Patienten unterschiedlichen Alters betreffen und sich in ihren RNA- und Protein-Expressionsprofilen sowie ihrem Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie unterscheiden (Godard et al., 2003; Furuta et al., 2004; Ohgaki et al., 2005; Tso et al., 2006; Ohgaki und Kleihues et al., 2007). Einen Überblick gibt Abbildung 1.2.2.A.

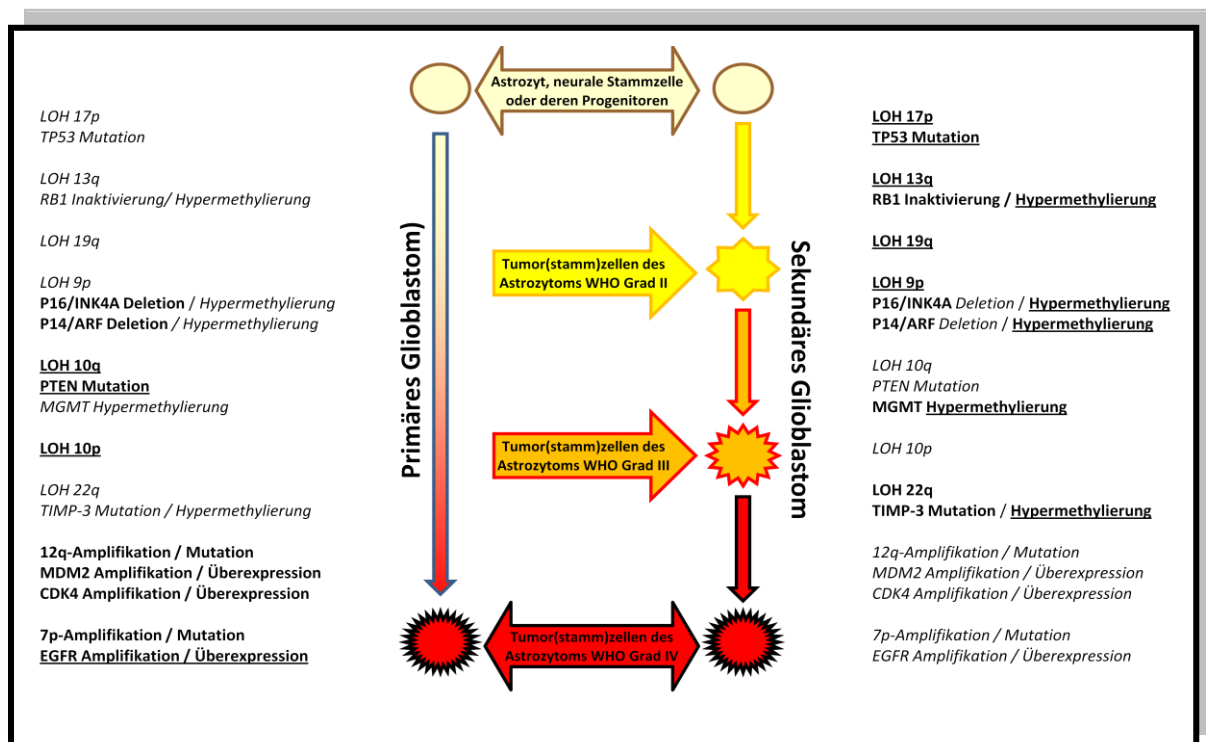


Abbildung 1.2.2.A: Darstellung der Entstehung des primären und sekundären Glioblastoms. Während sich das primäre ohne vorher bekannte Läsion „de novo“ zeigt, entsteht das sekundäre wahrscheinlich durch Progression aus vormals diagnostizierten Astrozytomen mit niedrigeren Malignitätsgraden. Links und rechts sind jeweils identisch die bekanntesten Mutationen aufgelistet, wobei diejenigen Veränderungen, die im Verlauf der Tumorigenese eher früher vermutet werden, weiter oben stehen, spätere entsprechend weiter unten. Desweiteren sind jeweils die Mutationen, die typisch und meist deutlich häufiger bei dem primären oder sekundären Glioblastom beobachtet werden, hervorgehoben und unterstrichen, und ihr entsprechend eher seltenes Auftreten bei dem jeweiligen Typ kursiv markiert. Einzelne Genveränderungen sind ihrem chromosomal Locus zugeordnet.

Typisch für das primäre Glioblastom ist die Amplifikation des EGFR-Gens, diese tritt in ca. 50% der Fälle zusammen mit einer spezifischen Mutation, dem EGFRvIII sowie mit einer Überexpression der entsprechenden Proteine auf. Diese Amplifikation findet sich – entsprechend dem Durchschnittsalter der Erkrankung – selten bei pädiatrischen Glioblastomen und Patienten unter 35 Jahren. Der LOH (Loss of heterozygosity) des Chromosoms 10, oder nur des kurzen p-Arms sind ebenfalls kennzeichnend für den Typ 1 des Tumors genauso wie Mutationen des PTEN-Gens auf Chromosom 10q23.31, wohingegen der LOH 10q korrespondierend mit der codierenden Region des PTEN-Gens bei beiden Typen gleich häufig auftritt, und auch insgesamt die häufigste genetische Aberration bei Glioblastomen ist. Da sich bei dem Typ 1 seltener eine TP53-Mutation findet, sind oftmals in den Tumoren, denen diese Mutation fehlt, in der Folge die Gene verändert, welche Alternativen zur TP53-Inaktivierung darstellen, wie z.B. die Amplifikation des MDM2- oder CDK4-Gens (*Reifenberger et al., 1993; Rasheed et al., 1995; Watanabe et al., 1996; Biernat et al., 1997a; Tohma et al., 1998; Ichimura et al., 1998; Fujisawa et al., 2000; Kraus et al., 2002; Ohgaki und Kleihues et al., 2007*).

Typisch für das sekundäre Glioblastom ist hingegen eine kontinuierliche Anhäufung von genetischen Veränderungen, beginnend mit dem LOH des kurzen p-Arms von Chromosom 17 und der korrespondierenden Mutation des TP53-Gens in den „Hotspot“-Codons 248 und 273 als frühem Ereignis in der Tumorigenese, diese findet sich bereits bei 2/3 aller Fälle eines Astrozytoms des WHO Grades II, aber auch höheren Malignitätsgraden. Die dann folgenden Mutationen lassen sich in ihrer zeitlichen Abfolge nicht eindeutig der Entstehung eines Astrozytoms des WHO Grades III oder des WHO Grades IV zuordnen, sondern nur näherungsweise dem früheren oder späteren Schritt der Pathogenese des sekundären Glioblastoms zuschreiben. So findet sich bereits ab dem WHO Grad III häufig ein LOH des Chromosoms 13q, entsprechend dem Genlocus des Rb-Proteins, sowie ein LOH des Chromosoms 9p, bei welchem aufgrund ihrer Lage unter anderem die Gene der p16/INK4a-Familie betroffen sind. Der LOH von 19q sowie von 22q sind auch noch deutlich häufiger bei anaplastischen Astrozytomen und sekundären Glioblastomen zu finden, insbesondere die Genloci 22q12.3 - 13.2 und 22q13.31 sind hier betroffen, auf denen unter anderem das Protein TIMP-3 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-3) codiert wird, einem Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen. Hingegen ist gerade der Verlust des langen q-Arms auf Chromosom 10 eher ein spätes Ereignis in der Entwicklung des WHO Grades IV, gleichbedeutend mit dem Genlocus des PTEN-Proteins. Genauso scheint die aberrante Methylierung bestimmter Promotoren in den betroffenen Genen wie für MGMT, p14/ARF, p16/INK4a und RB1 nicht nur ein spätes Ereignis, sondern auch charakteristisch für das sekundäre Glioblastom zu sein (*el-Azouzi et al., 1989; Watanabe et al., 1997; Biernat et al., 1997b; Nakamura et al., 2000; Nakamura et al., 2001a; Nakamura et al., 2001b; Nakamura et al., 2001c; Gonzalez-Gomez et al., 2003; Nakamura et al., 2005; Ohgaki und Kleihues et al., 2007*).

Welche molekulargenetischen Veränderungen in welchem Verhältnis bei der Entstehung von Gliomen sowie in der Tumorigenese der beiden Glioblastomtypen auftreten, ist ausführlich von (*Sehgal et al., 1998; Nozaki et al., 1999; Ohgaki und Kleihues et al., 2007*) diskutiert worden.

Umfangreichere RNA- und Protein-Expressionsanalysen lassen den Schluß zu, daß in die Entstehung von sekundären Glioblastomen eher die „loss of function“ Gene involviert sind, hier vor allem solche, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, und bei primären Glioblastomen eher die stromale Antwort eine Dysregulation aufweist, indem extrazelluläre Signale nicht korrekt transduziert werden können (*Godard et al., 2003; Furuta et al., 2004; Tso et al., 2006*), wie zum Beispiel durch Mutationen der Rezeptortyrosinkinasen, die nachstehend genauer erläutert werden.

1.3. Proteinkinasen und Rezeptortyrosinkinasen

Proteinkinasen sind Enzyme, welche in nahezu alle Bereiche der zellulären Funktionen sowohl während der Embryonalentwicklung als auch der adulten Homöostase involviert sind, sie kommen daher ubiquitär in allen Eukaryoten vor und sind der „Prototyp“ eines Onkogens, da ihre pathologische Überfunktion häufig mit der Entstehung maligner Prozesse assoziiert ist. Bisher sind über 500 verschiedene Proteine dieser Enzymklasse bekannt, die mehr als 30% der bekannten zellulären Proteine phosphorylieren können, die Gesamtheit dieser Phosphorylierungsprozesse wird auch als „Phosphoproteom“ oder „Kinom“ bezeichnet, in Anlehnung an das zelluläre „Proteom“, welches das Zusammenspiel aller Proteine einer Zelle beschreibt. Hieran zeigt sich die Bedeutung dieses post-translationalen Mechanismus in der Signaltransduktion der Zelle, bei dem die auch als Phosphoryltransferasen bezeichneten Enzyme meist die Übertragung der tertiären Phosphatgruppe von ATP (Adenosintriphosphat) auf die Hydroxylgruppe ihres Substrates katalysieren, hierdurch können unter anderem andere Enzyme oder Transkriptionsfaktoren aktiviert oder deaktiviert, oder auch deren subzelluläre Lokalisation verändert werden. Proteinkinasen unterliegen einer strengen und umfangreichen Regulation, unter anderem werden sie selbst durch andere Kinasen oder Phosphatasen aktiviert oder deaktiviert, sowie durch eine Vielzahl von Kofaktoren, wie z.B. cAMP (cyclic Adenosin monophosphate), cGMP (cyclic Guanosin monophosphate), DAG (Diacylglycerol), IP₃ (Inositol trisphosphate), Ca²⁺ und PI(3,4,5)P₃ beeinflusst (*Robinson, Wu, und Lin et al., 2000; Manning et al., 2002; Manning et al., 2005; Hubbard und Miller et al., 2007*).

Eine erste Einteilung gelingt durch das Substrat der Proteinkinasen, entsprechend der phosphorylierten Aminosäure. Neben den eher seltenen Histidinkinasen gibt es die beiden großen Gruppen der Serin/Threonin-Kinasen und Tyrosinkinasen, wobei es auch Enzyme gibt, die sowohl Serin- und Threonin- als auch Tyrosin-Reste erkennen, diese werden als dual-spezifische Proteinkinasen bezeichnet. Wichtige Vertreter der Serin/Threonin-Kinasen sind außer den CDK's und MAPK's vor allem die Proteinkinasen A, B (auch als Akt [„Ak“-class of mouse lymphomas „transforming retrovirus“ bezeichnet) und C, welche in den Signaltransduktionskaskaden der Zelle eine wichtige Rolle spielen, hierauf wird unter 1.5.1 noch detaillierter eingegangen (*KREBS, GRAVES, und Fischer et al., 1959; Robinson, Wu, und Lin et al., 2000; Capra et al., 2006*).

Die weitaus größte Gruppe aber bilden die nur bei Metazoen vorkommenden Tyrosinkinasen, die wiederum als Rezeptortyrosinkinasen oder Tyrosinkinasen vom Nicht-Rezeptor-Typ vorkommen. Bisher sind insgesamt 90 verschiedene Tyrosinkinasen bekannt, hiervon entfallen 58 auf die Familie der Rezeptortyrosinkinasen, die allesamt ein Transmembranrezeptor vom Typ 1 sind, d.h. sie haben nur eine einzige die äußere Zellmembran durchspannende Domäne. Desweiteren haben alle eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne sowie eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne, so daß sie sämtlichst durch die Bindung eines oder mehrerer Liganden und dadurch folgende Di- und Oligomerisierung aktiviert werden. Rezeptortyrosinkinasen sind allosterische Enzyme, daher werden durch eine Konformationsänderung des Rezeptors die Tyrosinkinasen der Di- und Oligomere angenähert, um so die dadurch freiliegenden Tyrosin-Reste des carboxyterminalen Endes am anderen Rezeptor (-trans-) oder am eigenen Rezeptor (-cis-) zu phosphorylieren. Die Phosphotyrosinreste sind danach Bindungsstelle für die SH2- (Src homology-2 domain) oder PTB- (Phosphotyrosine binding domain) Domäne von verschiedenen Adaptor-Proteinen, die an der folgenden Signaltransduktionskaskade beteiligt sind. Eine weitere Einteilung in Subklassen erfolgt nun an der Struktur der extrazellulären Domäne und den damit möglichen Liganden, so gibt es z.B. die Familie der IR (Insuline receptor), der FGFR (Fibroblast growth factor receptor), der VEGFR, der

PDGFR und der EGFR, letztere soll nun eingehender betrachtet werden (*Pawson et al., 1995; Robinson, Wu, und Lin et al., 2000; Robinson und Stringer et al., 2001; Mohammadi, Olsen, und Ibrahimi et al., 2005; Bublil und Yarden et al., 2007; Hubbard und Miller et al., 2007*).

1.4. Die Erb-B Familie

Die EGFR-Familie der Rezeptortyrosinkinasen wird auch als Erb-B-Familie bezeichnet, dieser Begriff leitet sich ab von der ursprünglich entdeckten Homologie der Proteinstruktur der Rezeptoren zum Produkt eines viralen Onkogens bei einer Leukämieform bei Vögeln, dem v-Erb-B-Onkogen (Viral avian erythroblastosis leukemia oncogen), hier ähnelt die Struktur einer mutierten Version des humanen EGFR, dem EGFRv1 (*Downward et al., 1984*). Die Erb-B-Familie umfasst neben dem wohl am umfassendsten untersuchten und zuerst charakterisierten Erb-B1 (EGFR) (*Carpenter, King, Jr., und Cohen et al., 1978*) in der Reihenfolge ihrer Entdeckung die Rezeptoren Erb-B2 (HER2/neu) (*Schechter et al., 1984*), Erb-B3 (*Kraus et al., 1989*) und Erb-B4 (*Plowman et al., 1993*). Erb-B2 spielt in der Therapie des Mamma-Karzinoms eine wichtige Rolle, da der gegen diesen Rezeptor gerichtete monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin) als Medikament in der Immuntherapie bei entsprechender Erb-B2-Überexpression die Prognose verbessern kann (*Slamon et al., 1989; Goldenberg et al., 1999; Pietras et al., 1999; Bublil und Yarden et al., 2007*).

Alle Erb-B-Rezeptoren teilen eine ähnliche Struktur, mit einer an 12 Stellen glykosilierten extrazellulären Domäne bestehend aus 2 Cystein-reichen Domänen sowie 2 Ligandenbindungsdomänen, die insgesamt in Ihrer Tertiärstruktur durch 25 Disulfidbrücken stabilisiert wird. An die darauf folgende Transmembrandomäne schließen sich die juxtamembrane und intrazelluläre Domäne an, letztere enthält bei allen Erb-B-Rezeptoren eine Tyrosinkinase-Domäne, sowie eine carboxyterminale Domäne mit den Autophosphorylierungsstellen. Innerhalb der Domänen zeigt sich in der Erb-B-Familie eine recht starke Sequenzvariabilität, zwischen 12% und 81%, wobei generell die Tyrosinkinasedomäne am stärksten konserviert ist, und die carboxyterminale Domäne die höchste Variabilität aufweist (*Garrett et al., 2002; Cho und Leahy et al., 2002; Jorissen et al., 2003; Garrett et al., 2003; Bouyain et al., 2005; Linggi und Carpenter et al., 2006*).

Die Liganden für die Erb-B-Rezeptoren gehören alle zur Familie der EGF-verwandten Peptid-Wachstumsfaktoren, die ihren Namen von dem schon 1960 zuerst entdeckten Vertreter, dem EGF (Epidermal growth factor) bezieht (*Cohen et al., 1986*), und deren gemeinsames Merkmal das Vorkommen einer oder mehrerer Wiederholungen der Konsensussequenz CX₇CX₄₋₅CX₁₀₋₁₃CXCX₈GXRC ist, dies wird auch als EGF-Motiv bezeichnet. Durch die über 3 Disulfidbrücken in der Kombination C1-C3, C2-C4 und C5-C6 verbundenen 6 Cysteinreste wird das Motiv auch in seiner räumlichen Anordnung konserviert und stabilisiert. Alle Liganden werden zunächst als Membran-gebundene Präkursorproteine in die Zellmembran eingebunden, und anschließend durch proteolytische Spaltung mittels Enzymen aus der Familie der Matrixmetalloproteinasen (hier vor allem solche der ADAM-Familie [A disintegrin and metalloprotease domain containing protein]) in ihre aktive lösliche Form gebracht. Je nachdem an welchen Rezeptor der Erb-B-Familie sie binden, kann man die Liganden in 3 Gruppen einteilen:

EGF, TGF- α , AR (Amphiregulin) und Epigen können nur spezifisch an Erb-B1 (EGFR) binden, HB-EGF (Heparin-binding-EGF), BTC (Betacellulin) und EPR (Epiregulin) können sowohl an Erb-B1 als auch an Erb-B4 binden, sind folglich dualspezifisch, und die Neureguline NRG-1, NRG-2, NRG-3 und NRG-4. Bei den letztgenannten können NRG-1 und NRG-2 nur an Erb-B3 und Erb-B4 binden, sowie NRG-3 und NRG-4 nur an Erb-B4. Bisher ist kein Ligand bekannt, der an Erb-B2 bindet (*Shoyab et al., 1988*;

Massague et al., 1990; Higashiyama et al., 1992; Massague und Pandiella et al., 1993; Toyoda et al., 1995; Yarden et al., 2001; Strachan et al., 2001; Harris, Chung, und Coffey et al., 2003; Blobel et al., 2005; Esper, Pankonin, und Loeb et al., 2006). Eine Übersicht gibt Abbildung 1.4.A.

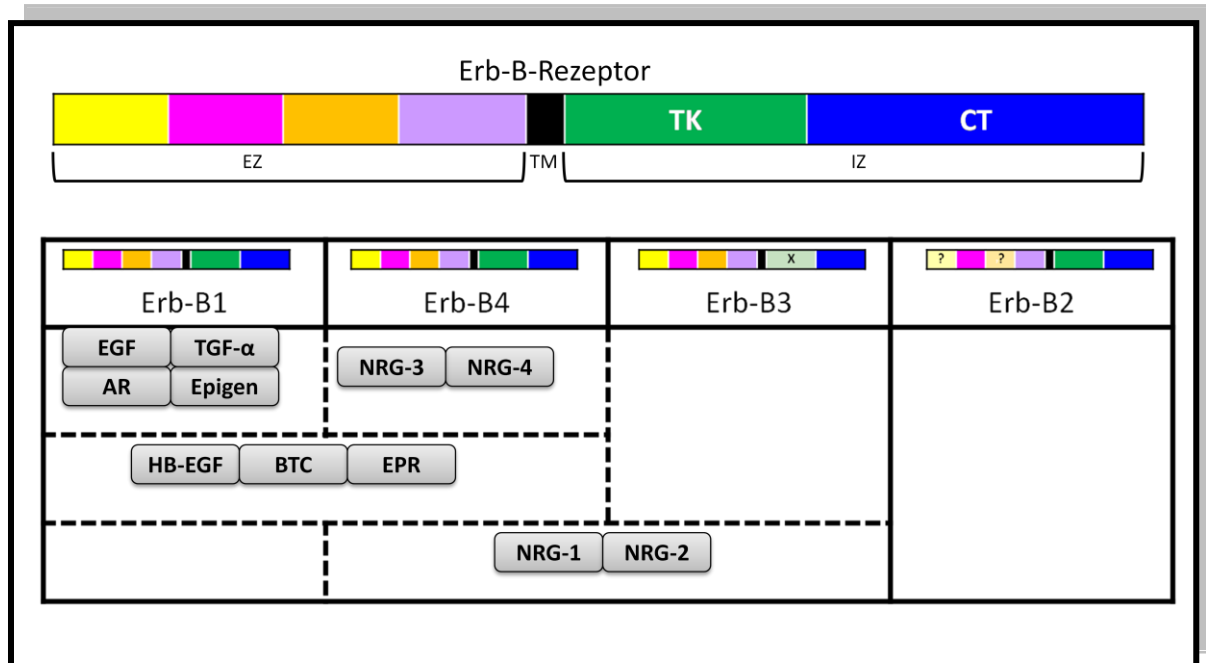


Abbildung 1.4.A: Oben: Schematische Darstellung der Protein- und Domänenstruktur der Erb-B-Rezeptorfamilie. Unten: Zuordnung der Liganden, welche jeweils nur an unterschiedliche Erb-B-Rezeptoren binden können, Einzelheiten siehe Text. Die Farbcodierung bedeutet: Gelb und orange=Ligandenbindungsdomänen L1 und L2, Magenta und violett=Cysteinreiche Domänen CR1 und CR2, Schwarz=Transmembrandomäne, Grün=Tyrosinkinasedomäne, Blau=Carboxyterminale Domäne. Die Abkürzungen bedeuten: EZ=Extrazelluläre Domäne, IZ=Intrazelluläre Domäne, TM=Transmembrandomäne, TK=Tyrosinkinase, CT=Carboxyterminaler Rest. Das „X“ in der Tyrosinkinasedomäne des Erb-B3-Rezeptors bezeichnet dessen funktionslose Kinase, die beiden „?“ in den Domänen L1 und L2 des Erb-B2-Rezeptors zeigen dessen Unfähigkeit, Liganden zu binden. Die grau markierten Liganden innerhalb der gestrichelten Zellen zeigen, welche Liganden an welchen Rezeptor binden können.

Da alle Rezeptortyrosinkinasen wie in 1.3 beschrieben durch Di- und Oligomerisierung aktiviert werden, was im Falle der Erb-B-Familie vor allem durch Homo- oder Heterodimerisierung der einzelnen Erb-B-Rezeptoren geschieht, sind für die einzelnen Liganden eine Vielzahl an unterschiedlichen Bindungsaffinitäten gegeben. Prinzipiell scheinen Homodimere ein stärkeres Signal zu generieren als Heterodimere. Desweiteren unterscheidet sich die Umsetzung der Liganden, so wird z.B. TGF- α schnell proteolytisch gespalten, hat eine kurze Halbwertszeit und wirkt vorwiegend auto- und parakrin, HB-EGF hingegen wird eher langsam proteolytisch gespalten, hat eine längere Halbwertszeit und wirkt vor allem juxtakrin. Zusammenfassend kann man sagen, daß die Aktivierung der Erb-B-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen vorwiegend durch die räumliche und zeitliche Expression ihrer Liganden sowie durch die unterschiedlichen Dimerisierungsoptionen und damit verbundene Ligandenaffinität gesteuert wird (Cochet et al., 1988; Ullrich und Schlessinger et al., 1990; Schlessinger und Ullrich et al., 1992; Peles und Yarden et al., 1993; Sliwkowski et al., 1994; Carraway, III und Cantley et al., 1994; Riese und Stern et al., 1998; Holbro, Civenni, und Hynes et al., 2003; Harris, Chung, und Coffey et al., 2003; Wong und Guillaud et al., 2004; Shilo et al., 2005). Auf

eine weitere Regulationsmöglichkeit, das Trafficking der Rezeptoren, wird weiter unten noch ausführlicher eingegangen.

Nach Aktivierung durch Ligandenbindung und Dimerisierung mit dem entsprechenden Partner werden die Autophosphorylierungsstellen in der carboxyterminalen Domäne der Erb-B-Rezeptoren phosphoryliert, und geben dadurch das extrazelluläre Signal über vielfältige Transduktionskaskaden weiter. Durch ihre mannigfaltigen Möglichkeiten der Transaktivierung z.B. durch andere Kinasen von Zytokinrezeptoren oder Januskinasen oder auch G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wirken sie auch als Signalintegratoren (*Yamauchi et al., 1997; Hackel et al., 1999; Zwick et al., 1999; Prenzel et al., 1999*).

Eine Besonderheit zeigt sich zum einen bei Erb-B2, da er keinen eigenen Liganden hat, ist er für die Signalgebung auf die Heterodimerbildung mit einem anderen Erb-B-Rezeptor angewiesen, für die er auch gleichzeitig der bevorzugte Bindungspartner ist, zum anderen hat Erb-B3 eine inaktive Tyrosinkinasedomäne, so daß auch dieser Rezeptor für die Autophosphorylierung auf andere Erb-B-Rezeptoren angewiesen ist. Darüberhinaus gibt es bei Erb-B4 alternative Splice-Varianten in der extrazellulären Domäne, durch die diese entweder proteolytisch abgespalten werden kann (Jmb-Variante) oder nicht (Jma-Variante), sowie in der intrazellulären carboxyterminalen Domäne, so daß Bindungsstellen für das Enzym PI3K entstehen (CYT-1-Variante) oder nicht (CYT-2-Variante) (*Karunagaran et al., 1996; Tzahar et al., 1996; Graus-Porta et al., 1997; Kim et al., 1998; Holbro, Civenni, und Hynes et al., 2003; Linggi und Carpenter et al., 2006*).

Die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne ist eine der Voraussetzungen für den Transport des aktiven Erb-B4-Rezeptors in den Nukleus, andere Erb-B-Mitglieder wie Erb-B1 (EGFR) werden über einen endozytotischen Prozess eingeschleust, mittlerweile konnte jedoch für alle Erb-B-Rezeptoren deren Anwesenheit im endonukleären Kompartiment nachgewiesen werden. Erb-B1 und Erb-B4 nehmen hier unter anderem Einfluß auf die Expression von Genen wie Cyclin D, iNOS, c-myc und COX-2 (*Ni et al., 2001; Sorkin und Von et al., 2002; Carpenter et al., 2003; Miaczynska, Pelkmans, und Zerial et al., 2004; Giri et al., 2005; Lo und Hung et al., 2006; Lo et al., 2006*).

Neben vielfältigen anderen pathologischen Prozessen, in die die Erb-B-Rezeptorfamilie involviert ist, wie die Rolle von Erb-B1 bei der Zytomegalie (*Wang et al., 2003b*), von Erb-B2 bei der infektiösen Lepra (*Tapinos, Ohnishi, und Rambukkana et al., 2006*) und von Erb-B4 bei der Schizophrenie (*Corfas, Roy, und Buxbaum et al., 2004; Hahn et al., 2006*), spielt sie vor allem bei neoplastischen Erkrankungen eine zentrale Rolle, indem sie Einfluß nehmen kann auf so wichtige Prozesse wie Zellproliferation, Apoptose, Migration und Invasion. Der Erb-B1-Rezeptor (EGFR) ist hier einer der wichtigsten Vertreter, daher soll er nun Gegenstand der weiteren Betrachtung sein, vor allem im Zusammenhang mit den pathophysiologischen Prozessen bei der Entstehung des Glioblastoms.

1.5. Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)

Die meisten Erkenntnisse über die Struktur und Physiologie des EGFR stammen aus Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*. Der EGFR oder Erb-B1 war einer der ersten Wachstumsfaktorrezeptoren, die bereits in den 70er Jahren entdeckt wurden. Wie bereits in 1.3 und 1.4 erläutert gehört er zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen, und teilt somit viele der im folgenden dargestellten strukturellen Eigenschaften mit anderen Rezeptoren dieser sehr großen Familie von Proteinkinasen.

1.5.1. Struktur und Physiologie

Das EGFR-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 7p12.3 – 12.1, und besteht aus 28 Exons, der Rezeptor wird als ein 1210 Aminosäuren langes Präkursorprotein synthetisiert, und danach N-terminal gespalten, so daß ein 1186 Aminosäuren langes Protein als Endprodukt entsteht. Nach umfangreicher ebenfalls N-terminaler Glykosilierung, welche einen großen Anteil am Molekulargewicht des fertigen Rezeptors von 170 kDa hat, wird der EGFR als Transmembranrezeptor in die Zellmembran eingebaut (Ullrich *et al.*, 1984; Thompson und Gill *et al.*, 1985; Slieker, Martensen, und Lane *et al.*, 1986; Fischer *et al.*, 1994; National Center for Biotechnology Information / U.S.National Library of Medicine *et al.*, 2001).

Die gesamte Polypeptidkette des EGFR lässt sich zum einen in einen extrazellulären Teil, einen Transmembranteil, sowie einen intrazellulären Teil gliedern, und diese 3 Teile können wiederum in Subdomänen unterteilt werden, in der Abbildung 1.5.1.A wurde versucht, die wichtigsten strukturellen Merkmale aufzuzeigen.

Extrazellulärer Teil

Die extrazelluläre oder auch Ektodomäne des EGFR gliedert sich in 4 Subdomänen, die beiden Ligandenbindungsdomänen I (Synonym: L-1, Exons 2-4, Aminosäuren 6-151) und III (Synonym: L-2, Exons 8-12, Aminosäuren 313-481) sowie die beiden Cystein-reichen Domänen II (Synonym: CR-1, Exons 5-7, Aminosäuren 152-312) und IV (Synonym: CR-2, Exons 13-16, Aminosäuren 482-621). Exon 1 codiert für das Signalpeptid, sowie für die ersten 5 Aminosäuren. Die Domänen I, II und III haben die tertiäre Konformation einer β -Helix, mit einer Sequenz-Homologie zu dem extrazellulären Teil des IGF-R (insulin-like-growth-factor receptor). Die räumliche Struktur der Ektodomäne beruht im Wesentlichen auf den aus kleineren Modulen aufgebauten und stark N-glykosilierten Domänen II und IV, die über Disulfidbindungen stabilisiert werden. Die Domäne II bildet einen Loop aus, der im Falle der Rezeptordimerisierung den Kontakt zur Domäne II des anderen EGFR herstellt. Die Liganden binden direkt zwischen den Domänen I und III wobei hierzu eine Konformationsänderung sowie das Schaffen einer hydrophoben Ligandenbindungstasche aus interkalierenden Tryptophan-Resten (hier sind insbesondere die stark konservierten Reste Trp176 und Trp492 wichtig) aller 4 Domänen notwendig ist (Garrett *et al.*, 1998; Elleman *et al.*, 2001; Garrett *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002; Jorissen *et al.*, 2003; Arjona *et al.*, 2005).

Transmembran- und juxtamembraner Teil

Die Polypeptidkette des EGFR durchspannt die Zellmembran wie alle Membran-ständigen Rezeptoren vom Typ I mit einer singulären α -Helix, deren hydrophobe Aminosäuren-Sequenz das Protein in der Membran verankert. Codiert wird die Transmembrandomäne durch den Anfangsbereich des Exons 17 entsprechend den Aminosäuren 622-644. Diese α -helicale Sequenz setzt sich in die juxtamembrane Domäne des EGFR fort, die scheinbar eine Reihe an regulatorischen Aufgaben erfüllt. So ist diese 43 Aminosäuren lange Domäne unter anderem involviert in die Regulation des Rezeptorlevels über dessen Internalisierung, sowie in die Assoziation mit Proteinen wie eps18, Calmodulin (an einer Reihe basischer Aminosäuren) oder der Proteinkinase C (über Thr654), wobei letztere auch die Tyrosinkinaseaktivität modulieren kann. Darüberhinaus spielt die juxtamembrane Domäne bei dem Trafficking der Rezeptoren, auf das weiter unten noch detaillierter eingegangen wird, eine wichtige Rolle. Hierzu zählt unter anderem das Sortieren des Rezeptors in Richtung des basolateralen Anteils der Zellmembran in vielen epithelialen und anderen polarisierten

Zellen, oder das Adressieren internalisierter Rezeptoren in Richtung Lysosom durch Di-Leucin-Motive bei den Aminosäuren 658-659 und 679-680 und einem P-X-X-P-Motiv bei den Aminosäuren 667-670 (Lin et al., 1986; Davis et al., 1988; Ullrich und Schlessinger et al., 1990; Castagnino et al., 1995; Rigby, Grant, und Shaw et al., 1998; Martin-Nieto und Villalobo et al., 1998; Kil und Carlin et al., 2000; He et al., 2002).

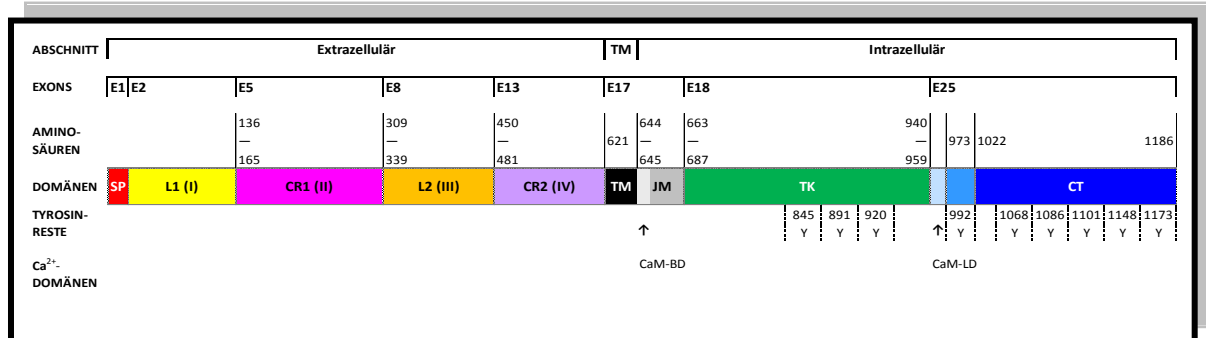


Abbildung 1.5.1.A: Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors (Erb-B1-Rezeptor). Die Domänenstruktur ist farbig markiert, entsprechend der schon in 1.4.A verwendeten Codierung. Hierbei bedeuten: Gelb und orange=Ligandenbindungsdomänen L1 und L2, Magenta und violett=Cysteinreiche Domänen CR1 und CR2, Schwarz=Transmembrandomäne, hellgrau=Calmodulin-bindende Domäne, dunkelgrau=Juxtamembrane Domäne, Grün=Tyrosinkinasedomäne, Türkis=Calmodulin-ähnliche Domäne, Blau=Carboxyterminale Domäne, wobei der vorgelagerte hellblaue Abschnitt wichtige Sequenzen für die Internalisierung des Rezeptors enthält. Die Abkürzungen bedeuten: TM=Transmembrandomäne, JM=Juxtamembrane Domäne, TK=Tyrosinkinase, CT=Carboxyterminaler Rest. Die Zeile „Exons“ zeigt jeweils das Erste der für den jeweiligen Abschnitt codierenden Exons, die Zeile „Aminosäuren“ zeigt den in der Literatur diskutierten Bereich der Aminosäurenreste, die jeweils den Anfang und das Ende der entsprechenden Domäne bilden, die Zeile „Tyrosinreste“ zeigt einige der Phosphotyrosinreste des Rezeptors und ihre Lokalisation innerhalb der Domänen, und die Zeile „Ca²⁺-Domänen“ zeigt die Lokalisation der für die Interaktion mit Calmodulin wichtigen Bereiche. Zusammengestellt aus (Frederick et al., 2000b; Jorissen et al., 2003; Zawrocki und Biernat et al., 2005; Nicholas et al., 2006; Linggi und Carpenter et al., 2006)

Intrazellulärer Teil

Der intrazelluläre Teil besteht neben dem juxtamembranen Bereich zum einen aus der Tyrosinkinase-Domäne, codiert durch die Exons 18-24 entsprechend den Aminosäuren 688-955, und zum anderen aus der carboxyterminalen Domäne, codiert durch die Exons 25-28 entsprechend den Aminosäuren 956-1186. Ebenfalls Bestandteil dieser Abschnitte sind die beiden kurzen Domänen CaM-LD, welche der Tyrosinkinasedomäne unmittelbar nachfolgt, und die CaM-BD, die dem juxtamembranen Teil direkt vorausgeht, beide sind an der Bindung von Calmodulin beteiligt. Die in ihrer Sequenz hochkonservierte Tyrosinkinase-Domäne teilt sich in einen an die juxtamembrane Domäne anschließenden N-Lobus, der in seiner globulären tertiären Konformation durch β -Faltblätter dominiert wird und nur eine α -Helix enthält, sowie einen ebenfalls globulären C-Lobus, der im Wesentlichen α -helicale Strukturen hat. Das im C-Lobus gebundene ATP-Molekül ist genau zwischen den beiden Lobi so positioniert, daß dessen γ -Phosphat auf ein entsprechendes Substrat übertragen werden kann. Diese Struktur ist homolog zu vielen anderen Proteinkinasen und den meisten Rezeptortyrosinkinasen. In der carboxyterminalen Domäne befinden sich die meisten Tyrosinreste, die das Ziel der Phosphorylierung bei Aktivierung und Signaltransduktion des Rezeptors sind (unter anderem: Tyr992, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1101, Tyr1148 und Tyr1173), einige Tyrosinreste sind jedoch

auch innerhalb der Kinasedomäne zu finden (unter anderem: Tyr845, Tyr891 und Tyr920). Daneben finden sich allerdings auch einige Serin- und Threonin-Reste, die nach entsprechender Phosphorylierung an der Regulation und Endozytose mitwirken. Die Aminosäurenreste 984-996 können Elemente des Zytoskeletts wie z.B. Aktin binden, und sind daher an der Oligomerisierung und Clusterung der aktivierten EGFR beteiligt (*den Hartigh et al., 1992; Hubbard et al., 1997; Stamos, Sliwkowski, und Eigenbrot et al., 2002; Jorissen et al., 2003; Zawrocki und Biernat et al., 2005; Zhang et al., 2006b*).

Aktivierung

Der EGFR kann wie unter 1.4 beschrieben die Liganden EGF, TGF- α , AR, Epigen, HB-EGF, BTC und EPR binden. Der Rezeptor liegt in seiner inaktiven Form sowohl als Monomer, aber auch als Heterodimer mit anderen Mitgliedern der Erb-B-Familie vor (*Olayioye et al., 2000; Sako, Minoghchi, und Yanagida et al., 2000; Moriki, Maruyama, und Maruyama et al., 2001*). Zumindest für EGF und TGF- α , welche auch als erste EGFR-Liganden beschrieben wurden (*Gray, Dull, und Ullrich et al., 1983; Derynck et al., 1984*), ist mittlerweile der Bindungsprozess aufgeklärt (*Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002*). Durch die Ligandenbindung zwischen der extrazellulären Domäne I und III (bei Homodimeren EGFR/EGFR sowie den Heterodimeren EGFR/Erb-B3 und EGFR/Erb-B4 binden 2 Liganden an gegenüberliegenden Stellen des Dimer-Moleküls, bei dem Heterodimer EGFR/Erb-B2 nur 1 Ligand) formt sich nun ein aktives Dimer, indem durch eine so bewirkte Konformationsänderung des Rezeptors das vorher durch die extrazelluläre Domäne IV verdeckte 10 Aminosäuren lange Dimerisationsmotiv des Loops der extrazellulären Domäne II Kontakt herstellt zum entsprechenden Motiv des Loops des anderen Dimerpartners (auch hier ist bei Erb-B2 wegen seiner Struktur der entsprechende Loop ständig exponiert). Dies bewirkt eine weitere Konformationsänderung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, so daß nun der C-Lobus des einen Dimerpartners Kontakt zum N-Lobus des anderen Dimerpartners herstellen kann, und letzteren damit aktiviert, so daß es im folgenden zur Autophosphorylierung der entsprechenden Tyrosinreste vor allem im carboxyterminalen Bereich kommt. Neben dieser trans-Autophosphorylierung des Rezeptors können jedoch auch exogene Substrate das Ziel der Tyrosinkinase sein, sowie auch die Tyrosinreste des Rezeptors durch externe Kinasen wie Src oder Jak-2 phosphoryliert werden können (*Yarden und Schlessinger et al., 1987; Honegger et al., 1989; Honegger et al., 1990; Tice et al., 1999; Ferguson et al., 2003; Dawson et al., 2005; Linggi und Carpenter et al., 2006; Zhang et al., 2006b*). Die Abbildung 1.5.1.B zeigt schematisch den Aktivierungsprozess des EGF-Rezeptors bei Bindung des Liganden EGF.

Die Phosphotyrosinreste sind nun das Ziel vielfältiger Adapter- und Signalproteine, wobei es im Gegensatz zu anderen Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. dem PDGFR keine spezifische Zuordnung von Tyrosinresten und Adaptorproteinen zu geben scheint, sondern vielmehr eine primäre und sekundäre Präferenz der einzelnen Proteine für die Bindung an bestimmte Tyrosinreste gegeben ist (*Linggi und Carpenter et al., 2006*). Das Grundprinzip dieses Phosphotyrosininteraktions versucht die Abbildung 1.5.1.C noch einmal zu verdeutlichen, wobei die Gesamtheit dieser Prozesse wesentlich umfangreicher ist (*Schulze, Deng, und Mann et al., 2005*). Hierdurch und durch weitere Unterschiede in der carboxyterminalen Domäne und den möglichen Liganden der Dimerpartner des EGFR resultiert ein umfangreiches Repertoire an möglichen Signaltransduktionskaskaden (*Hackel et al., 1999*), von denen im folgenden einige wichtige dargestellt werden sollen.

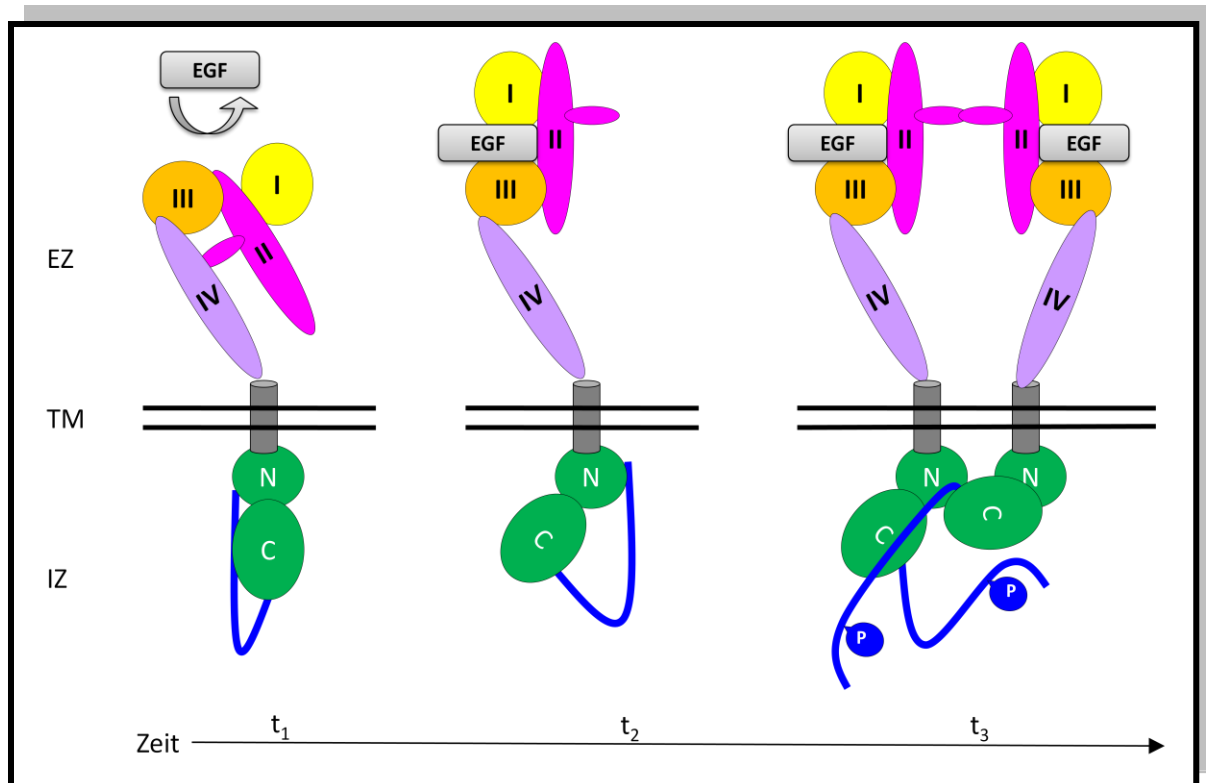


Abbildung 1.5.1.B: Schematische Darstellung der Aktivierung des EGF-Rezeptors durch Ligandenbindung und Dimerisierung mit entsprechender Konformationsänderung des Proteins. Zeitpunkt „ t_1 “: Der EGFR ohne Ligand als inaktives Monomer. Zeitpunkt „ t_2 “: Ligandenbindung an den EGFR löst eine erste Konformationsänderung des Monomers aus. Zeitpunkt „ t_3 “: Dimerbildung und Aktivierung des Rezeptors durch Autophosphorylierung. Die Farbcodierung folgt den Abbildungen 1.4.A und 1.5.1.A. Die Römischen Ziffern I-IV bezeichnen die extrazellulären Domänen, „N“ und „C“ sind die beiden globulären Subdomänen der Tyrosinkinase. „P“ bezeichnet einen Phosphotyrosinrest. Die Abkürzungen bedeuten: EZ=Extrazellulär, IZ=Intrazellulär, TM=Transmembranteil. Modifiziert nach (Linggi und Carpenter et al., 2006; Bublil und Yarden et al., 2007)

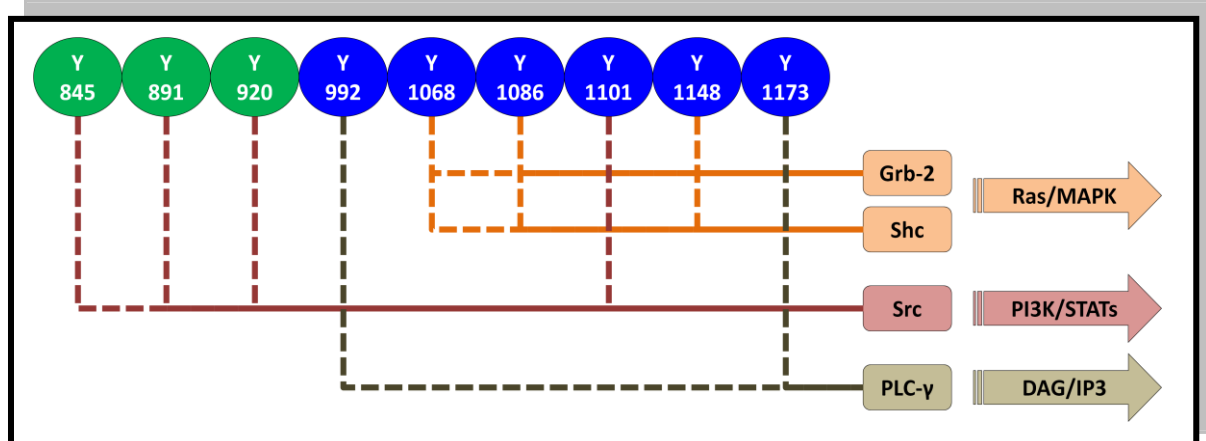


Abbildung 1.5.1.C: Darstellung der Interaktion einzelner Phosphotyrosinreste des EGF-Rezeptors mit den Proteinen einzelner Signaltransduktionskaskaden. Wie im Text beschrieben, können jeweils verschiedene Phosphotyrosinreste mit einem bestimmten Protein interagieren, so daß es keine spezifische Zuordnung gibt, sondern lediglich Präferenzen für die jeweilige Bindung. „Y“ in rundem Kreis=Phosphotyrosinrest der entsprechenden Aminosäure, Grün=innerhalb der Tyrosinkinasedomäne, Blau=innerhalb der Carboxyterminalen Domäne. Rechteck=Protein der entsprechenden Signaltransduktionskaskade (Pfeil). Orange=Ras/MAPK-Weg, Rot=PI3K-Weg und STAT vermitteltes Signal, Grau=PLC-γ-Weg.

Ras / MAP-Kinasen

Eine Schlüsselfunktion besitzt hier das Adaptorprotein Grb-2 (Growth-factor-bound-protein-2). Grb-2 ist im Cytosol lokalisiert, und kann nach Aktivierung des EGFR und der Autophosphorylierung entweder direkt über seine SH2 Domäne an die entsprechenden Phosphotyrosinreste (siehe Abbildung 1.5.1.C) des Rezeptors binden, oder aber indirekt über das phosphorylierte Adaptorprotein Shc (Src homology-2 domain containing protein), welches seinerseits über eine PTB-Domäne an die phosphorylierten Tyrosinreste des EGFR gebunden ist. Da Grb-2 andererseits permanent mit dem Protein m-Sos (Mammalian son of sevenless protein) assoziiert ist, welches ein Austauschfaktor für die GTPase Ras (Eine Abkürzung von: „Rat Sarcoma proteins“) ist, führt die durch die Bindung an den EGFR erfolgte Relokation des Grb-2/Shc/Sos-Komplexes an die Plasmamembran zum Austausch von inaktivem Ras-GDP mit dem aktiven Ras-GTP und somit zur Aktivierung von Ras. Die Ras-Familie an kleinen GTPasen beinhaltet eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen, die das Signal weiter transduzieren, unter anderem wird hierdurch Raf-1 (Synonym: c-Raf) aktiviert, eine Serin/Threonin-Kinase, die durch Phosphorylierung die MAP-Kinasen-Kaskade aktiviert, eine der bei Eukaryoten wichtigsten Signaltransduktionskaskaden von der Membran zum Nukleus, die schlussendlich vor allem über die MAP-Kinasen Erk-1 (Extracellular signal regulated kinases) und Erk-2 zur Aktivierung von nukleären Transkriptionsfaktoren führt. MAP-Kinasen regulieren wiederum über einen negativen Feedback-Loop die Aktivität von Ras, indem Sie den Grb-2/m-Sos-Komplex durch Phosphorylierung von m-Sos auflösen, und damit inhibieren (*Lowenstein et al., 1992; Hall et al., 1994; Batzer et al., 1994; Sasaoka et al., 1994; Hallberg, Rayter, und Downward et al., 1994; Johnson und Vaillancourt et al., 1994; Langlois et al., 1995; Jorissen et al., 2003*).

Phospholipid-Metabolismus / PI3K

Die Aktivierung des EGFR nimmt Einfluß auf nahezu alle Wege des Phospholipidmetabolismus in der Zelle, wobei der PI3K-Weg sicher eine Schlüsselfunktion einnimmt. Eine direkte Bindung an die Phosphotyrosinreste des aktivierten EGFR ist nur bei der eine SH2-Domäne enthaltenden PLC- γ gegeben, die PI(4,5)P₂ in die sekundären Botenstoffe IP₃ und DAG spaltet, wobei IP₃ zur Freisetzung von Ca²⁺ und damit verbundenen Aktivierung vieler Calcium-abhängiger Enzyme führt, und DAG einen Kofaktor der PKC (Proteinkinase C) darstellt, einer Serin/Threonin-Kinase, die in den Signaltransduktionskaskaden eine zentrale Schaltstelle ist. So aktiviert sie unter anderem eine Isoform der PLD (Phospholipase D), PLD-2, welche auch durch Rho, ein Mitglied der Ras-Familie oder PI(4,5)P₂ indirekt aktiviert werden kann. Hingegen wird die andere Isoform PLD-1 direkt durch die aktive Tyrosinkinase des EGFR phosphoryliert und aktiviert, beide Isoformen der PLD spalten Phosphatidylcholin in Cholin und den sekundären Botenstoff Phosphorsäure, welche im weiteren vor allem Sphingosin-Kinasen zur Zellmembran rekrutieren kann. Die wichtigste Rolle hingegen scheint die PI3K zu spielen, ein Enzym, welches entweder über eine vorausgegangene Phosphorylierung des EGFR durch das Adaptorprotein Src direkt an den EGFR binden kann, oder aber über seine p85-Untereinheit an das Y-X-X-M-Motiv des Erb-B3-Rezeptors in einem EGFR/Erb-B3 Heterodimer. Nach Aktivierung der PI3K wandelt diese PI(4,5)P₂ in PI(3,4,5)P₃ um, einen sekundären Botenstoff, welcher im weiteren Verlauf die Akt-Proteine (Synonym: PKB [Proteinkinase B]) phosphoryliert, Serin/Threonin-Kinasen welche über mTOR (Mammalian target of rapamycin), ebenfalls eine Serin/Threonin-Kinase, unter anderem Einfluß nehmen auf die ribosomale Translation z.B. über die p70-S6 Kinase oder eukaryotische Initiationsfaktoren, und auf Komponenten des Zytoskeletts. Darüberhinaus wird über PI3K durch die Akt-Kinasen auch die Zelladhäsion mittels β -Catenin und Cadherinen beeinflusst, sowie die Regulation der Apoptose durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B

(Jones et al., 1991; Shoelson et al., 1993; Stover et al., 1995; Kamat und Carpenter et al., 1997; Hellyer, Cheng, und Koland et al., 1998; Slaaby et al., 1998; Hofer, Berdeaux, und Martin et al., 1998; Porter und Vaillancourt et al., 1998; Houle und Bourgoin et al., 1999; Chattopadhyay et al., 1999; Brazil, Park, und Hemmings et al., 2002; Nicholson und Anderson et al., 2002; Cantley et al., 2002; Choe et al., 2003; Jorissen et al., 2003; Wullschleger, Loewith, und Hall et al., 2006).

Src / STAT's und Crosstalk

Die beiden oben dargestellten Signaltransduktionskaskaden zeigen, daß die Aktivierung des EGFR auf vielfältige Art und Weise geschehen kann, und die darauf folgenden Signale mannigfach verstärkt und inhibiert werden können und sich an gemeinsamen Schnittpunkten gegenseitig beeinflussen. Eine wichtige Funktion hierbei hat neben den oben bereits genannten Adaptorproteinen Grb-2 und Shc vor allem Src, welches durch Zusammenwirken mit mindestens 4 Tyrosinresten (Tyr845, Tyr891, Tyr920 und Tyr1101) nicht nur die Bindung von PI3K beeinflusst, sondern auch die über STAT's (Signal transducers and activators of transcription) vermittelten intrazellulären Signale. Diese ursprünglich bei den Zytokinrezeptoren gefundenen und im Zytosol lokalisierten inaktiven Transkriptionsfaktoren werden nach Aktivierung zum Nukleus transportiert, und beeinflussen dort in vielfältiger Weise die Genexpression. Anders als bei den Zytokinrezeptoren sind sie beim EGFR permanent mit diesem assoziiert, und werden nicht durch Januskinasen, sondern direkt durch die Tyrosinkinase des EGFR phosphoryliert und aktiviert, eine wichtige Rolle kommt hierbei vor allem STAT1, STAT3 und STAT5 zu (Zhong, Wen, und Darnell, Jr. et al., 1994; Stover et al., 1995; Lombardo, Consler, und Kassel et al., 1995; Park, Schaefer, und Nathans et al., 1996; David et al., 1996; Darnell, Jr. et al., 1997; Xia et al., 2002; Jorissen et al., 2003; Kloth et al., 2003).

Der „Crosstalk“, d.h. die gegenseitige Beeinflussung der Komponenten der EGFR-Signaltransduktion, wie zum Beispiel die Kreuz-Aktivierung über andere Rezeptoren oder die Aktivierung multipler Signalkaskaden durch einzelne Proteine ist ein wichtiges Element im Verständnis der Gesamtwirkung des EGFR. So kann er neben Kreuzreaktionen mit vielen anderen Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. dem PDGFR auch durch die Januskinasen der Zytokinrezeptoren oder des GH-Rezeptors (Growth-hormone-receptor) phosphoryliert und aktiviert werden (Yamauchi et al., 1997), aber auch indirekt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen wie ADAM-10 für eine verstärkte Ligandenfreisetzung sorgen, und somit die Aktivität des EGFR beeinflussen können (Zwick et al., 1999). Vielfältige Verknüpfungen der einzelnen Signalwege untereinander, wie der Einfluss der PKC auf die MAP-Kinase-Kaskade (Marais et al., 1998), oder der Akt-Proteine auf das p53 regulierende Protein Mdm2 (Jeong et al., 2005), oder aber der Einfluß des Transkriptionsfaktors mTOR auf die Aktivität der STAT-Proteine (Kristof et al., 2003) um nur einige wenige zu nennen, komplettieren das Bild der immer noch nicht vollständig verstandenen Interaktionen der Signalwege bei der Aktivierung des EGFR.

Trafficking

Neben den oben beschriebenen Wegen der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden spielt für das in seiner räumlichen und zeitlichen Wirkung integrierte Signal des EGFR auch seine Verteilung auf der Zellmembranoberfläche sowie zwischen der Oberfläche und intrazellulären Kompartimenten eine Rolle, sowie die Veränderung der zellulären Zyklen der Endozytose und Degradation oder des Recyclings des Rezeptors, Vorgänge die als „Trafficking“ zusammengefasst werden. Vor Ligandenbindung findet sich der EGFR vorwiegend in Mikrodomänen der Plasmamembran, den Caveolae, oder auch lipid-rafts. Diese vorwiegend aus Gangliosiden, Sphingomyelin und Cholesterol

in Verbindung mit den Caveolin-Proteinen bestehenden Membranteile machen nicht mehr als 10% der Gesamtfläche der Plasmamembran aus, enthalten aber ca. 60% aller EGFR, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind (etwa 80-90% des zellulären EGFR-Pools), und stehen in einem ständigen Austausch mit der übrigen Plasmamembran. Normalerweise wird etwa 1-2% dieses EGFR-Pools pro Minute außerhalb der Caveolae internalisiert und auch durch Recycling oder Neuproduktion wieder exprimiert. Bei Ligandenbindung verändert sich dieses dynamische System. Zum einen wandern die Liganden-gebundenen EGFR verstärkt aus den Caveolae zu den übrigen Membranteilen, wo sie über Clathrin-coated-pits endozytiert werden, zum anderen steigt die Rate der Internalisierung um den Faktor 5-10 an. Dies ist allerdings nur bei dem EGFR der Fall, alle anderen Erb-B-Rezeptoren zeigen zwar eine geringere Halbwertszeit, aber keinerlei Veränderung der Internalisierungsrate bei Aktivierung. Nach der ursprünglich nur der Desensitivierung des Rezeptorsignals zugeschriebenen Internalisierung wird der EGFR über die endosomalen Kompartimente entweder der Degradation im Lysosom oder Proteasom zugeführt, oder aber an die Zelloberfläche recycelt. Während des kompletten endosomalen Weges bleibt ein Teil der Rezeptoren jedoch zum einen mit Liganden verbunden, zum anderen mit vielen der oben genannten Adaptorproteinen assoziiert, was nach neueren Studien ein nach der Endozytose fortbestehendes EGFR-Signal nahelegt, welches offensichtlich bis zum möglichen Transport des EGFR in den Nukleus fortbestehen kann. Hier scheinen die über PI3K und PLC- γ vermittelten Signaltransduktionskaskaden eher von den an der Zellmembranoberfläche lokalisierten EGFR auszugehen, und die Ras-vermittelte MAP-Kinase-Kaskade verstärkt aus dem endosomalen Kompartiment. Eine wichtige Rolle für die Lokalisation des EGFR in Caveolae, seiner Endozytose, sowie seiner Degradation oder seinem Recycling spielt neben den Cholesterol-bindenden Caveolinen vor allem die oben bereits angesprochene juxtamembrane Domäne des EGFR unter anderem über die Phosphorylierung von Thr654 durch die PKC, die EGFR-vermittelte Phosphorylierung von Eps-Proteinen (EGFR protein substrates) sowie die dem lysosomalen Weg zugeordneten Di-Leucin Motive in diesem Bereich des Rezeptors (*Huang et al., 1990; French et al., 1994; Baulida et al., 1996; Couet, Sargiacomo, und Lisanti et al., 1997; Alexander et al., 1998; Anderson et al., 1998; Smart et al., 1999; Mineo, Gill, und Anderson et al., 1999; Torrisi et al., 1999; Sorkina et al., 1999; Carpenter et al., 2000; Burke, Schooler, und Wiley et al., 2001; Haugh und Meyer et al., 2002; Wiley et al., 2003; Miaczynska, Pelkmans, und Zerial et al., 2004*).

Zusammenfassend zeigt sich, daß das integrierte EGFR-Signal Einfluß nimmt auf nahezu alle fundamentalen zellulären Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Motilität und Apoptose, so daß pathophysiologische Veränderungen in diesem Bereich gravierende Krankheiten wie zum Beispiel mannigfaltige Neoplasien nach sich ziehen können (*Salomon et al., 1995*). Dies soll nun im Zusammenhang mit der Entstehung des Glioblastoms näher erläutert werden.

1.5.2. Pathophysiologie und Therapieansätze

Grundsätzlich gibt es mehrere Wege, über die eine Dysregulation des komplexen EGFR-Netzwerkes in der Entwicklung maligner Tumore zustande kommen kann. Eine Möglichkeit ist die pathologisch verstärkte Protein-Expression des normalen wt-EGFR, meist verursacht durch Gen-Amplifikation, häufig finden sich aber auch Mutationen des wt-EGFR-Gens, die durch strukturelle Veränderungen des Rezeptors eine pathophysiologische Veränderung seines Signals bewirken. Darüberhinaus kann über eine Veränderung der Proteinexpression der EGFR-Liganden und die damit verbundene Entwicklung autokriner Loops zwischen Überexpression von Ligand und Rezeptor die normale Signaltransduktion des EGFR beeinflußt werden. All diese Mechanismen sind nicht unabhängig

voneinander, sondern treten in den allermeisten Fällen zusammen auf und finden sich in einer Vielzahl verschiedenster maligner Neoplasien (*Garcia, I et al., 1993; Moscatello et al., 1995; Wikstrand et al., 1995*), so auch in Gliomen.

Protein-Expression und Gen-Mutationen

In den Neuron- und Gliazellen des normalen Hirngewebes findet sich keinerlei verstärkte Expression des wt-EGFR sowie keinerlei strukturelle Veränderung des EGFR-Gens (*Ekstrand et al., 1991; Feldkamp et al., 1999*), der Rezeptorlevel beträgt hier etwa 40.000 – 100.000 Rezeptoren pro Zelle (*Carpenter und Cohen et al., 1979*), in malignen Tumoren kann sich dieser Level auf mehrere Millionen Rezeptoren pro Zelle erhöhen (*Ennis, Lippman, und Dickson et al., 1991; Wikstrand et al., 1997*). Die häufigste Ursache für die verstärkte Protein-Expression des wt-EGFR ist eine Amplifikation des Gens auf Chromosom 7 (*Wullich et al., 1994*), welche in 30-50% aller Glioblastome und einem kleineren Teil der anaplastischen Astrozytome des WHO Grades III zu finden ist, und zuerst von (*Libermann et al., 1985*) entdeckt wurde. Nahezu alle Glioblastome mit Genamplifikation zeigen auch eine verstärkte Expression der mRNA sowie des EGFR-Proteins (*Wong et al., 1987; Chaffanet et al., 1992*), jedoch ist die EGFR-Genamplifikation keine notwendige Voraussetzung für die verstärkte mRNA- und Protein-Expression (*Tohma et al., 1998; Worm, Dabbagh, und Schwechheimer et al., 1999*). In den allermeisten Fällen der Glioblastome mit EGFR-Genamplifikation findet sich auch eine strukturelle Veränderung des amplifizierten Gens – wahrscheinlich als sekundäres Ereignis auf die vorhergehende Amplifikation des wt-EGFR-Gens folgend – einige dieser Mutationen wurden bereits Ende der 80er Jahre entdeckt (*Humphrey et al., 1988; Malden et al., 1988; Yamazaki et al., 1988; Steck et al., 1988; Chen et al., 1989; Bigner et al., 1990; Yamazaki et al., 1990; Wells et al., 1990; Ekstrand et al., 1991; Humphrey et al., 1991; Ekstrand et al., 1992*), und umfassen heute 9 bekannte Varianten, die bisher ausschließlich die extra- und intrazellulären Domänen betreffen, nicht jedoch die Transmembrandomäne. Neben vielfältigen Punktmutationen treten hier vor allem Deletionen und Duplikationen auf, die im folgenden detaillierter beschrieben werden sollen (*Frederick et al., 2000b; Kuan, Wikstrand, und Bigner et al., 2001; Arjona et al., 2005*): Die Mutationen, die als EGFRvI, EGFRvII und EGFRvIII sowie EGFRvIII/Δ12-13 und EGFR.TDM/2-7 bezeichnet werden, beinhalten Veränderungen der extrazellulären Domäne, die Varianten EGFRvIV, EGFRvV, EGFR.TDM/18-25 und EGFR.TDM/18-26 stellen Veränderungen der intrazellulären Domäne dar. Eine grafische Übersicht gibt die Abbildung 1.5.2. Den intrazellulären Mutationen fehlt im Falle von EGFRvIV die Aminosäuresequenz Δ959-1030 der carboxyterminalen Domäne, bei EGFRvV fehlt das komplette Ende des Polypeptids ab der Aminosäure 958, auch hier ist nur die carboxyterminale nicht jedoch die Tyrosinkinase-Domäne betroffen, wohingegen diese bei den Varianten EGFR.TDM/18-25 und EGFR.TDM/18-26, die jeweils eine Tandem-Duplikation der Aminosäuresequenzen Δ664-1014 (entsprechend den Exons 18-25) beziehungsweise Δ664-1030 (entsprechend den Exons 18-26) zusammen mit einem Teil der Calmodulin-bindenden Internalisierungssequenz betroffen ist. Ebenfalls eine Tandemduplikation, jedoch mit der Aminosäuresequenz Δ6-273 (entsprechend den Exons 2-7) stellt die extrazelluläre Mutation EGFR.TDM/2-7 dar, die genau wie die Variante EGFRvI, die dem bereits unter 1.4 erwähnten v-Erb-B-Onkogen strukturell homolog ist und der der komplette Anfang des Polypeptids bis zur Aminosäure 542 fehlt, vor allem die Ligandenbindungsdomänen beeinflusst. Zusammen mit der Variante EGFRvII, die eine kurze Deletion der Aminosäuresequenz Δ521-603 (entsprechend den Exons 14-15) zeigt, treten alle bisher genannten Mutationen beim Glioblastom eher selten auf, die weitaus häufigste Mutation ist hingegen EGFRvIII (*Voldborg et al., 1997; Nicholas et al., 2006*). EGFRvIII, welche sich bei ca. 50% aller Glioblastome mit EGFR-Genamplifikation findet und bereits in den 90er Jahren von (*Nishikawa et al., 1994*) als tumorigen

erkannt wurde, zeigt eine 267 Aminosäuren lange Deletion der Aminosäuresequenz $\Delta 6-273$ (entsprechend den Exons 2-7, codiert durch eine 801 Basenpaare lange Nukleotidsequenz der Nukleotide $\Delta 275-1075$) in der extrazellulären Domäne, die zum Verlust der Ligandenbindungsfähigkeit führt (Sugawa et al., 1990; Wong et al., 1992; Ekstrand et al., 1994; Schwechheimer, Huang, und Cavenee et al., 1995; Wikstrand et al., 1998). Als Ursache hierfür wird die Rekombination hochrepetetiver Alu-Sequenzen in den Introns 1-7 diskutiert (Frederick et al., 2000a; Arjona et al., 2005).

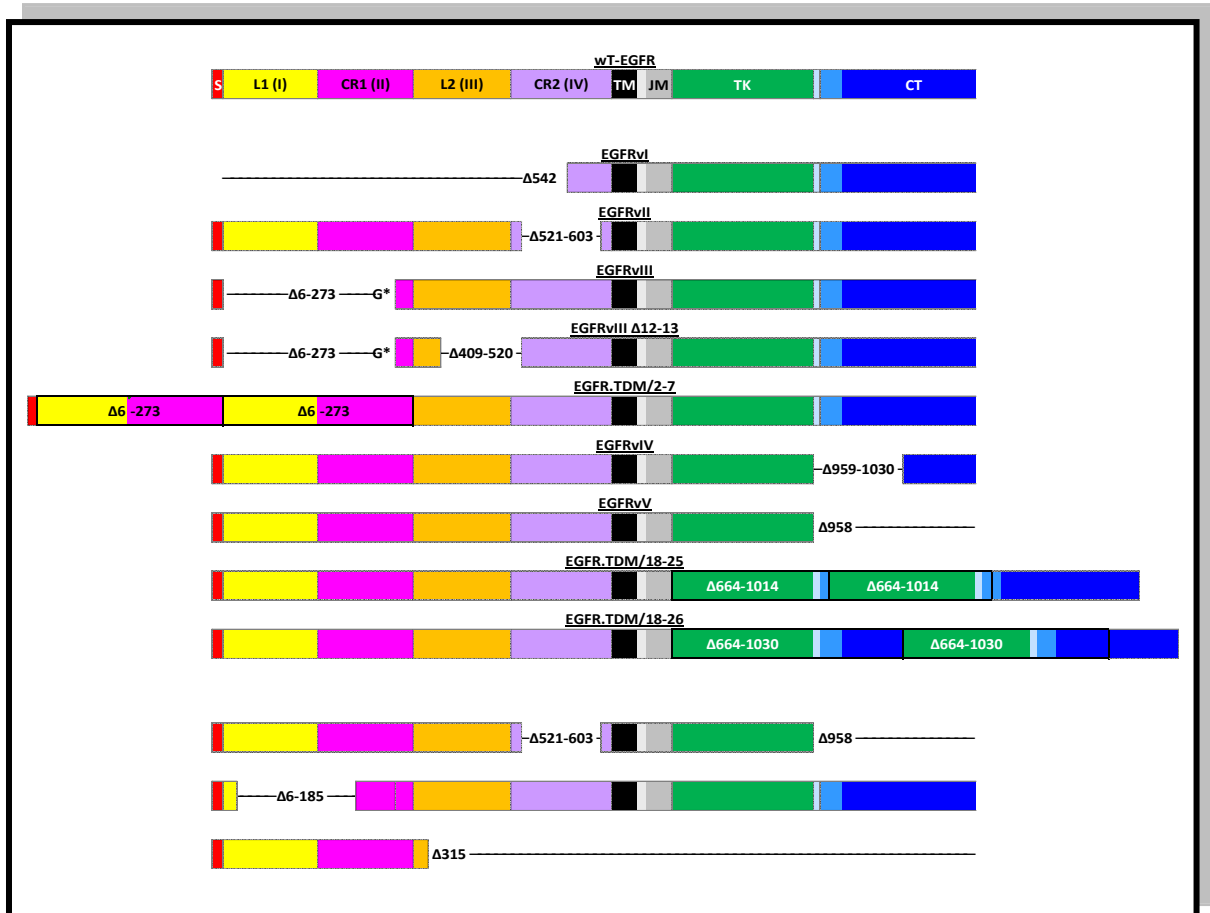


Abbildung 1.5.2: Übersicht über die Mutationsvarianten des EGF-Rezeptors. Das Farbschema und die Abkürzungen folgen den Abbildungen 1.4.A und 1.5.1.A und B. In der obersten Zeile wird der Wildtyp des EGF-Rezeptors gezeigt (wt-EGFR), in den 9 nachfolgenden Zeilen von oben nach unten zunächst die 5 bekannten extrazellulären Mutationen, danach die 4 bekannten intrazellulären. Die letzten 3 Zeilen enthalten die von den beiden Autoren Frederick et al. und Arjona et al. beschriebenen zusätzlichen Varianten, die bisher keinen speziellen Namen tragen. Modifiziert und zusammengefasst nach (Frederick et al., 2000b; Kuan, Wikstrand, und Bigner et al., 2001; Arjona et al., 2005)

wt-EGFR und EGFRvIII

EGFRvIII ist meist kontinuierlich dimerisiert, und zeigt zumindest als Homodimer EGFRvIII/EGFRvIII eine ähnliche Tyrosinkinaseaktivität wie der wt-EGFR (Fernandes, Cohen, und Bishayee et al., 2001), der fast immer mit dem EGFRvIII koamplifiziert und koexprimiert vorliegt (Biernat et al., 2004; Arjona et al., 2005), und dessen Phosphorylierungsmuster und subzelluläre Lokalisation der von EGFRvIII gleicht (Wikstrand et al., 1997). Durch Änderungen der tertiären extrazellulären Konformation scheinen auch die intrazellulären Domänen betroffen, so daß der EGFRvIII nur verzögert internalisiert

wird, und dadurch seine ohnehin schon vorhandene ligandenunabhängige konstitutive enzymatische Aktivität zusätzlich verlängert wirksam wird, scheinbar ein wichtiger Faktor für sein gegenüber dem wt-EGFR deutlich erhöhtes tumorigenes Potential (*Huang et al., 1997*). Ein weiterer Mechanismus der Tumorigenität des EGFRvIII ist offenbar seine Sekretion in das extrazelluläre Mikro-Milieu, dies geschieht zum einen durch direkte Exozytose dieses Proteins wie auch anderer aberranter EGFR-Transkripte (*Ullrich et al., 1984; Reiter und Maihle et al., 1996*), zum anderen über Mikrovesikel, kleine von Tumorzellen sezernierte Membranvesikel, die den defekten Tyrosinkinase-Rezeptor ebenfalls in Lipid rafts geclustert haben und mit anderen Zellen wieder fusionieren können (*Al-Nedawi et al., 2008*). Dies wäre ein neuer Prozess der horizontalen Weitergabe der Mutation an gesunde Zellen der Umgebung, neben den bisher bekannten interzellulären Interaktionen wie die phagozytotische Aufnahme von DNA-Resten aus apoptotischen Krebszellen (*Bergsmedh et al., 2001*) und diversen parakrinen Effekten. EGFRvIII ist nicht beschränkt auf das Glioblastom, sondern auch bei Mamma-Karzinomen, Ovarial-Karzinomen, Lungen-Tumoren und Prostata-Karzinomen gefunden worden (*Garcia, I et al., 1993; Moscatello et al., 1995; Wikstrand et al., 1995; Ge, Gong, und Tang et al., 2002; Okamoto et al., 2003*). Sowohl bei dem wt-EGFR als auch dem EGFRvIII spielt die pathophysiologische Aktivierung der PI3K-Signalwege einerseits und der MAP-Kinasen-Kaskade über Ras andererseits in der Entstehung des Glioblastoms eine zentrale Rolle (*Porter und Vaillancourt et al., 1998; Wells et al., 2000*). So nimmt eine verstärkte Aktivierung der PI3K über die Akt-Kinasen unter anderem einen negativen Einfluß auf die Expression von β -Catenin und Cadherinen, die in der Zelladhäsion eine wichtige Funktion haben, und kann dadurch zur Invasion und Metastasierung in das umliegende Gewebe beitragen. Desweiteren kann durch übermäßige Aktivität der PI3K wiederum über den Akt-Signalweg und mittels des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Expression des mitochondrialen Proteins Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) hochreguliert werden, was die Apoptose der Tumorzellen inhibiert, und wahrscheinlich mit ein Grund für die verstärkte Radio- und Chemoresistenz des Glioblastoms ist (*Nagane et al., 1996; Nagane et al., 1998; Datta, Brunet, und Greenberg et al., 1999*). Der Effekt von PI3K auf das den Zellzyklus regulierende Protein p27 ist gleichermaßen wichtig (*Narita et al., 2002*), und bereits diese wenigen Beispiele verdeutlichen die vielfältigen Wirkungen, die eine Dysregulation der PI3K-Kaskaden auf die Homöostase der Zelle hat (*Choe et al., 2003*). Gleiches gilt für die durch Ras vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade. Die Proteine der Ras-Familie unterliegen im Glioblastom selten einer direkten Mutation, so daß eine pathologische Veränderung dieses Signalweges meistens über die oben genannten Modifikationen des EGFR und anderer Rezeptortyrosinkinasen zustande kommt (*Feldkamp, Lau, und Guha et al., 1997; Sanson, Thillet, und Hoang-Xuan et al., 2004*). Die verstärkte Aktivierung von Ras und damit verbundener MAP-Kinasen hat unter anderem eine Wirkung auf die durch Integrine vermittelte Invasivität von Tumorzellen (*Hughes et al., 1997*), sowie auf deren Proliferation vor allem bei konstitutiver Aktivierung und damit permanentem mitotischen Einfluß auf den Nukleus (*Prigent et al., 1996*). Sowohl die PI3K-Kaskade, als auch die MAP-Kinase-Kaskade sind auch in die Neoangiogenese des Tumors involviert, da sie die Expression von VEGF verstärken können (*Schreiber, Winkler, und Derynck et al., 1986; Maity et al., 2000*). Obwohl all diese pathophysiologischen Vorgänge vom wt-EGFR wie auch von der Variante EGFRvIII induziert werden können, zeigen sich trotzdem Unterschiede zwischen beiden. Während bei einer Überexpression des wt-EGFR verschiedene Signaltransduktionswege eher gleichmäßig verstärkt werden, wie zum Beispiel die Wege über STAT's, über MAPK's oder die PI3K, wird bei einer Expression der EGFRvIII-Mutante bei steigenden Rezeptorzahlen der PI3K-Weg bevorzugt (*Huang et al., 2007a; Huang et al., 2007b*). Dies mag eine Ursache dafür sein, daß der Level der EGFRvIII Expression direkt proportional zu seiner Tumorigenität in vivo ist (*Johns et al., 2007*). Darüberhinaus haben der wt-EGFR und EGFRvIII

unterschiedliche Expressionsprofile bezüglich der durch ihr Signal beeinflussten Gene. Das Spektrum der aktivierten Gene des wt-EGFR ist sehr breit, es reicht von Proliferation, über Wachstumshemmung und Immunmodulation bis hin zum Stoffwechsel, hingegen ist das Spektrum der von EGFRvIII aktivierten Gene im Vergleich eher klein, hier sind es vor allem spezifisch solche für Chemotaxis, Angiogenese und Invasion (*Ramnarain et al., 2006*), letzteres vor allem mittels verstärkter Expression von MMP's (*Lal et al., 2002*). Häufig können die Gene, die dem Einfluß des EGFRvIII unterliegen, vom wt-EGFR nicht direkt aktiviert werden, wie zum Beispiel bei den Genen für die beiden Liganden TGF- α und HB-EGF. Dies läßt vermuten, daß die EGFRvIII Mutante an der Ausbildung der in Glioblastomen beschriebenen autokrinen Loops beteiligt ist, indem sie die Expression der Liganden für den wt-EGFR verstärkt (*Ramnarain et al., 2006*). Die Bedeutung solcher autokriner Loops in der Pathogenese des Glioblastoms und anderer maligner Tumore wurde schon früh erkannt (*Steck et al., 1988; Nister et al., 1988; Ullrich und Schlessinger et al., 1990*), da sie die Proliferation der Tumorzellen weitestgehend unabhängig von der physiologischen Wachstumsfaktorproduktion des umgebenden Gewebes machen. Dadurch daß eine Zelle sowohl Ligand wie auch den zugehörigen Rezeptor verstärkt exprimiert, oder Liganden-produzierende Zellen den Rezeptor-exprimierenden Zellen direkt benachbart sind, kann durch autokrine oder parakrine Stimulation vor allem des TGF- α /EGFR und des HB-EGF/EGFR Systems die fortschreitende pathologische Entwicklung vorangetrieben werden (*Tang, Steck, und Yung et al., 1997; Mishima et al., 1998*). Dies scheint insbesondere bei Rezidivtumoren eine der Ursachen für die erhöhte Malignität zu sein (*Yung et al., 1990*). Diese autokrinen Loops sind eines der Ziele, die in der Entwicklung von anti-EGFR-spezifischen Therapeutika eine Rolle spielen, von denen einige bereits Gegenstand klinischer Studien sind.

Therapie

Es gibt zur Zeit diverse Strategien, Therapeutika zu entwickeln, die an der Pathophysiologie des EGFR ansetzen, hier spielen vor allem monoklonale AK (Antikörper) gegen den wt-EGFR und die Mutante EGFRvIII sowie Tyrosinkinaseinhibitoren eine wichtige Rolle. Zu den monoklonalen AK, die bereits in klinischen Studien erprobt werden, gehören IMC-C225 („Cetuximab“ oder „Erbix“), welcher die Ligandenbindung blockiert, ABX-EGF („Panitumumab“), welcher die Internalisierung verstärkt, sowie EMD-72000 („Matuzumab“) oder Theraloc („Nimotuzumab“), wobei alle ihren Einsatz schwerpunktmäßig beim Kolorektalen Karzinom, sowie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom oder Kopf-Hals Karzinomen finden. Eben diese Tumore sind auch Bestandteil der Studien, die sich mit der Inhibition der Tyrosinkinase des EGFR beschäftigen, die untersuchten Wirkstoffe umfassen hier ZD1839 („Gefitinib“) und OSI-774 („Erlotinib“), welche beide reversibel und spezifisch die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase des EGFR blockieren. Generell sind die oral verabreichten Tyrosinkinaseinhibitoren besser verträglich als die intravenös applizierten monoklonalen AK, die auch häufiger eine Immunreaktion des Patienten hervorrufen (*Harari und Huang et al., 2000; Ciardiello und Tortora et al., 2001; Sridhar, Seymour, und Shepherd et al., 2003; Herbst et al., 2004*). Zeigen sich in diesen Studien auch erste kleinere Erfolge, so haben diese Therapeutika beim Glioblastom bisher keinerlei Wirkung gezeigt (*Rich et al., 2004; Rich und Bigner et al., 2004*). Hier scheint eine mehr auf den EGFRvIII ausgerichtete Entwicklung neuer Wirkstoffe vielversprechend. So gibt es erste klinische Studien und in vivo Versuche mit EGFRvIII spezifischen AK wie mAB-806, mAB-528, Y10 oder L8A4, sowie in vitro Studien mit neuen EGFRvIII spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren wie AG-1478 und NSC-154829 (*Gan, Kaye, und Luwor et al., 2009*). Eines der größten Hindernisse bei der Anwendung monoklonaler AK und Tyrosinkinaseinhibitoren ist die Blut-Hirn-Schranke, welche ein Eindringen der Wirkstoffe in das Hirngewebe weitestgehend verhindert (*Pardridge et al., 2002*). Daher steht beim

Glioblastom die intracavitäre Einbringung der Therapeutika nach chirurgischer Resektion bisher im Vordergrund (*Riva et al., 1999; Yang et al., 2006*), und selbst dann können die Wirkstoffe nur schwierig die stark disseminierten Tumorzellen erreichen. Relativ neue Strategien sind unter anderem die Nutzung der RNA-Interferenz (*Zhang et al., 2004*), oder der Einsatz von Vakzinen, spezifisch konstruierten Antigenen, die eine entsprechende Immunantwort des Patienten induzieren sollen (*Schmittling et al., 2008; Sampson et al., 2008*). Zusammenfassend wird sehr wahrscheinlich auch ein singular eingesetzt Therapeutikum gegen den EGFRvIII wenig Wirkung zeigen, vor allem wegen der intratumoralen Heterogenität des Glioblastoms, so daß selbst wenn EGFRvIII exprimierende Zellen sterben, immer wieder Tumorzellen mit anderen Mutationen ein Rezidiv auslösen können (*Sampson et al., 2008; Duhem-Tonnelle et al., 2010*), gerade aufgrund der oben detailliert beschriebenen vielfältigen Signalwege des EGFR. Deshalb mag eine multimodale Therapie die sich auch gegen andere Komponenten dieses Systems richtet, ein besserer Ansatz sein (*Nicholas et al., 2006; Furnari et al., 2007*), gleiches gilt für die Prognose. Bisher werden vor allem das Alter des Patienten, das Ausmaß der möglichen chirurgischen Resektion sowie der KPS (Karnofsky Performance Status) mit einer prognostischen Aussage korreliert (*Shinojima et al., 2003; Heimberger et al., 2005*), alle anderen molekularen Veränderungen, wie die EGFR-Genamplifikation oder das Vorhandensein von bestimmten Mutationen brachten eher widersprüchliche Ergebnisse, so daß die gleichzeitige Auswertung von mehreren molekularen Alterationen unter Umständen eine bessere Aussage über die Malignität des Tumors erbringen könnte.

1.5.3. Amplifikation

Eine Genamplifikation in Zusammenhang mit der Entstehung maligner Tumore ist häufig zu finden, unter anderem im Falle der auch als diagnostischer Marker eingesetzten Amplifikation des Erb-B2 (HER2/neu) – Rezeptors beim Mammakarzinom (*Slamon et al., 1989; Menard et al., 2001*), oder aber n-myc bei der Entstehung des pädiatrischen Neuroblastoms (*Fuller und Bigner et al., 1992*), sowie in vielfältiger Weise in Gliomen (*Collins et al., 1995*). Die den EGFR betreffende Amplifikation jedoch hat eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung des Glioblastoms (*Arjona, Bello, und Rey et al., 2006*), was sie auch zur Grundlage der nachfolgenden Arbeit macht. Die amplifizierten Bereiche des EGFR-Gens finden sich im Falle des Glioblastoms vor allem in extrachromosomalen Bereichen, sogenannten „double minutes“ (*Bigner et al., 1987; Bigner, Mark, und Bigner et al., 1990; Muleris et al., 1994*). Dies sind meist zirkuläre DNA-Abschnitte, die eine oder mehrere Kopien des EGFR-Gens, oder Teile davon sowie häufig auch Mutationen enthalten, und die in einem postreplikativen fehlgeleiteten Prozess der DNA-Reparaturmechanismen wie dem NHEJ (Non-homologous end joining) oder MMEJ (micro-homology end joining) entstehen (*Vogt et al., 2004*). Die Größe dieser Amplikons variiert zwischen einigen hundert Kilobasen und mehreren Megabasen, und enthält insbesondere beim Glioblastom häufig noch koamplifizierte Sequenzen anderer Gene (*Reifenberger et al., 1996; Wang et al., 1998*). Hierbei kommen durchaus auch verschiedene koamplifizierte Gene in verschiedenen Amplikons vor. Die EGFR-Genamplifikation war die erste in Gliomen gefundene genetische Veränderung, und zeigt sich als das häufigste Ereignis bei der Entstehung des Glioblastoms, wo sie in 30-50% aller Fälle auftritt. Die Stärke der EGFR-Genamplifikation liegt bei einer Kopienzahl zwischen >2 und 120fach (*Libermann et al., 1985; Ekstrand et al., 1991*), und ist immer verbunden mit erhöhter mRNA- und Protein-Expression (*Wong et al., 1987*). In den Astrozytomen der WHO Grade II und III wird ebenfalls eine Amplifikation des EGFR-Gens beobachtet, jedoch ist sie hier sehr viel seltener (*Hurt et al., 1992; Lang et al., 1994; Leenstra et al., 1994; Rasheed et al., 1999*), in gesundem Hirngewebe tritt sie nie auf (*Ekstrand et al., 1991*). Fast immer liegen Gene des wt-EGFR und EGFRvIII und anderer Mutationen koamplifiziert vor, und da sich beim Glioblastom fast nie EGFR-Mutationen

ohne gleichzeitige Amplifikation des wt-EGFR-Gens zeigen (*Ekstrand et al., 1992; Ohgaki und Kleihues et al., 2007*), scheint die Mutation als sekundärer Event der Amplifikation zu folgen. Der Amplifikation des EGFR-Gens selber geht wiederum häufig der LOH des Chromosoms 10 voraus, wobei die Koexistenz dieser beiden genetischen Alterationen nur beim Glioblastom zu finden ist (*von Deimling et al., 1992*). Andere Korrelationen bestehen zur Deletion des Gens p16/INK4a, welche sich häufig mit der EGFR-Genamplifikation zusammen findet, oder der Mutation des TP53-Gens, welche eher selten zusammen mit einer Amplifikation des EGFR-Gens zu finden ist (*Sure et al., 1997; Bouvier-Labit et al., 1998; Batchelor et al., 2004*). Darüberhinaus ist der Amplifikationslevel nicht in allen Zellen des Tumors gleich, sondern variiert stark, zum einen bezüglich der Amplifikation einzelner Genabschnitte, hier werden die extrazellulären Domänen viel stärker amplifiziert als die intrazellulären Bereiche und die Transmembrandomäne (*Arjona et al., 2005*), zum anderen in Hinsicht auf die räumliche Verteilung innerhalb des Tumorgewebes, so daß Zellen in den infiltrativen Randbereichen viel stärker amplifiziert sind, als solche im soliden Tumorzentrum, auch hieran zeigt sich erneut die intratumorale Heterogenität des Glioblastoms (*Okada et al., 2003; Nafe et al., 2004; Duhem-Tonnelle et al., 2010*). Diese Selektionsvorteile, welche die EGFR-Genamplifikation den Tumorzellen sehr wahrscheinlich bietet, sind Gegenstand vieler Forschungsansätze im Kampf gegen das Glioblastom, so daß eine den „in vivo“-Bedingungen möglichst vergleichbare Zellkultur eine wichtige Voraussetzung darstellt.

1.5.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Die Entwicklung neuer und wirksamer therapeutischer Strategien bedingt die Notwendigkeit, an Zellkulturen forschen zu können, die auch langfristig möglichst reale in vivo Bedingungen widerspiegeln. Hierzu gehört beim Glioblastom vor allem die Aufrechterhaltung der EGFR-Genamplifikation, welche sich in ca. 50% aller Fälle findet, jedoch bei Inkulturnahme schon nach kurzer Zeit verloren geht (*Pandita et al., 2004*), so daß es bis heute keine Glioblastom-Zellkultur gibt, die über einen langen Zeitraum von mehreren Monaten ihre EGFR-Genamplifikation aufrecht erhält (*Bigner et al., 1990; Huang et al., 2007a*). Demgegenüber bleibt diese Amplifikation unter in vivo Bedingungen nach Xenotransplantation in die Gehirne von Mäusen und auch weiteren in vivo Passagen erhalten, was ein Indiz dafür sein könnte, daß diese Mikroumgebung derjenigen im humanen ZNS sehr viel näher kommt, als die normalen in vitro Bedingungen (*Humphrey et al., 1988; Martens et al., 2008*).

Das Ziel dieser Arbeit ist in diesem Zusammenhang die Etablierung von Glioblastom-Zellkulturen, die auch in vitro ihre EGFR-Genamplifikation und damit eines der für diesen Tumor wichtigsten genotypischen Merkmale aufrecht erhalten, was weitergehende Untersuchungen, insbesondere in Bezug auf die mit der Amplifikation auftretenden Mutationen und das damit möglicherweise einhergehende unterschiedliche therapeutische Ansprechen bestimmter Zellpopulationen mit unterschiedlichem EGFR-Amplifikations- und Mutationsstatus innerhalb eines Tumors, ermöglichen würde.

Da in bisherigen Arbeiten gezeigt werden konnte, daß Tumorzellen aus dem Glioblastom bei der Kultivierung unter modifizierten neuralen Stammzell-Bedingungen den Phänotyp und Genotyp des Originaltumors auch nach mehreren Passagen besser widerspiegeln als die bisher meist verwendete Kultivierung unter Serum-Bedingungen (*Hemmati et al., 2003; Lee et al., 2006; Gunther et al., 2008*), wurden entsprechende Kulturbedingungen auch für diese Arbeit gewählt.

Darüberhinaus wurde schon in den 80er Jahren ein Einfluß des Wachstumsfaktors EGF auf die Proliferation von Zellen mit EGFR-Genamplifikation bei anderen Tumor-Zellkulturen beschrieben, unter anderem beim Mamma-Karzinom und bei Plattenepithelkarzinomen. Hier hatte die Zugabe von EGF zur Kultur einen inhibitorischen Effekt ausschließlich auf das Wachstum von Tumorzellen mit starker EGFR-Genamplifikation, wohingegen nur Zellen ohne oder mit nur geringer Amplifikation keine vergleichbare Wachstumshemmung zeigten. Demnach ist zu vermuten daß durch die Zugabe von EGF in vitro Subpopulationen von Tumorzellen begünstigt werden könnten, die keine oder nur eine geringe EGFR-Genamplifikation aufweisen (*Barnes et al., 1982; Kawamoto et al., 1983; Filmus et al., 1985; Gulli et al., 1996*).

In dieser Arbeit wurde ein kombinatorischer Ansatz gewählt, bei dem sowohl die Kultivierung unter den oben genannten modifizierten neuronalen Stammzellbedingungen erfolgte als auch auf die Zugabe des Wachstumsfaktors EGF verzichtet wurde. Zunächst wurde versucht, aus frischem Tumormaterial Glioblastom-Zellkulturen zu etablieren und diese anschließend über mehrere Monate zu kultivieren. Dafür wurden jeweils mehrere Zellkulturen aus einem Tumor angesetzt, die entweder mit unterschiedlichen Konzentrationen von EGF oder aber ohne EGF kultiviert wurden. Ausgangspunkt für die gewählten EGF-Konzentrationen waren die bisherigen Arbeiten zur Kultivierung von Hirntumorstammzellen und normalen Stammzellen, welche üblicherweise eine EGF-Konzentration von 20 ng/ml oder 10 ng/ml gewählt hatten (*Chaichana et al., 2006*).

Danach sollte die Höhe der EGFR-Genamplifikation bei den unterschiedlichen Glioblastom-Zellkulturen mit der des Ursprungsmaterials verglichen werden, um festzustellen, ob die Zugabe von EGF unter in vitro Bedingungen einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf die Proliferation stark amplifizierter Zellen beim Glioblastom hat wie in den anderen Arbeiten anhand verschiedener Tumorentitäten gezeigt wurde, und inwieweit ein kompletter Verzicht auf EGF eventuell die Subpopulation EGFR-Genamplifizierter Zellen begünstigt und damit ein Aufrechterhalten dieses Merkmals auch unter in vitro Bedingungen möglich wird.

Das Wachstum dieser unterschiedlichen Kulturen sollte untersucht und verglichen werden, zum einen bezüglich interner Wachstumsrelationen bei verschiedenen EGF-Wachstumsfaktorkonzentrationen bei derselben Glioblastom-Zellkultur, zum anderen in Bezug auf externe Wachstumsrelationen bei gleichen EGF-Wachstumsfaktorkonzentrationen und unterschiedlichen Glioblastom-Zellkulturen. Eine Aussage über die Amplifikation sollte zum einen durch konventionelle PCR-Methodik, aber auch mittels der Methode der Real Time PCR getroffen werden.

Im Falle des Gelingens sollten die dann etablierten Glioblastom-Zellkulturen, die nach wie vor eine EGFR-Genamplifikation aufweisen, untersucht werden auf das Vorhandensein extrachromosomaler Strukturen sowie auf die für Hirntumorstammzellen beschriebenen charakteristischen Merkmale wie Differenzierungspotential und die Tumorigenität in vivo. Eine so völlig neu etablierte und permanent unter serumfreien Bedingungen wachsende Zellkultur würde es ermöglichen, das therapeutische Ansprechen von Tumorzellen mit individuell unterschiedlichem EGFR-Amplifikationsstatus, die demselben Ursprungstumor entstammen, zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Name	Hersteller
Eppendorf Gefäße (0,2 / 0,5 / 1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
4-Loch Platte "Nunclon Surface – 4' Well"	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
6-Loch Platte "Nunclon Surface – 6' Well"	
96-Loch Platte "Nuclon Surface – 96' Well"	
T-25 Zellkulturflaschen "Falcon"	Becton Dickinson Labware, NJ, USA
T-75 Zellkulturflaschen "Cellstar"	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
T-175 Zellkulturflaschen "Falcon"	Becton Dickinson Labware, NJ, USA
50 ml Gefäße "Falcon Cellstar"	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
15 ml Gefäße "Falcon Cellstar"	
Pipetten "Falcon" (2 / 5 / 10 / 25 ml)	Becton Dickinson Labware, NJ, USA
8-Loch Kammern "Chamber-Slides Lab-Tek"	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Einfrierröhrchen "Nunc CryoTube Vials"	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Combitips (2,5 / 5 / 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
sterile Spritzenvorsatzfilter	Merck GmbH, Darmstadt
96-Loch Platten für RT-PCR "Optical 96-Well Fast Thermal Cycling Plate"	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Neubauer Zellzählkammer	Rudolf Brand GmbH & Co, Wertheim

2.1.2. Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Für die Herstellung einer Zellkultur aus frischem Tumorgewebe:

Name	Hersteller
Collagenase/Dispase (1 mg/ml)	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Whylen
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Für die Zellkultur:

Name	Hersteller
NBM (Neurobasal-A-Medium) „Gibco 10888“	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
GlutaMAX (100x)	
Penicillin, Streptomycin	
Fungizone, Amphotericin B	
B-27 Supplement (50x)	
PBS-Puffer „DPBS Gibco 14190“	
EGF “Recombinant Human Epidermal Growth Factor”	PeproTech Inc., Rocky Hills, NJ, USA
FGF “Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-basic”	Biosource, Camarillo, CA, USA
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm GmbH, Ulm
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	MP Biomedicals, Solon, OH, USA

Für die DNA-Präparation:

Name	Hersteller
100% Ethanol absolut	Merck GmbH, Darmstadt
DNeasy Blood & Tissue Kit	Quiagen GmbH, Hilden

Für den DNA Nachweis mittels photometrischer Messung wurde eine Absorptions-Messlösung hergestellt bestehend aus Tris-Puffer (10 mM) bei pH 7,5.

Für die konventionelle PCR und quantitative Real-Time PCR:

Name	Hersteller
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	Quiagen GmbH, Hilden
Taq-Polymerase (5 U/μl)	MWG-Biotech AG, Ebersberg
dNTP Mix (ATP, GTP, CTP, TTP) (10 mM)	
Primer EGFR-1 (10 pmol/μl) 5' AGC CAT GCC CGC ATT AGC TC 3'	
Primer EGFR-2 (10 pmol/μl) 5' AAA GGA ATG CAA CTT CCC AA 3'	
Primer INF-γ-1 (10 pmol/μl) 5' AGT GAT GGC TGA ACT GTC GC 3'	
Primer INF-γ-2 (10 pmol/μl) 5' CTG GGA TGC TCT TCG ACC TC 3'	
MgCl ₂	
PCR Puffer (10X), bestehend aus	

Für den nicht quantitativen DNA Nachweis mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Name	Hersteller
Polyacrylamid	Merck GmbH, Darmstadt
TBE-Puffer (5x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck GmbH, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck GmbH, Darmstadt

Die hierbei verwendeten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

TBE-Puffer (5x) zur Gelherstellung:

- 89 mM TRIS-Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
- 89 mM Borat (Salz der Borsäure)
- 2 mM EDTA- Na_2 (Ethyldiamintetraessigsäure)
- In dH_2O

Das 6%ige Polyacrylamid-Gel wurde pro 30 ml Volumen hergestellt aus:

- 21,8 ml dH_2O
- 6 ml Acrylamid
- 3 ml TBE-Puffer (5x)
- 200 μl APS
- 20 μl TEMED

Ladepuffer (6x) für die Einbringung der gefärbten DNA in die Geltaschen:

- 0,25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylenecyanol
- 15% Ficoll 400

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung:

Name	Hersteller
Homo Sapiens PAC Klon RP5-1091E12 Genbank Accession No. AC006977	Quiagen GmbH, Hilden
BioPrime® DNA Labeling System	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Spectrum-Orange-dUTP	Abbott Molecular, Illinois
Bio-Spin® 30 Tris Column	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Cot-1 DNA® (1 mg/mL)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hairpin-Loop-DNA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Blue-Dextran (100 mg/mL)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natrium-Acetat	Merck GmbH, Darmstadt
100% Ethanol absolut	Merck GmbH, Darmstadt
Formamid (50%)	Merck GmbH, Darmstadt
SSC-Puffer (2x)	Merck GmbH, Darmstadt
Polysorbat Tween 20 (0,1%)	Merck GmbH, Darmstadt
DAPI-Lösung	Partec GmbH, Münster
“CyStain DNA 1 step” staining solution	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Citifluor Antifading Solution	Agar Scientific Ltd., Essex

Der hierbei verwendete SSC-Puffer (2x) setzte sich wie folgt zusammen:

- 300 mM Natriumchlorid
- 30 mM Natriumcitrat

Für die Zelldifferenzierung:

Name	Hersteller
All-trans Retinsäure (1 mM)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
cAMP (10 mg/ml)	
0,5% Trypsin EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCS (Fetal Calf Serum) „Gibco“	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Für die immunzytochemische Durchflußzytometrie (FACS):

Name	Hersteller
Paraformaldehyd (4%)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Saponin (0,5%)	
Pferdeserum "Gibco"	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DAPI-Lösung "CyStain DNA 1 step" staining solution	Partec GmbH, Münster

Folgende Antikörper wurden für die FACS-Methode verwendet:

Name	Hersteller
Kaninchen anti-nestin, (1:200)	Chemicon, Temecula, CA
Maus anti-nestin, (1:200)	
Maus anti-galactocerebroside (GalC), (1:100)	
Maus anti microtubule associated protein2 (MAP2), (1:50)	
Kaninchen anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP), (1:40)	Dako, Glostrup, Denmark
Maus anti-neurofilament (NF), (1:500)	Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, MD
Maus anti-neurofilament (NF), (1:25)	Dako, Glostrup, Denmark
Maus anti-SRY-related HMG-box gene 2 (SOX-2), (1:50)	R&D Systems, Minneapolis, MN
Maus IgG1, (1:25)	BD Biosciences
Kaninchen IgG, (1:250)	Dako, Glostrup, Denmark
Maus IgG1-PE	Santa Cruz
FcR Blockierungs- Reagenz	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FITC-konjugierter Schwein anti-Maus Antikörper, (1:40)	Dako, Glostrup, Denmark
FITC-konjugierter Ziege anti- Kaninchen Antikörper, (1:20)	
Anti-IgG-Antikörper gegen IgG der Maus "Alexa fluor 488"	Invitrogen, Carlsbad, CA
Anti-IgG-Antikörper gegen IgG des Kaninchen "Alexa fluor 546"	Kindler GmbH, Freiburg

Für die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von in Paraffin eingebetteten Mäusehirnen:

Name	Hersteller
Mayers Häkalaunlösung	Merck GmbH, Darmstadt
EosinG, gelblich	
Xylol	
Isopropanol	
Salzsäure (HCl) (25%)	
100% Ethanol absolut	
“Eukitt” Eindeckelmedium	Kindler GmbH, Freiburg

Folgende Lösungen wurden für die HE-Färbung hergestellt:

- “Ethanol/HCl”
aus 964 ml Ethanol (96%) + 21,6 ml HCl (25%)
- “Eosin”
aus 1000 ml Ethanol (96%) + 10 g EosinG, gelblich

2.1.3. Geräte

Die folgenden Geräte wurden für diese Arbeit verwendet:

Name	Hersteller
<u>Zellkultur, Differenzierung und verschiedene Anwendungsbereiche</u>	
Sicherheitswerkbank Herasafe Klasse 2	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
Begasungs-Brutschrank	
Mikroskop "DM IL"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskop "DM IRB"	
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund

Zentrifuge "Centrifuge 5810"	Eppendorf AG, Hamburg
Tisch-Zentrifuge "Centrifuge 5415 C"	
Tisch-Zentrifuge "miniSpin"	
-80 Grad Kühltruhe	Kryotec GmbH, Hamburg
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze
Vortexer	Heidolph GmbH, Schwabach
<u>DNA Präparation und Quantifizierung</u>	
Elektrophoresekammer "Mini Gel Migration Trough"	Cosmo Bio Co Ltd, Carlsbad, CA, USA
UV-Tisch	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
Kamera	Kodak GmbH, Stuttgart
Photometer mit Quarzküvetten "GeneQuant pro"	Amersham plc, Little Chalfont, England
<u>Real-Time PCR Analysen</u>	
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<u>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</u>	
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenzlampe	
<u>Durchflußzytometrie</u>	
Durchflußzytometer PAS	Partec GmbH, Münster
<u>Tierversuche</u>	
Mikrotiterspritze zur Injektion	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz/Schweiz
stereotaktischer Rahmen für intrakranielle OP	Eigenfertigung
Mikrotom "SM 2000R"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

2.2. Methoden

2.2.1. Verarbeitung von frischem Tumormaterial

Frisch resezierter Tumor der Neurochirurgischen Klinik Hamburg Eppendorf wurde, nach Einwilligung des Patienten, in etwa 1 mm³ kleine Fragmente geschnitten und in einem Medium bestehend aus Collagenase/Dispase (1 mg/ml) und HBSS für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 100 µm Sieb filtriert und der Durchfluss, der die vereinzelteten Tumorzellen enthielt, bei 1000 rpm (80g) für 6 Minuten zentrifugiert. Zum Waschen wurde das Zellpellet in 5 ml HBSS resuspendiert, erneut zentrifugiert und dann in das modifizierte Stammzellmedium, bestehend aus Neurobasalmedium nebst den in 2.2.2 genannten unterschiedlichen Zusätzen aufgenommen und zunächst in eine 6-Loch Platte überführt.

2.2.2. Serumfreie Zellkultur mit variabler EGF-Konzentration

Grundlage der serumfreien Zellkultur war neben der Kultivierung bei 37°C und CO₂-angereicherter Atmosphäre (5%) bei hoher Luftfeuchtigkeit der Umgebung innerhalb eines Begasungs-Brutschanks vor allem die kontinuierliche Arbeit unter sterilen Bedingungen mithilfe einer Sicherheitswerkbank Klasse 2, um mikrobiologische Kontaminationen durch Bakterien, Viren oder Pilze weitestgehend auszuschließen. Die Zellen wurden in Lochplatten verschiedener Größen sowie bei Expansion in T-25, T-75 und T-175 Flaschen mit Neurobasal-A Medium (NBM) unter Zusatz von:

- 1% GlutaMax
- 1% Penicillin / Streptomycin
- 1% Fungizone / Amphotericin B
- 2% B-27 Supplement

im Brutschrank kultiviert, und in wöchentlichen Abständen mit einer Kombination aus 2 ng/ml FGF und 6 µl Heparin (32 IE/ml) sowie verschiedenen Zusätzen des Wachstumsfaktors EGF pro ml Kulturvolumen versorgt. Die verwendeten Konzentrationen an EGF betrugen 0, 5, 10, 15 oder 20 ng/ml. Sobald die Zelldichte einen gewissen Grad erreicht hatte, der bei einer konfluenten T-25 Flasche etwa bei 5 Millionen Zellen lag, wurden die Sphären bei 1000 rpm (80g) 5 Minuten zentrifugiert, danach mechanisch dissoziiert durch Resuspension in 200 µl NBM, und anschliessend verdünnt (gesplittet). Dieser Splitvorgang bezeichnete eine "Passage".

2.2.3. Einfrieren / Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Archivierung der Zellen konnten diese auch bei -80°C eingefroren werden oder in flüssigen Stickstoff bei -196°C verbracht werden. Hierzu zentrifugierte man die Zellen 5 min bei 1000 rpm (80g), und dissoziierte sie danach wie in 2.2.2 beschrieben, und nahm sie in der Folge in 1,6 ml DMSO+FCS Medium (bestehend aus 10% DMSO in FCS) auf, mischte kurz durch pipettieren, und überführte die gesamten 1,8 ml anschließend in ein Einfrierröhrchen, welches zügig verschlossen und bei -80°C verwahrt wurde.

Das Auftauen geschah durch schnelles Erwärmen des Einfrierröhrchens im Wasserbad bei 37°C, Zugabe von 10 ml NBM und Resuspendierung. Anschließend wurde bei 1000 rpm (80g) 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml PBS-Puffer resuspendiert und wiederum 5 Minuten bei 1000 rpm (80g) zentrifugiert. Durch erneutes Resuspendieren in 10 ml PBS-Puffer wurde ein zweites Mal gewaschen, danach folgte ein dritter Zentrifugationschritt mit 5 Minuten bei 1000

rpm (80g), und zum Schluß resuspendierte man das Pellet in NBM, überführte es in eine T-25 Flasche und setzte Wachstumsfaktoren und Heparin in wie unter 2.2.2 beschriebenen Mengen hinzu.

2.2.4. Auswertung der Wachstumsrelationen

Zur Auswertung der Wachstumsrelationen wurde die Kultivierungsdauer in Tagen gemessen, und jeweils notiert, in welchem Verhältnis die Zellkultur bei welcher Passage zu welchem Zeitpunkt gesplittet wurde. Aus Multiplikation von einer Zahl „n“ der einzelnen Splittingverhältnisse ergab sich dann das in den Ergebnissen dargestellte gesamte Splittingverhältnis 1:n nach entsprechend 90, 180, 270 und 360 Tagen, wobei in der Regel nicht nach genau diesen Zeiträumen ein Splitting stattfand, hier wurde dann das Verhältnis verwendet, welches gemessen in Tagen jeweils unmittelbar vor Ablauf des entsprechenden Quartals erreicht worden war. Das Splittingverhältnis wurde in Relation zu den jeweils zu den angegebenen Quartalszeitpunkten erreichten Passagen gesetzt, um so einen Vergleich beider Werte zuzulassen.

2.2.5. Nachweis der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation

2.2.5.1. Präparation genomischer DNA

Die DNA-Präparation wurde unter Verwendung eines „DNeasy Blood & Tissue Kit“ der Firma Qiagen vorgenommen. Hierbei wurde die genomische DNA zum einen sofort aus frischem Tumormaterial isoliert, zum anderen aus den unter verschiedenen EGF-Wachstumsfaktorkonzentrationen gewachsenen Zellkulturen nach mehreren Monaten. Grundlage bildete daher entweder Zellgewebe, oder ein durch 5 minütige Zentrifugation bei 1000 rpm (80g) aus der Zellkultur gewonnenes Pellet, von dem der Überstand entfernt wurde, und welches in 200 µl PBS-Puffer resuspendiert wurde. Die Präparation erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers zur Reinigung von DNA aus Zellen. Das Prinzip basiert auf der Lyse der Zellen durch Proteinase-K mit anschließender Bindung der Nukleinsäuren an eine Silica-Membran und nachfolgender Elution der gebundenen DNA in Wasser oder Nieder-Salz Puffern. Hierbei wurde berücksichtigt, daß die Lyse des Zellgewebes länger dauert als bei zentrifugierten Zellen einer Kultur, daher wurden unterschiedlich lange Inkubationszeiten für die Proteinase-K entsprechend dem Protokoll in Verbindung mit verschiedenen Puffern angewandt. Für die längerfristige Verwahrung wurde die so gewonnene DNA in 30 µl Volumen in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen bei -80°C gelagert.

2.2.5.2. DNA-Nachweis mittels photometrischer Messung

Eine absolute Quantifizierung der DNA ist möglich durch photometrische Bestimmung des DNA-Anteils, bei dem die maximale Absorption der DNA bei 260 nm mithilfe eines Spektralphotometers gemessen wird. Eine optische Dichte von 1 entspricht bei dieser Wellenlänge innerhalb einer 1 cm durchmessenden Küvette einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml, und die Verunreinigung durch Proteine kann anhand eines Quotienten aus der Absorption bei 260 und 280 nm (Proteine) dargestellt werden. Das Absorptionsmaximum liegt hier bei den aromatischen Aminosäuren, wobei Werte des Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 als proteinfrei gelten. Die zu untersuchende DNA-Probe wurde zu einer entsprechend der Dichte der Lösungskonzentration zu wählenden Menge an vorher als Referenz gesetzter Absorptions-Messlösung gegeben, um nachfolgend die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm ermitteln zu können.

2.2.5.3. PCR und Gelelektrophorese

Für die Amplifikation von DNA wurde die von Kary B. Mullis entwickelte Methode der PCR verwendet (*Mullis und Faloona et al., 1987*). Mittels DNA-Polymerasen, meist aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* (*Taq*), werden der codogene oder nicht codogene Strang der Matrize an komplementären Oligonukleotiden (Primer) mit einer freien 3'-OH-Gruppe *de novo* synthetisiert. Durch Hybridisierung der Primer an die hitzedenaturierten Template-Stränge werden folglich das terminale 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments definiert. Die Primer werden nun in 5'-3'-Richtung verlängert. Als Ergebnis sind aus einem doppelsträngigen DNA-Template zwei doppelsträngige DNA-Fragmente entstanden, die nun wiederum selbst als Template fungieren. Die mehrfache Wiederholung des PCR-Zyklus, bestehend aus den drei Temperaturschritten Denaturierung, Annealing und Elongation, führt zur exponentiellen Anreicherung der DNA. Diese Methode wurde als Differentielle PCR für die nicht-quantitative Überprüfung der EGFR-Amplifikation der primären Tumore eingesetzt. Hierbei wurde parallel eine Amplifikationsreaktion für das Gen des EGF-Rezeptors und des Gens für Interferon- γ (INF- γ) als Referenzgen durchgeführt. Nachfolgend sind die PCR-Bedingungen sowie die Primer Sequenzen aufgeführt:

Für einen 20 μ l PCR Ansatz:

- 40 ng genomische DNA
- 2 μ l 10xPCR-Puffer
- 0,4 μ l dNTPs-Mix
- 2 μ l $MgCl_2$
- 1 pMol Primer EGFR-1
- 1 pMol Primer EGFR-2
- 1 pMol Primer INF- γ -1
- 1 pMol Primer INF- γ -2
- 0,1 μ l Taq Polymerase
- X μ l ddH₂O um 20 μ l Ansatzvolumen zu vervollständigen

Reaktionsbedingungen:

- Initiale Denaturierung für 180 Sekunden bei 94°C
- 25 Zyklen
 - Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C
 - Annealing für 30 Sekunden bei 54°C
 - Elongation für 60 Sekunden bei 72°C
- finale Elongation für 600 Sekunden bei 72°C
- Abkühlung auf 4°C bis zur weiteren Verwendung

Primersequenzen:

- EGFR-1 : 5'AGC CAT GCC CGC ATT AGC TC 3'
- EGFR-2 : 5'AAA GGA ATG CAA CTT CCC AA 3'
- INF- γ -1 : 5'AGT GAT GGC TGA ACT GTC GC 3'
- INF- γ -2 : 5'CTG GGA TGC TCT TCG ACC TC 3'

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei trennen sich beide Amplikons voneinander. Da Interferon als Referenzgen fungierte, und in nur einer Kopie vorliegt, konnte man anhand des Bandenintensitätsverhältnisses zwischen EGFR und INF- γ bestimmen, ob das Gen für den EGF-Rezeptor amplifiziert vorlag oder nicht (*Neubauer et al., 1992*).

2.2.5.4. Quantitative Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ermöglicht eine Quantifizierung der Genamplifikation, indem während der PCR Fluoreszenz-Messungen vorgenommen werden. Diese Fluoreszenz kann durch verschiedene mit der DNA interkalierende Farbstoffe erreicht werden, hier wurde der Farbstoff SYBR-Green verwendet. SYBR-Green bindet doppelsträngige DNA, woraus ein DNA-Fluoreszenzfarbstoffkomplex resultiert, welcher bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 494$ nm blaues Licht absorbiert, und bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 521$ nm grünes Licht emittiert. Zwei weitere jedoch schwächere Absorptionsmaxima liegen bei den Wellenlängen $\lambda_{\max} = 284$ nm und $\lambda_{\max} = 382$ nm. Die so gemessene Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der Amplifikate zu. Der Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenzintensität einen Schwellenwert überschreitet, wird als Ct-Wert registriert, und bezeichnet die Anzahl der bisher abgelaufenen Zyklen während der PCR als nicht ganzzahligen Wert. Alle nun folgenden Berechnungen wurden mithilfe der Software "Microsoft Excel 2003" vorgenommen (*Abbildung 2.2.5.1*). Anhand der Ct-Werte für das EGFR-Gen ist ein Vergleich zu den Ct-Werten einer endogenen Kontrolle möglich, für die auch hier INF- γ als Referenzgen verwendet wurde, um die differentielle PCR auf die Real-Time PCR zu adaptierten. Die Differenz dieser Ct-Werte (Δ Ct) wurde in Beziehung gesetzt zu dem Δ Ct-Wert eines Kalibrators, der zum einen humane Leukozyten-DNA für den Vergleich der Amplifikation im ursprünglichen Tumorgewebe war, zum anderen die DNA aus dem ursprünglichen Tumorgewebe selbst, um eine Veränderung der Amplifikation in den Glioblastom-Zellkulturen feststellen zu können. Aus dieser zweiten Differenz ($\Delta\Delta$ Ct) wurde mithilfe der Formel

$$RQ = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

ein RQ-Wert (RQ: Relative Quantification) berechnet, der die relative Veränderung der EGFR-Amplifikation bezogen auf den Kalibrator zum Ausdruck bringt. Aus den so ermittelten vier RQ-Werten der Quadruplikate (RQquad) wurde dann der Mittelwert (RQquad MW) und die Standardabweichung (RQquad StAbw) ermittelt, und mithilfe der Software "Sigma-Plot" und „Microsoft Excel 2003“ grafisch dargestellt.

Für einen 20 μ l-Ansatz pro Loch der 96-Loch Platte wurden:

- 10 μ l 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
- 1 pMol Primer EGFR-1 oder INF- γ -1
- 1 pMol Primer EGFR-2 oder INF- γ -2

unmittelbar vor Reaktionsbeginn zugegeben zu:

- 1 μ l genomischer DNA
- 8 μ l ddH₂O

wobei die Primersequenzen den in 2.1.2 und 2.2.5.3 genannten entsprechen. Die RT-PCR Analyse wurde ausgeführt mit einem 7500 Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems mit Standardkonditionen im „9600 Emulation-Run-Mode“.

Probe	Well	Sample	Detector	Ct	Ct StAbw	Temp	ΔCt	ΔCt MW	ΔΔCt	RQquad	RQquad MW	RQquad StAbw
Leukozyten DNA	A1	Leukozyten	EGF-R	26,884	0	0	3,527	3,225	0,302	0,811	1,040	0,330
	B1	Leukozyten	EGF-R	26,813	0	0	3,712	3,225	0,487	0,714	1,040	0,330
	C1	Leukozyten	EGF-R	26,215	0	0	2,925	3,225	-0,300	1,231	1,040	0,330
	D1	Leukozyten	EGF-R	26,000	0	0	2,736	3,225	-0,489	1,403	1,040	0,330
GB-03 Ursprungstumor DNA	A5	GB-03 Ursprung	EGF-R	24,670	0,356	79,7	-0,290	-0,585	-3,515	11,432	14,325	3,376
	B5	GB-03 Ursprung	EGF-R	24,480	0,356	80	-0,290	-0,585	-3,515	11,432	14,325	3,376
	C5	GB-03 Ursprung	EGF-R	24,050	0,356	80	-0,830	-0,585	-4,055	16,622	14,325	3,376
	D5	GB-03 Ursprung	EGF-R	23,910	0,356	80,3	-0,930	-0,585	-4,155	17,815	14,325	3,376
GB-03 EGF 0	A6	GB-03 EGF 0	EGF-R	18,980	0,776	79,7	-2,410	-2,801	-1,825	50,755	67,677	14,130
	B6	GB-03 EGF 0	EGF-R	18,480	0,776	80	-2,890	-2,801	-2,305	70,790	67,677	14,130
	C6	GB-03 EGF 0	EGF-R	18,180	0,776	80	-3,150	-2,801	-2,565	84,769	67,677	14,130
	D6	GB-03 EGF 0	EGF-R	18,547	0,776	80,3	-2,753	-2,801	-2,168	64,392	67,677	14,130
GB-03 EGF 5	A7	GB-03 EGF 5	EGF-R	23,210	0,455	80	2,840	2,443	3,425	1,334	1,826	0,621
	B7	GB-03 EGF 5	EGF-R	22,970	0,455	80	2,460	2,443	3,045	1,736	1,826	0,621
	C7	GB-03 EGF 5	EGF-R	23,080	0,455	80	2,660	2,443	3,245	1,511	1,826	0,621
	D7	GB-03 EGF 5	EGF-R	22,200	0,455	80,3	1,810	2,443	2,395	2,724	1,826	0,621
GB-03 EGF 10	A8	GB-03 EGF 10	EGF-R	18,873	0,493	79,7	-1,467	-1,562	-0,882	26,394	28,381	3,944
	B8	GB-03 EGF 10	EGF-R	18,620	0,493	80	-1,840	-1,562	-1,255	34,189	28,381	3,944
	C8	GB-03 EGF 10	EGF-R	18,950	0,493	80	-1,520	-1,562	-0,935	27,388	28,381	3,944
	D8	GB-03 EGF 10	EGF-R	19,050	0,493	80	-1,420	-1,562	-0,835	25,554	28,381	3,944
Leukozyten DNA	E1	Leukozyten	IFN Gamma	23,357	0	0						
	F1	Leukozyten	IFN Gamma	23,101	0	0						
	G1	Leukozyten	IFN Gamma	23,290	0	0						
	H1	Leukozyten	IFN Gamma	23,264	0	0						
GB-03 Ursprungstumor DNA	E5	GB-03 Ursprung	IFN Gamma	24,960	0,079	79,3						
	F5	GB-03 Ursprung	IFN Gamma	24,770	0,079	79,3						
	G5	GB-03 Ursprung	IFN Gamma	24,880	0,079	79,3						
	H5	GB-03 Ursprung	IFN Gamma	24,840	0,079	79						
GB-03 EGF 0	E6	GB-03 EGF 0	IFN Gamma	21,390	0,043	79,3						
	F6	GB-03 EGF 0	IFN Gamma	21,370	0,043	79,3						
	G6	GB-03 EGF 0	IFN Gamma	21,330	0,043	79,3						
	H6	GB-03 EGF 0	IFN Gamma	21,300	0,043	79						
GB-03 EGF 5	E7	GB-03 EGF 5	IFN Gamma	20,370	0,06	79,3						
	F7	GB-03 EGF 5	IFN Gamma	20,510	0,06	79,3						
	G7	GB-03 EGF 5	IFN Gamma	20,420	0,06	79,3						
	H7	GB-03 EGF 5	IFN Gamma	20,390	0,06	79						
GB-03 EGF 10	E8	GB-03 EGF 10	IFN Gamma	20,340	0,064	79,3						
	F8	GB-03 EGF 10	IFN Gamma	20,460	0,064	79,3						
	G8	GB-03 EGF 10	IFN Gamma	20,470	0,064	79,3						
	H8	GB-03 EGF 10	IFN Gamma	20,470	0,064	79						

Abbildung 2.2.5.1: Beispiel für die Auswertung der Real-Time PCR anhand GB-03: Spalte „Ct“: Gemessener Ct-Wert für EGFR-Amplifikation in Zeile 1-20, Ct-Wert für endogene Kontrolle IFN-γ in Zeile 21-40. Kalibratoren sind Leukozyten DNA in Zeile 1-4 und Ursprungstumor-DNA aus GB-03 in Zeile 5-8. „StAbw“ = Standardabweichung, „MW“ = Mittelwert, andere Abkürzungen siehe Text.

2.2.5.5. FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Diese Methode wurde in enger Kooperation mit dem Institut der Tumorbilogie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis der EGFR-Amplifikation beruht auf dem Prinzip der Hybridisierung zweier komplementärer DNA-Einzelstränge. Ein DNA-Strang wird künstlich hergestellt, so daß er die nachzuweisende DNA-Sequenz enthält, welche mit einem Fluoreszenz-Farbstoff als Sonde markiert wurde, der komplementäre DNA-Strang befindet sich in dem zu untersuchenden Präparat, daher „in situ“-Hybridisierung. Nach Inkubation des Präparates mit der DNA-Sonde und entsprechender Färbung kann man über Mikroskopische Techniken die Lokalisation des DNA-Abschnittes, welcher hier die extrachromosomalen EGFR-Amplikons darstellte, direkt im Präparat sichtbar machen.

Die Sonde für die Detektion des EGFR-Gens wurde von dem humanen PAC Klon RP5-1091E12 generiert, der die Exone 1 bis 20 des EGFR-Gens umfasst. Hierzu wurde zunächst der DNA-Abschnitt mit dem Fluoreszenz-Farbstoff „Spectrum-Orange-dUTP“ mithilfe des „BioPrime® DNA Labeling System“ der Firma Invitrogen markiert.

Folgende Schritte waren dafür notwendig: Zunächst wurde 1 µg der zu markierenden DNA des humanen PAC Klon RP5-1091E12 in 19 µl ddH₂O gelöst, für 5 Minuten gekocht um die doppelsträngige DNA zu denaturieren, und danach auf Eis gekühlt. Im Anschluß daran wurden zu dem Ansatz:

- 5 µl dNTP-Mix (10x)
- 20 µl Random-Primer-Mix (2,5x)
- 1 µl DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)
- 5 µl Spektrum-Orange-dUTP (0,5 mMol/L)

gegeben, mithin 50 µl Gesamtvolumen, welches für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde. Hierbei wurde die denaturierte einzelsträngige DNA durch die DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) mit den Spektrum-Orange-dUTP-Nukleotiden zusammen mit nicht markierten Nukleotiden wieder als doppelsträngige DNA synthetisiert, um so den Bereich des gesuchten EGFR-Gens mit dem Fluoreszenz-Farbstoff zu markieren. Die so erhaltene DNA wurde danach mittels einer „Bio-Spin® 30 Tris Column“ der Firma Bio-Rad aufgereinigt. Um eventuell vorhandene hoch-repetitive oder palindromische DNA-Sequenzen, welche das Fluoreszenz-Signal stören würden, zu blockieren, wurde anschließend 1 µl des markierten DNA-Sonden-Ansatzes entnommen und zu diesem:

- 50 µl Cot-1 DNA® (1 mg/mL) von Invitrogen
- 1 µl Hairpin-Loop-DNA von Sigma-Aldrich
- 1 µl Blue-Dextran (100 mg/mL)
- 7 µl Natrium-Acetat

hinzugegeben, um so ein neues Gesamtvolumen von 60 µl zu erhalten. Die nun fertige DNA-Sonde wurde mit 2,5x Ethanol (100%) gefällt, und anschließend zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde mit 10 µl Formamid in SSC-Puffer gelöst, um durch pH-Verschiebung eine erneute Denaturierung des Doppelstranges zu erreichen, damit die dann einzelsträngigen DNA-Sonden mit der gesuchten Zielsequenz des Präparates hybridisieren können.

Das Präparat selber, die Zellen wurden nun mit dieser Sonde hybridisiert.

2.2.6. Proliferationskinetik

Zur Analyse der Proliferation wurden 2000 vereinzelte Zellen in die Vertiefungen einer 4-Loch-Platte ausgesät und in modifiziertem Stammzellmedium kultiviert. An fünf aufeinander folgenden Zeitpunkten (2 Tage, 3 Tage, 4 Tage, 6 Tage und 8 Tage nach Aussaat) wurden die Zellen manuell ausgezählt und die Mittelwerte der Quadruplikatansätze bestimmt. Nach dreimaliger Wiederholung der Experimente wurden schließlich die Mittelwerte und Standardabweichungen aller drei Versuche berechnet und hieraus eine Proliferationskinetik erstellt.

2.2.7. Differenzierungspotential

2.2.7.1. chemisch induzierte Zelldifferenzierung

Das Differenzierungspotential einer Zelle mit Stammzeleigenschaften beschreibt die Fähigkeit, inwieweit sich diese Zellen in vitro in eine neuronale oder gliale Richtung weiter differenzieren lassen, oder ob sie einer chemisch induzierten Differenzierung widerstehen. In dieser Arbeit wurde die durch Retinsäure vermittelte Induktion der Differenzierung unter Zusatz von FCS und cAMP verwendet. Die Induktion der Differenzierung fand durch Inkubation der Zellen in einem Differenzierungsmedium statt, welches zum einen aus dem unter 2.2.2 beschriebenen Zellkulturmedium bestand, allerdings ohne jeglichen Zusatz der Wachstumsfaktoren FGF und EGF sowie ohne Heparin, zum anderen aus den die Differenzierung induzierenden Komponenten:

- FCS (10%)
- all-trans Retinsäure (1mM)
- cAMP (10 mg/ml)

Die Auswertung der Differenzierung erfolgte im Anschluß mithilfe der Durchflußzytometrie. Hierzu wurden 25.000 Zellen pro Vertiefung in 6-Loch Platten mit jeweils 2 ml Differenzierungsmedium ausgesät und dann entsprechend des geplanten Zeitrahmens ohne weitere Zusätze im Brutschrank, wie unter 2.2.2 beschrieben, kultiviert. Jeweils kurz nach Differenzierungsinduktion (Tag 0) sowie nach Ablauf von 4 beziehungsweise 6 Tagen wurden die adhärent wachsenden Zellen mechanisch vom Boden abgelöst und vereinzelt, um anschließend die durchflußzytometrischen Untersuchungen durchführen zu können.

2.2.7.2. FACS: Fluorescence-Activated-Cell-Sorting

Diese Methode der Durchflußzytometrie erlaubt eine quantitative Messung der Verteilung der die entsprechenden Differenzierungsmarker (Antigene) exprimierenden Zellen bezogen auf die Gesamtzellpopulation. Dazu müssen die vorher vereinzelt Zellen entsprechend mit für die Differenzierungsmarker spezifischen Fluoreszenz-AK markiert werden, um anschliessend durch eine spezielle Quarzküvette des FACS-Gerätes geschleust zu werden, wo mithilfe eines Lasers das Fluoreszenzsignal gescannt wird. Durch gleichzeitige Messung der Zellgröße durch den Vorwärtsstreulichtkanal (FSC „forward scatter“) und der Granularität durch den Seitwärtsstreulichtkanal (SSC „sideward scatter“), welche einzeln fokussierte Laserstrahlen darstellen, kann eine zellindividuelle Modifikation desjenigen Laserstrahls erreicht werden, der die eigentliche Fluoreszenzmessung vornimmt. Dies minimiert unerwünschte Störsignale, indem es eine Feinjustierung des Messbereiches der AK-Signale ermöglicht. Eine Negativ-Kontrolle wurde

eingesetzt, um die Hintergrund-Fluoreszenzsignale zu subtrahieren, und ein Triplikat-Ansatz der jeweiligen Probe ermöglichte die Berechnung einer Standardabweichung. Zur Markierung der differenzierten Zellen wurden diese zunächst dissoziiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt, und anschließend für 10 Minuten in Paraformaldehyd (4%) fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS-Puffer wurden die Zellen mit Saponin (0,5%) 10 Minuten lang permeabilisiert, und dann in PBS-Puffer unter Zusatz von Pferdeserum (5%) 20 Minuten inkubiert, um mithilfe der hierin enthaltenen AK unspezifische Bindungstellen zu blockieren. Nun konnte der Erst-AK (spezifischer AK gegen den zu untersuchenden Differenzierungsmarker) hinzugegeben werden, welcher 30 Minuten inkubiert wurde, und anschließend wurde erneut durch Waschen mit Pferdeserum (1%) eine Verdrängung des spezifischen Erst-AK von unspezifischen Bindungstellen vorgenommen. Danach konnte der Zweit-AK (mit Fluoreszenzmarker versehener IgG-AK gegen den Erst-AK) für 30 Minuten inkubiert werden, woran sich zuletzt eine Zellkernfärbung mithilfe von DAPI (4',6'-Diamidin-2-phenylindol) anschloss. Eine genaue Übersicht der verwendeten AK gibt 2.1.2. Die so markierten Zellen konnten nun der durchflußzytometrischen Untersuchung zugeführt werden, welche mithilfe der Software „Flomax“ vorgenommen wurde.

2.2.8. Tumorigenität in vivo

2.2.8.1. Xenotransplantation der Tumorzellen und Explantation der Maushirne

Die verwendeten Tiere wurden unter Berücksichtigung ihres jeweiligen Körpergewichtes mit 100 mg/kg Körpergewicht Ketanest und 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin narkotisiert und unter sterilen Bedingungen für die intrakranielle Zellinjektion vorbereitet. Diese Vorbereitung beinhaltete neben der Desinfektion der für die Operation wichtigen Körperregionen im Wesentlichen die Fixierung des Tieres in einem stereotaktischen Operationsrahmen. Durch einen sagittalen Schnitt in die äußere Kopfhaut wurde die Galea aponeurotica freigelegt. Diese wurde vorsichtig um den Bereich der Sutura coronalis entfernt, um frontal dieser Knochennaht und minimal rechts lateral der Mittellinie einen Zugang für einen Feinbohrer zu schaffen. Nach Bohrung wurden an dieser Stelle mithilfe einer Mikrotiterinjektionsspritze pro Tier 1000 Zellen in 4 µl sterilem PBS-Puffer in einer intrazerebralen Tiefe von 2 mm im Bereich des Striatums eingebracht. Abschließend wurde der Hautschnitt mit medizinischem Gewebekleber versorgt, und die Tiere bis zur Ende der Narkose unter wärmenden Bedingungen unter Beobachtung gehalten. Eine postoperative Schmerzbehandlung erfolgte einmalig mit 50 mg/kg Körpergewicht Novalgin subkutan und 25 mg/20 ml Trinkwasser Metamizol über 3 Tage.

Nach Abnahme des Gesamtkörpergewichtes um mehr als 10% wurden die Versuche abgebrochen. Die Tiere wurden mittels CO₂ Begasung getötet, und das Gehirn explantiert. Dies geschah durch Dekapitation, und vorsichtiges Eröffnen des Schädelinnenraums mit nachfolgender Entnahme des Prosencephalons und Teilen des Mesencephalons. Dieses wurde unmittelbar nach Explantation in 4% Paraformaldehyd für mindestens 24 Stunden fixiert und anschließend in Paraffinblöcke gegossen um den weiteren histologischen Untersuchungen zugeführt zu werden.

2.2.8.2 HE-Färbung und histologische Auswertung

Die explantierten und in Paraffin eingebetteten Mäusehirne wurden zunächst in der Frontalebene im Bereich des Sulcus centralis halbiert, und danach mithilfe eines Mikrotoms in 3 µm Abständen an beiden Hälften in sagittaler Richtung im Abstand von 100 µm geschnitten, und auf einen Objektträger aufgebracht.

Die nunmehr geschnittenen histologischen Präparate wurden der HE-Färbung unterzogen, die die zelluläre Struktur des Gewebes sichtbar werden lässt, indem der saure Anteil der nukleären Strukturen durch (H)ämalaun blau und der basische Anteil des Zytoplasmas durch (E)osin rot gefärbt wurde. Hierzu wurden die Schnitte zunächst in einer Xylol/Isopropanol-Verdünnungsreihe nach folgendem Schema entparaffiniert und hydriert:

- 3 x Xylol für 10 Minuten
- Isopropanol (98%) für 5 Minuten
- Isopropanol (96%) für 5 Minuten
- Isopropanol (90%) für 5 Minuten
- Isopropanol (80%) für 5 Minuten
- Isopropanol (70%) für 5 Minuten
- dH₂O für 5 Minuten

Anschließend wurde die Kernfärbung durch Hämalaun in Wasser unter Zugabe von Ethanol/HCl-Lösung durchgeführt. Hierzu wurde Hämoxylol für 5 Minuten mit dem Präparat inkubiert, danach kurz mit Leitungswasser gespült und im Anschluß daran das Präparat für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Färbung der cytoplasmatischen Strukturen wurde erreicht durch eine sich direkt anschließende 3 minütige Inkubation mit einer 1%igen Eosin-Lösung, kurzem Waschen in dH₂O und aufsteigender Isopropanol/Xylol-Verdünnungsreihe nach folgendem Schema:

- Isopropanol (70%) für 5 Sekunden
- Isopropanol (80%) für 5 Sekunden
- Isopropanol (90%) für 5 Sekunden
- 2 x Isopropanol (100%) für 5 Minuten
- Xylol für 3 Minuten

Zum Schluß wurden die Präparate mit „Eukitt“ eingedeckelt. Die histologische Auswertung erfolgte nach den unter 1.1 und 1.2 genannten und vor allem für das Glioblastom charakteristischen histologischen Kriterien wie erhöhter Zelldichte, mitotischer Aktivität, Kernpolymorphismen und mikrovaskulärer Endothelproliferate sowie Gewebnekrosen.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte versucht werden, eine Langzeit-Zellkultur aus einem Glioblastom unter modifizierten Stammzellbedingungen zu gewinnen, welche über den gesamten Untersuchungs-Zeitraum von mehr als einem Jahr die EGFR-Genamplifikation des ursprünglichen Tumorgewebes auch *in vitro* aufrecht erhält. Hierzu wurde insbesondere durch Entzug des Wachstumsfaktors EGF während der Kultivierung versucht, die Amplifikation in ihrer ursprünglichen Ausprägung zu erhalten, da bisherige Arbeiten gezeigt hatten, daß EGF einerseits das Wachstum stark amplifizierter Tumorzellen hemmt, andererseits aber das Wachstum nicht oder nur schwach amplifizierter Zellen verstärkt (*Barnes et al., 1982; Filmus et al., 1985*). Die Selektion erfolgte zunächst anhand des Wachstums, da nur ein Teil der Kultivierungsversuche überhaupt zu einer Proliferation der Zellen *in vitro* führte. Danach wurden die Zellkulturen auf das Vorhandensein der EGFR-Genamplifikation analysiert, und bei positivem Nachweis entsprechend weiter kultiviert. Für vergleichende Kontrolluntersuchungen wurden auch einige der Zellkulturen weiter übernommen, die keine Amplifikation aufwiesen.

3.1. Etablierung der Glioblastom-Stammzellkulturen

Insgesamt konnte in einem Zeitraum von 16 Monaten aus 31 verschiedenen Glioblastomen Gewebematerial gewonnen werden, welches wie unter 2.2.1 beschrieben verarbeitet und in Kultur genommen wurde. Bei insgesamt 9 dieser Glioblastom-Stammzellkulturen zeigte sich eine mögliche Kultivierung über mehr als zwei Passagen, welche im Folgenden als mGS („modifizierte Glioblastom-Stammzellkultur“) bezeichnet werden sollen, und die Zellkulturen aus einer mGS, die mit unterschiedlichen EGF-Konzentrationen kultiviert wurden, entsprechend als mGS-Kulturen. Bei allen der in 2.2.2. beschriebenen EGF-Konzentrationen (5, 10, 15 und 20 ng/ml) und auch bei fehlendem Zusatz dieses Wachstumsfaktors konnte eine Proliferation der mGS-Kulturen beobachtet werden, wobei sich ohne EGF ein Wachstum erst deutlich später einstellte, so daß hier durchschnittlich in den ersten 4 Monaten der Untersuchungen keinerlei Veränderung zu erkennen war (Tabelle 3.1.A).

<u>mGS</u>	<u>Passagen</u>	<u>Kultivierungsdauer (Tage)</u>
GB-02	7-11	531
GB-03	15-21	527
GB-10	11-12	414
GB-11	7	408
GB-15	13-16	387
GB-17	3	360
GB-18	4-5	360
GB-19	12-16	360
GB-22	4	360

Tabelle 3.1.A: Glioblastom-Stammzellkulturen (mGS), bei denen eine Kultivierung über mehr als zwei Passagen möglich war. Gezeigt wird jeweils die Anzahl der erreichten Passagen und die Dauer der Kultivierung insgesamt. Eine unterschiedliche Zahl der Passagen ergibt sich aus dem unterschiedlichen Wachstum der einzelnen jeweils mit unterschiedlichen EGF-Konzentrationen kultivierten mGS-Kulturen.

Bei den 22 restlichen Glioblastom-Zellkulturansätzen blieben die vereinzelter Zellen über unterschiedlich lange Zeiträume vital, einige bildeten auch einen Verbund in Form einer oder mehrerer Sphären, insgesamt war jedoch bei keiner dieser verbleibenden Zellkulturen eine

Proliferation zu beobachten, und dies war unabhängig von der zur Kultivierung eingesetzten EGF-Konzentration. Die weitere und dauerhafte Kultivierung war dann abhängig von einer wie in 2.2.5 beschriebenen Analyse der Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens in der aus dem ursprünglichen Glioblastom-Tumorgewebe gemäß 2.2.5.1 isolierten genomischen DNA. Eine Übersicht geben die Tabellen 3.1.A und 3.1.B.

<u>mGS</u>		<u>Passagen</u>	<u>Kultivierungsdauer (Tage)</u>
GB-01	GB-20	Weniger als zwei Passagen	Zwischen 15 und 198 Tagen
GB-04	GB-21		
GB-05	GB-23		
GB-06	GB-24		
GB-07	GB-25		
GB-08	GB-26		
GB-09	GB-27		
GB-12	GB-28		
GB-13	GB-29		
GB-14	GB-30		
GB-16	GB-31		

Tabelle 3.1.B: Glioblastom-Stammzellkulturen (mGS), die aufgrund fehlender oder zu gering ausgeprägter Proliferation nicht über mehr als zwei Passagen kultiviert werden konnten. Die sehr unterschiedliche Kultivierungsdauer ergibt sich aus der Tatsache, daß die Zellen dieser mGS verschieden lange vital blieben, und daher auch unterschiedlich lange weiter kultiviert wurden, um doch noch ein Wachstum zu erreichen.

3.2. Wachstumsmuster

Um einen ersten Vergleich der untersuchten mGS zu erreichen, wurde festgestellt, wie sich die Zellen im Kulturmedium phänotypisch in ihrem Wachstum darstellen, dies wird im Folgenden als Wachstumsmuster bezeichnet. Bei allen 31 untersuchten Ansätzen einer Glioblastom-Stammzellkultur ließen sich zu Beginn der Kultivierung drei verschiedene Wachstumsmuster unterscheiden:

1. Die Zellen wuchsen nicht-adhärent in einer oder mehreren, unterschiedlich großen Sphären frei beweglich im Zellkulturmedium
2. Die Zellen wuchsen semi-adhärent, meist in kleineren Sphären aber auch einzeln mit leicht zu lösendem Kontakt zum Boden der Zellkulturflasche
3. Die Zellen wuchsen einzeln adhärent mit schwer zu lösendem Kontakt zum Boden der Zellkulturflasche

Die 9 verschiedenen mGS, welche eine sichtbare Proliferation zeigten, und über mehr als zwei Passagen kultiviert werden konnten, beschränkten sich hingegen auf die beiden unter 1. und 2. genannten Wachstumsmuster. Hierbei war zu beobachten, daß die Zellen am Anfang für die jeweilige mGS nur ein bestimmtes Wachstumsmuster aufwiesen, unabhängig davon, ob die mGS-Kulturen ohne den Wachstumsfaktor EGF oder mit einer EGF-Konzentration von 5, 10, 15 oder 20 ng / ml kultiviert wurden. Eine Übersicht gibt Tabelle 3.2.A. Hierbei gab es von den beiden oben genannten Wachstumsmustern durchaus auch Mischformen, der gesamte Phänotyp einer mGS aber war zu Beginn identisch.

<u>mGS</u>	<u>Wachstumsmuster</u>
GB-02	grosse Sphären bis hin zu nur einer einzelnen „Riesensphäre“ / semi-adhärent
GB-03	grosse Sphären / semi-adhärent
GB-10	grosse und kleine Sphären / nicht-adhärent
GB-11	grosse und kleine Sphären / nicht-adhärent
GB-15	grosse und kleine Sphären / nicht-adhärent
GB-17	kleine Sphären oder einzeln / semi-adhärent
GB-18	grosse Sphären / nicht-adhärent
GB-19	grosse Sphären / nicht-adhärent
GB-22	kleine Sphären / nicht-adhärent

Tabelle 3.2: Glioblastom-Stammzellkulturen (mGS), die über mehr als zwei Passagen kultiviert werden konnten, und ihr Wachstumsmuster zu Beginn der Kultivierung. Der Begriff „Riesensphäre“ von GB-02 wird unter 3.3.1.1 näher erläutert.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnte man beobachten, daß sich das Wachstumsmuster mit zunehmender Kultivierungsdauer verändert. Die in Tabelle 3.2 festgestellten Wachstumsmuster waren so in den ersten 3 Monaten nach sichtbarem Start der Proliferation zu beobachten, danach veränderte sich bei den mGS-Kulturen, deren Zellen semi-adhärent in Sphären oder einzeln wuchsen, das Wachstumsmuster hin zu Zellen, die nicht-adhärent in kleinen oder großen Sphären wuchsen. Bei den mGS-Kulturen, die von vorneherein dieses nicht-adhärente Wachstumsmuster zeigten, blieb es im weiteren Kultivierungsverlauf unverändert. Abbildung 3.2 zeigt anhand einiger Beispiele den mikroskopisch sichtbaren Phänotyp der einzelnen Wachstumsmuster:

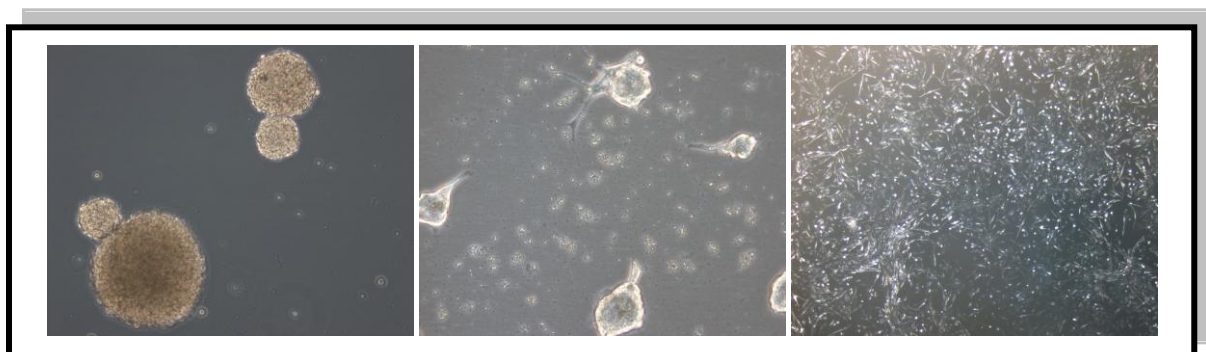


Abbildung 3.2: Mikroskopische Bilder des Wachstumsmusters von Zellen der untersuchten mGS in vitro. Links: nicht-adhärentes Wachstum in Sphären, Mitte: semi-adhärentes Wachstum in Sphären sowie von einzelnen Zellen mit leicht zu lösendem Kontakt zum Boden der Zellkulturflasche, Rechts: adhärentes Wachstum einzelner Zellen mit schwer zu lösendem Kontakt zum Boden der Zellkulturflasche.

3.3. Wachstumsrelationen

Insgesamt betrachtet war es sehr schwierig, aus dem ursprünglichen Tumorgewebe der Glioblastome eine Zellkultur zu etablieren, und danach diese mGS-Kulturen unter den Bedingungen verschiedener EGF-Konzentrationen über einen langen Zeitraum aufrecht zu erhalten. Das Wachstum der einzelnen mGS-Kulturen war so unterschiedlich ausgeprägt, daß es nicht möglich gewesen ist, einen definierten Zeitraum und ein definiertes Verhältnis für das Splitting festzulegen. Beide Faktoren jedoch, sowohl die Intervalle, in denen die Zellen ohne äußere mechanische Einflüsse in vitro wachsen können, als auch das Verhältnis, in dem die Kultur gesplittet wird, haben Einfluß auf das Wachstumsverhalten der mGS-Kulturen. Aufgrund dieser Tatsache und des gerade zu Beginn nur minimal vorhandenen Zellmaterials wurde in dieser Arbeit keine klassische Proliferationskinetik zur Feststellung der Wachstumsgeschwindigkeit vorgenommen. Vielmehr wurde eine Darstellung gewählt – im Folgenden als Wachstumsrelation bezeichnet –, welche eine vergleichende Analyse der Proliferation zu bestimmten Zeitpunkten erlaubt, und dabei sowohl die erreichten Passagen als auch das jeweilige Splittingverhältnis berücksichtigt. Hierzu wurden die einzelnen Splittingvorgänge kumuliert, zu Quartalszeitpunkten errechnet und mit der Anzahl der Passagen zusammen in einem Zeitfenster von 360 Tagen dargestellt. Abbildung 3.3 zeigt diese Berechnung beispielhaft für GB-03.

GB-03											
20.03.2006											
EGF0				EGF5				EGF10			
Datum	Zeit	Passage	Faktor	Datum	Zeit	Passage	Faktor	Datum	Zeit	Passage	Faktor
20.3	0	0	1	20.3	0	0	1	20.3	0	0	1
21.4	32	1	1/2	21.4	32	1	1/2	21.4	32	1	1/2
24.7	126	2	1	31.5	72	2	1	31.5	72	2	1
17.8	150	3	1	6.7	108	3	1/10	6.7	108	3	1/10
31.8	164	4	1/10	17.8	150	4	1/3	17.8	150	4	1/3
22.9	186	5	1/10	31.8	164	5	1/10	31.8	164	5	1/10
9.10	203	6	1/5	22.9	186	6	1/10	22.9	186	6	1/10
20.10	214	7	9/10	9.10	203	7	1/5	9.10	203	7	1/5
7.11	232	8	1/10	20.10	214	8	9/10	20.10	214	8	9/10
29.11	254	9	1/10	7.11	232	9	1/10	7.11	232	9	1/10
3.1	289	10	1/40	22.11	247	10	1/10	29.11	254	10	1/10
19.2	336	11	1/40	13.12	268	11	1/20	27.12	282	11	1/20
20.4	396	12	1/40	3.1	289	12	1/40	31.1	317	12	1/40
4.6	441	13	1	31.1	317	13	1/40	5.3	350	13	1/40
27.6	464	14	1/10	5.3	350	14	1/40	5.4	381	14	1/40
15.8	513	15	1/4	5.4	381	15	1/40	2.5	408	15	1/40
				2.5	408	16	1/40	4.6	441	16	1
				20.6	457	17	1	20.6	457	17	1
				5.7	472	18	1/2	5.7	472	18	1/2
				13.7	480	19	1/2	1.8	499	19	1/3
				1.8	499	20	1/3	15.8	513	20	1/4
				15.8	513	21	1/4				

Abbildung 3.3: Auswertung der Wachstumsrelationen anhand mGS GB-03. In der zweiten Zeile von oben ist das Datum der Inkulturnahme angegeben, in der dritten Zeile von oben findet sich die Konzentration des Wachstumsfaktors EGF, welcher der entsprechenden mGS-Kultur zugesetzt wurde. In der Spalte „Datum“ findet sich das Datum an dem die Zellkultur eine neue Passage erreicht hatte, in der Spalte „Zeit“ findet sich der Kultivierungszeitraum in Tagen, die Spalte „Faktor“ zeigt das jeweils vorgenommene Splittingverhältnis, welches dann in den Abbildungen 3.3.1.1 bis 3.3.2.5 kumuliert dargestellt wird.

Zur Unterscheidung der Wachstumsgeschwindigkeit werden dabei drei unterschiedliche Klassifizierungen vorgenommen, welche als langsame(s), moderate(s) und schnelle(s) Proliferation (oder Wachstum) bezeichnet werden. Dabei bedeuten:

- Langsam: bei $x \leq 5$ Passagen ein kumuliertes Splittingverhältnis von $n \leq 10^3$
- Moderat: bei $5 < x < 11$ Passagen ein kumuliertes Splittingverhältnis von $10^3 < n < 10^9$
- Schnell: bei $x \geq 11$ Passagen ein kumuliertes Splittingverhältnis von $n \geq 10^9$

Jeweils bezogen auf die am schnellsten proliferierende Kultur einer mGS. Weiterhin muß erwähnt werden, daß die Kultivierung ohne EGF, wie bereits unter 3.1 erwähnt, in den ersten 4 Monaten der Untersuchungen keinerlei Erfolge aufwies, so daß im weiteren Verlauf neben den drei ursprünglich für die Experimente ausgewählten EGF-Konzentrationen 0, 5 und 10 ng/ml auch mGS-Kulturen mit den drei EGF-Konzentration 10, 15 und 20 ng/ml kultiviert wurden. Einen Überblick gibt Tabelle 3.3. Daher soll nun zunächst das Ergebnis der beobachteten Wachstumsrelationen der mGS-Kulturen mit verschiedenen EGF-Konzentrationen aus derselben mGS dargestellt werden (interne Wachstumsrelation), und danach die Wachstumsrelationen der mGS-Kulturen mit gleicher EGF-Konzentration aus unterschiedlichen mGS (externe Wachstumsrelation).

<u>mGS</u>	<u>Verwendete EGF-Konzentrationen</u>
GB-02	mGS-Kulturen mit 0, 5 und 10 ng/ml EGF
GB-03	
GB-17	
GB-18	
GB-19	
GB-22	
GB-10	mGS-Kulturen mit 10,15 und 20 ng/ml EGF
GB-11	
GB-15	

Tabelle 3.3: Glioblastom-Stammzellkulturen (mGS), die über mehr als zwei Passagen kultiviert werden konnten und die EGF-Konzentrationen, mit denen die einzelnen mGS-Kulturen kultiviert worden sind.

3.3.1. Interne Wachstumsrelationen

3.3.1.1. GB-02:

Die mGS-Kulturen von GB-02 zeigten insgesamt eine moderate Proliferation, es ließen sich hier minimal 7 und maximal 11 Passagen in 531 Tagen darstellen, im unten gezeigten Zeitfenster des Untersuchungszeitraums von 360 Tagen jedoch maximal 7 Passagen. Die mGS-Kultur, die ohne den Wachstumsfaktor EGF kultiviert wurde, zeigte nach ca. 380 Tagen und der 7. Passage kein weiteres Wachstum, und die Kultur, die mit einer EGF-Konzentration von 5 ng/ml kultiviert wurde, zeigte nach ca. 400 Tagen und der 8. Passage kein weiteres Wachstum. Bis zum Ende der Untersuchungen wuchs lediglich die mGS-Kultur, die einen Zusatz von 10 ng/ml EGF erhalten hatte. Es gab einen sichtbaren

Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit abhängig davon, ob der Wachstumsfaktor EGF hinzugegeben wurde, oder nicht. Die beiden mGS-Kulturen, die die EGF-Konzentration von 5 und 10 ng/ml erhielten, zeigten ein schnelleres Wachstum als die mGS-Kultur, die keinerlei EGF erhalten hatte. Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.1.1. Die Zellen zeigten bei jeder EGF-Konzentration eine Neigung zur Aggregation zu größeren Sphären, am deutlichsten trat dieses Phänomen jedoch ohne Zugabe des Wachstumsfaktors EGF auf, hier bildete sich regelmäßig aus allen Zellen nur eine „Riesensphäre“, die frei beweglich und semi-adhärent in der Glioblastom-Zellkultur wuchs und stetig größer wurde. Diese „Riesensphäre“ konnte bis zur pH-Wert-Änderung des Zellkulturmediums, die ein Splitten notwendig machte, einen Durchmesser von 5 mm erreichen. Ab einem Durchmesser von mehr als 3 mm bildete sich ein mikroskopisch erkennbarer dunkler Bereich aus, der mit zunehmendem Durchmesser ebenfalls größer wurde. Nach mechanischer Dissoziation dieser Sphäre im Rahmen der Splittingvorgänge fanden sich die vereinzelteten Zellen innerhalb von ca. 7 Tagen wieder zu einer großen Sphäre zusammen, die in der Folge erneut stetig größer wurde.

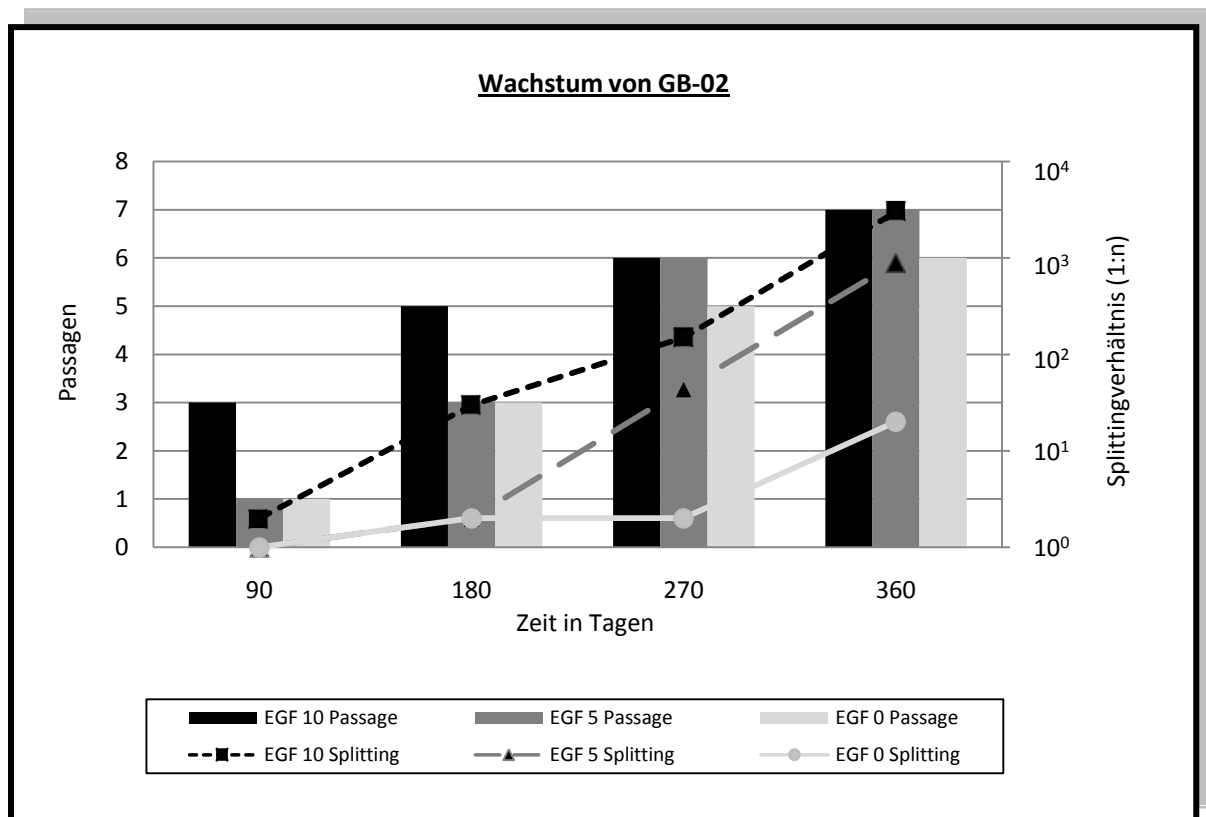


Abbildung 3.3.1.1: Gezeigt wird das Wachstum der drei mGS-Kulturen von GB-02, die jeweils mit 0, 5 und 10 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

3.3.1.2. GB-03

Die von der mGS GB-03 abgeleiteten mGS-Kulturen gehörten zu den schnell proliferierenden Zellkulturen, in einem gesamten Kultivierungszeitraum von 527 Tagen wurden 15 bis 21 Passagen

erreicht, bezogen auf das Zeitfenster des Untersuchungszeitraums konnten maximal 14 Passagen dargestellt werden. Alle 3 jeweils unterschiedlich mit 0, 5 oder 10 ng/ml EGF kultivierten mGS-Kulturen zeigten ein kontinuierliches Wachstum bis zum Ende der Untersuchungen. Auch hier gab es einen sichtbaren Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit, abhängig von der zugegebenen EGF-Konzentration. Am schnellsten wuchs die mGS-Kultur, die mit 5 ng/ml EGF kultiviert wurde, hier ließen sich bis zum Ende der Untersuchungen 21 Passagen darstellen, wohingegen die mGS-Kulturen, die mit 0 und 10 ng/ml EGF kultiviert wurden, im gleichen Zeitraum entsprechend nur 15 und 20 Passagen durchliefen. Auch hier wuchs die mGS-Kultur, die ohne den Wachstumsfaktor EGF kultiviert wurde, am langsamsten. Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.1.2.

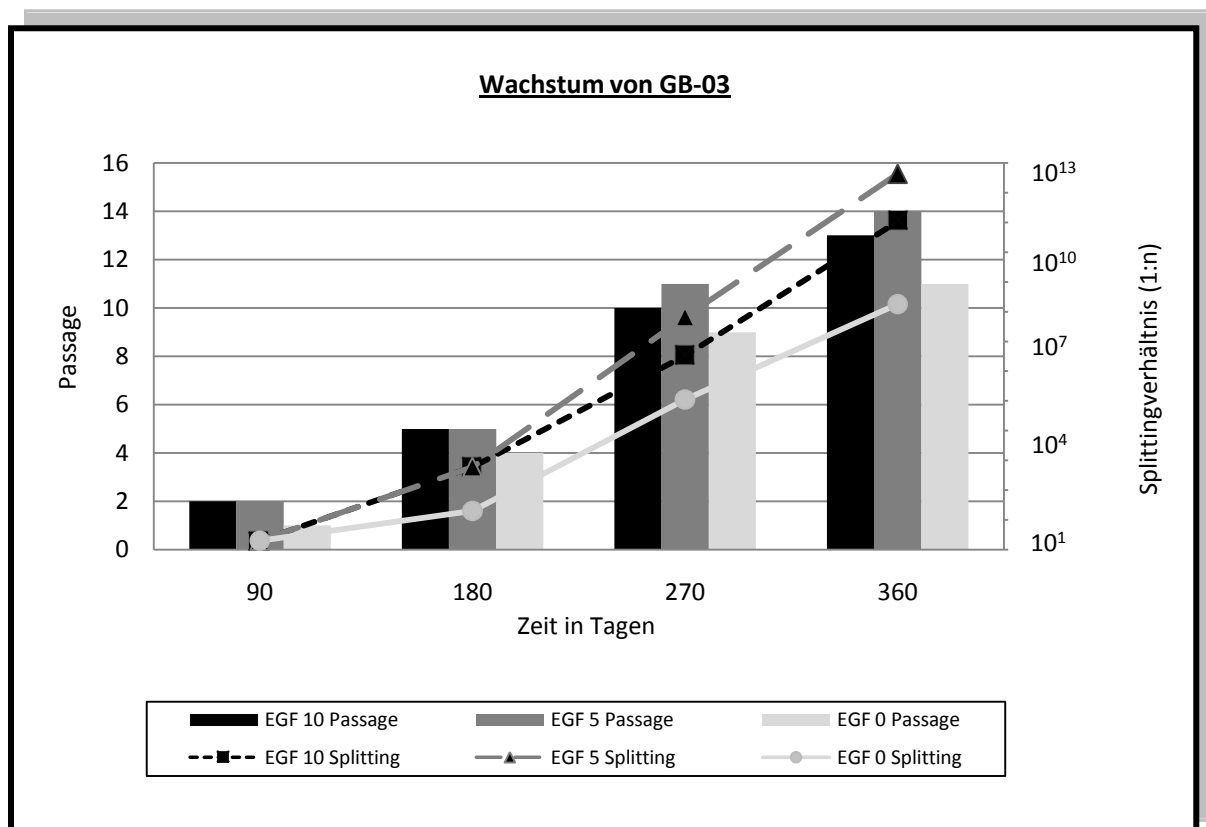


Abbildung 3.3.1.2: Gezeigt wird das Wachstum der drei mGS-Kulturen von GB-03, die jeweils mit 0, 5 und 10 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

3.3.1.3. GB-17

In einem Zeitraum von zunächst ca. 140 Tagen wurden die 3 mGS-Kulturen, die mit den EGF-Konzentrationen von 0, 5 und 10 ng/ml kultiviert wurden, jeweils dreimal zu gleichen Zeitpunkten gesplittet. Eine mechanische Dissoziation der Zellen mit anschließender Expansion war notwendig, da die Kulturen trotz geringer Proliferation eine entsprechende pH-Wert-Veränderung des Zellkulturmediums aufwiesen. Innerhalb der sich bildenden Zell-Sphären zeigten sich dunkle Regionen, die hier jedoch bei einem sehr viel kleineren Durchmesser der Sphären auftraten als bei

der mGS-Kultur GB-02 ohne EGF, meist bei einem Durchmesser von unter 1 mm. Nach den 140 Tagen blieben die Zellen zwar vital, stellten aber bei allen drei verwendeten EGF-Konzentrationen das weitere Wachstum ein. Daher ließen sich nur 3 Passagen darstellen, so daß diese mGS-Kulturen zu den langsam proliferierenden zu zählen sind.

3.3.1.4. GB-18

Auch die mGS-Kulturen von GB-18 proliferierten langsam, über einen Zeitraum von 360 Tagen wurde maximal Passage 5 erreicht. Zunächst zeigte die mGS-Kultur, die ohne den Wachstumsfaktor EGF kultiviert wurde, gemessen an den erreichten Passagen und dem Splittingverhältnis die stärkste Proliferation, jedoch konnte bei dieser Zellkultur nach ca. 180 Tagen kein weiteres Wachstum festgestellt werden. Ähnlich verhielt es sich mit der mGS-Kultur, die mit einer Konzentration von 5 ng/ml EGF kultiviert wurde, diese zeigte im Vergleich zu der mGS-Kultur ohne EGF eine langsamere Proliferation und stellte nach ca. 230 Tagen das Wachstum ein. Lediglich die mGS-Kultur, die mit einer Konzentration von 10 ng/ml EGF kultiviert wurde, konnte über den gesamten Untersuchungszeitraum von 360 Tagen kultiviert werden, jedoch verlangsamte sich hier ebenfalls nach ca. 180 Tagen die Wachstumsgeschwindigkeit. Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.1.4.

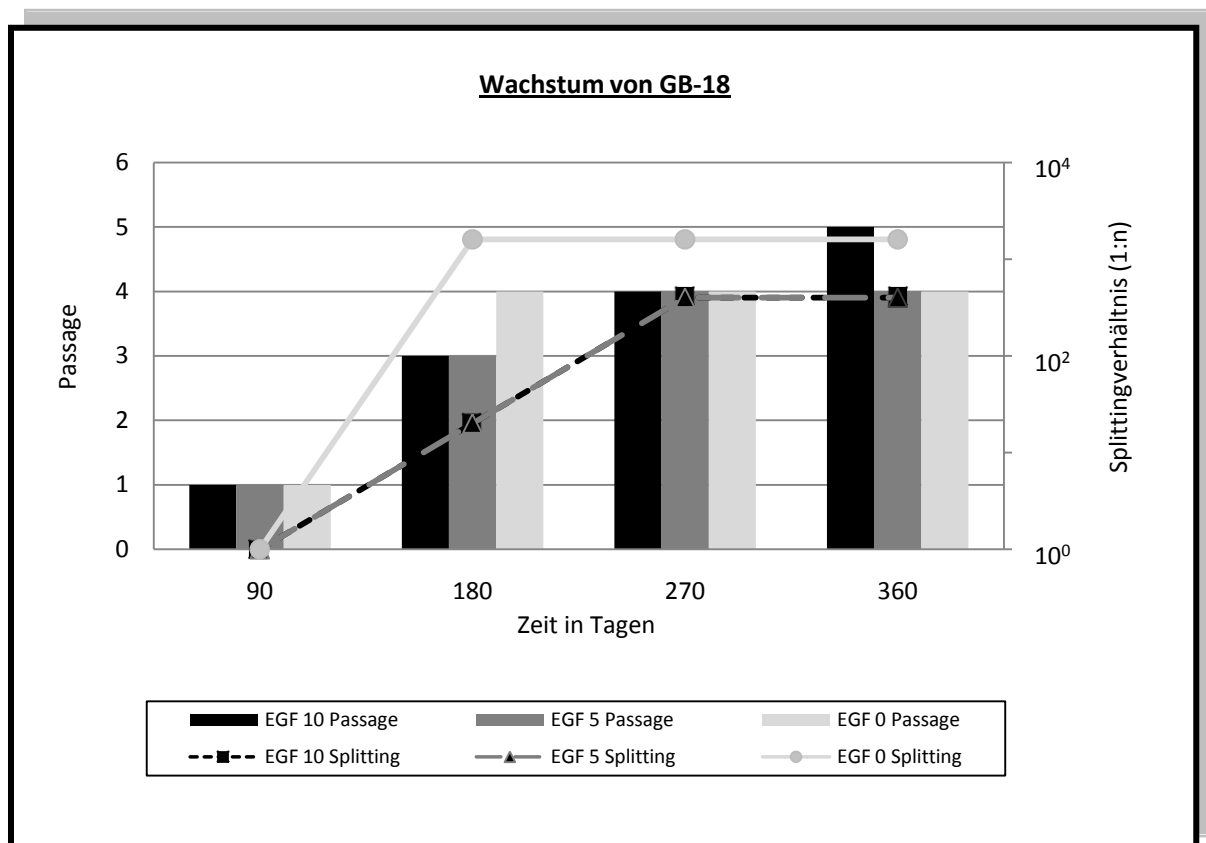


Abbildung 3.3.1.4: Gezeigt wird das Wachstum der drei mGS-Kulturen von GB-18, die jeweils mit 0, 5 und 10 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

3.3.1.5. GB-19

Alle 3 mGS-Kulturen von GB-19 konnten bis zum Ende der Untersuchungen nach 360 Tagen kultiviert werden, und zeigten dabei ein schnelles Wachstum, entsprechend wurde hier minimal Passage 12 bei einer Konzentration von 10 ng/ml EGF und maximal Passage 16 bei einer Konzentration von 5 ng/ml EGF erreicht. Gemessen an der Anzahl der erreichten Passagen und dem Splittingverhältnis zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der mGS-Kultur, die mit 5 ng/ml EGF kultiviert wurde zu den anderen beiden mGS-Kulturen, die mit 10 ng/ml EGF beziehungsweise gänzlich ohne Zusatz des Wachstumsfaktors EGF kultiviert wurden. Bereits nach ca. 80 Tagen wuchs die mit 5 ng/ml EGF kultivierte mGS-Kultur schneller, und setzte dieses im Vergleich zu den beiden anderen mGS-Kulturen stärkere Wachstum bis zum Ende der Untersuchungen fort. Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.1.5.

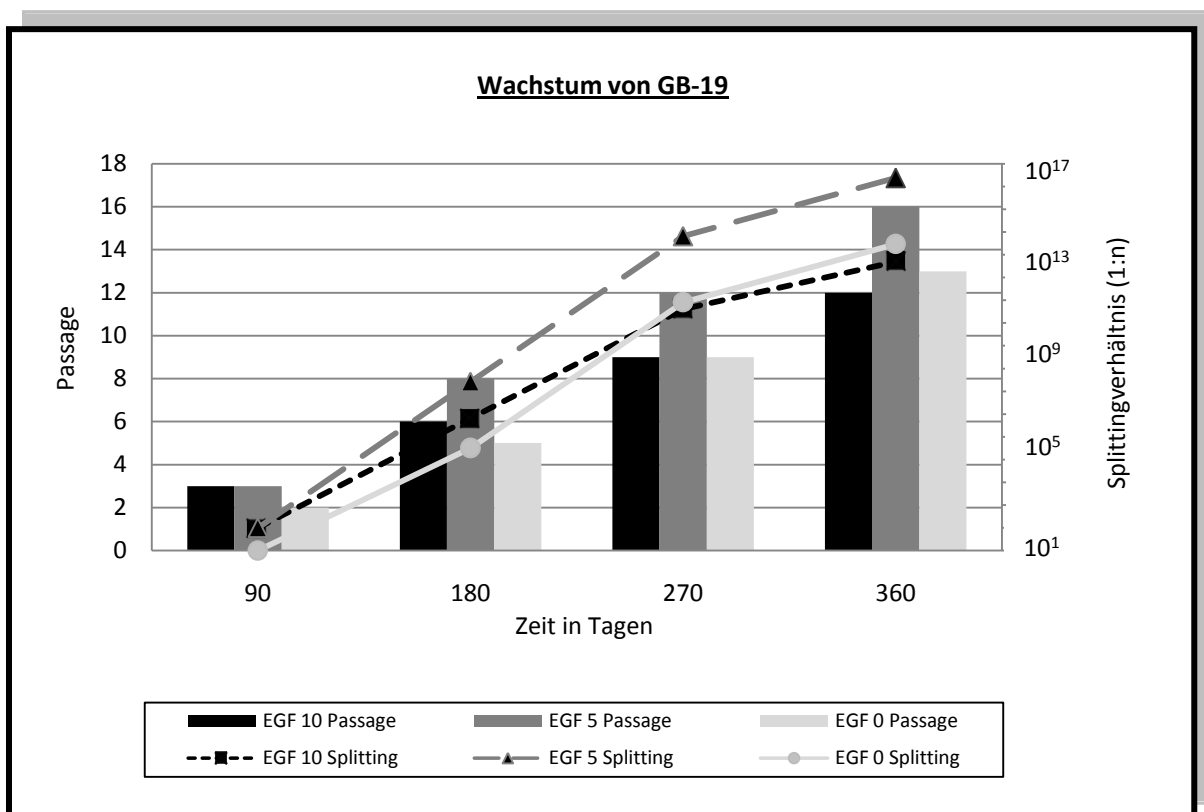


Abbildung 3.3.1.5: Gezeigt wird das Wachstum der drei mGS-Kulturen von GB-19, die jeweils mit 0, 5 und 10 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

3.3.1.6. GB-22

Ähnlich wie bei GB-17 wuchsen die mGS-Kulturen von GB-22 unabhängig von der eingesetzten EGF-Konzentration von 0, 5 und 10 ng/ml alle vergleichbar langsam, und mußten trotz minimaler Proliferation aufgrund des veränderten pH-Wertes im Zellkulturmedium jeweils viermal zu gleichen Zeitpunkten gesplittet werden. Diese 4 Passagen umfassten einen Zeitraum von ca. 285 Tagen, danach zeigte sich bis zum Ende der Untersuchungen nach 360 Tagen kein weiteres Wachstum.

3.3.1.7. GB-10

Bei GB-10 wurden die 3 mGS-Kulturen jeweils mit Zusätzen von 10, 15 und 20 ng/ml EGF kultiviert, und alle so etablierten Zellkulturen wuchsen länger als in dem dargestellten Zeitfenster von 360 Tagen, in welchem maximal Passage 12 erreicht wurde. Im gesamten Untersuchungszeitraum von 414 Tagen erreichte die mGS-Kultur mit 20 ng/ml EGF Passage 11, und die beiden mGS-Kulturen mit 10 und 15 ng/ml EGF wuchsen bis zur Passage 12. Demzufolge gehört GB-10 zu den schnell proliferierenden Zellkulturen. Berücksichtigt man sowohl die Passagenzahl, als auch das Splittingverhältnis, zeigte die mGS-Kultur mit einem Zusatz von 10 ng/ml EGF die schnellste Proliferation. Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.1.7.

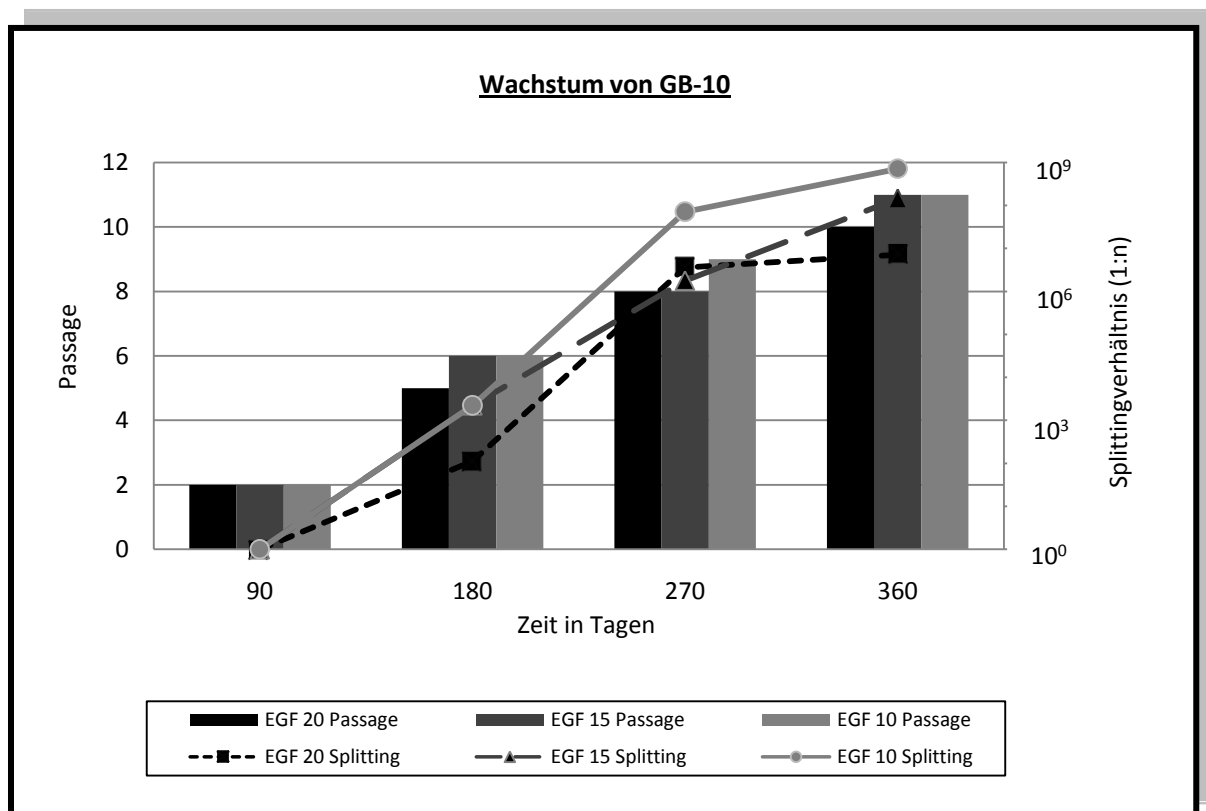


Abbildung 3.3.1.7: Gezeigt wird das Wachstum der drei mGS-Kulturen von GB-10, die jeweils mit 10, 15 und 20 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

3.3.1.8. GB-11

Ein moderates Wachstum wie schon bei GB-02 beschrieben zeigten auch die mGS-Kulturen aus GB-11, welche jedoch mit den EGF-Konzentrationen von 10, 15 und 20 ng/ml kultiviert wurden. Diese proliferierten mit vergleichbarer Stärke, und erreichten alle in einem Zeitraum von ca. 300 Tagen Passage 7. Keine der mGS-Kulturen konnte kontinuierlich bis zum Ende des Untersuchungszeitraums nach 408 Tagen weiter expandiert werden, da alle im weiteren Verlauf der Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Proliferation vermissen ließen.

3.3.1.9. GB-15

Erneut unabhängig von der eingesetzten EGF-Konzentration konnten die mGS-Kulturen aus GB-15 alle über den gesamten Untersuchungszeitraum von 387 Tagen kontinuierlich expandiert werden, und erreichten im Falle der mGS-Kultur mit 20 ng/ml EGF minimal Passage 13 und im Falle der mGS-Kulturen mit 15 und 20 ng/ml EGF maximal Passage 16. Im dargestellten Zeitfenster von 360 Tagen wuchsen die Zellkulturen maximal bis zur Passage 15, wobei hier die mGS-Kulturen mit 10 und 15 ng/ml EGF einen leichten Wachstumsvorteil gegenüber der mGS-Kultur mit 20 ng/ml EGF hatten. Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.1.9.

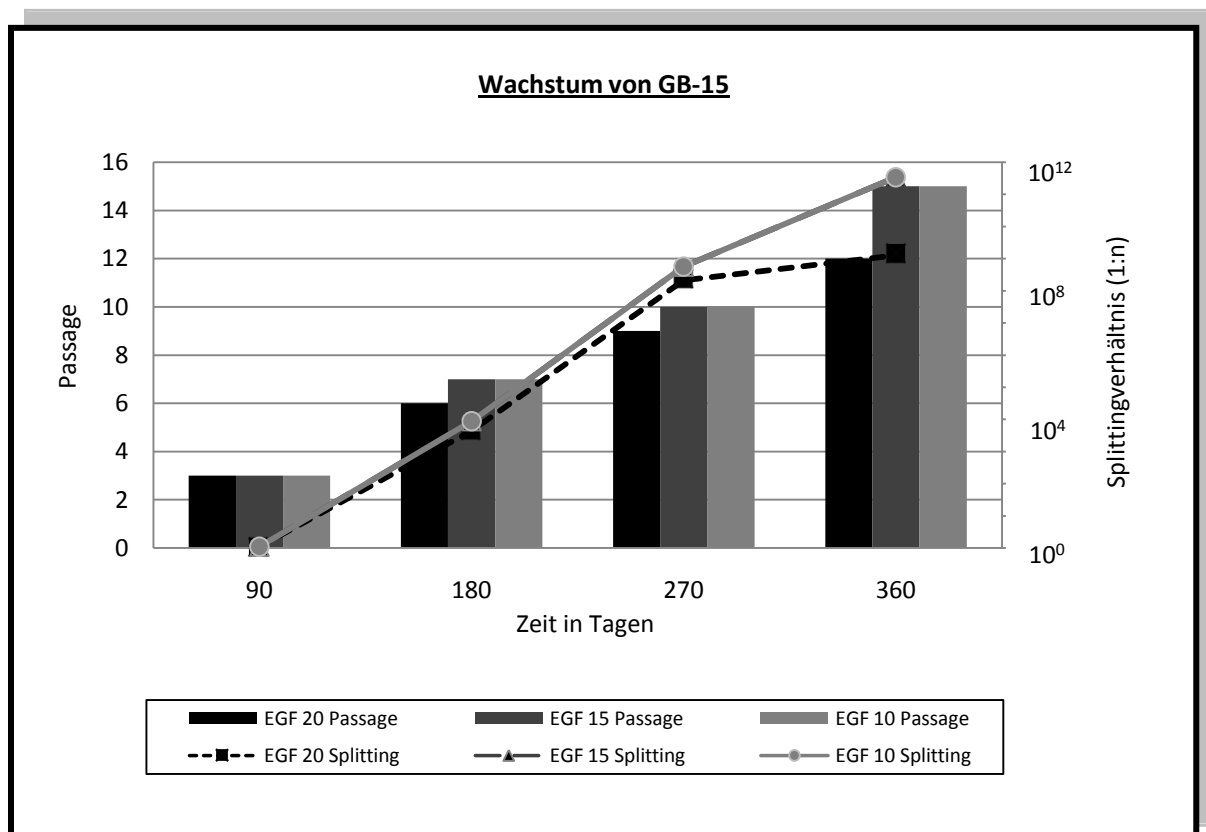


Abbildung 3.3.1.9: Gezeigt wird das Wachstum der drei mGS-Kulturen von GB-15, die jeweils mit 10, 15 und 20 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

Zusammenfassung

Nimmt man die Beobachtungen und Ergebnisse aus den Punkten 3.3.1.1 – 3.3.1.9 der internen Wachstumsrelationen zusammen, ist festzustellen, daß entsprechend der unter 3.3.1 gemachten Definition der Wachstumsgeschwindigkeiten die einzelnen Kulturen aus einer mGS immer alle in dieselbe Klassifikation eingeordnet werden können, so daß 4 der untersuchten mGS ein schnelles, 2 ein moderates und 4 ein langsames Wachstum aufzeigten, Tabelle 3.3.1 zeigt dies im Überblick.

<u>mGS</u>	<u>mGS-Kulturen</u>	<u>Wachstum</u>
GB-03	0, 5 und 10 ng/ml EGF	schnell
GB-19		
GB-10	10, 15 und 20 ng/ml EGF	
GB-15		
GB-02	0, 5 und 10 ng/ml EGF	moderat
GB-11	10, 15 und 20 ng/ml EGF	
GB-17	0, 5 und 10 ng/ml EGF	langsam
GB-18		
GB-22		

Tabelle 3.3.1: Übersicht über die Wachstumsgeschwindigkeiten im Vergleich. Es hat sich gezeigt, daß immer alle 3 abgeleiteten mGS-Kulturen unabhängig von der zugesetzten EGF-Konzentration in eine bestimmte Klassifizierung der Wachstumsgeschwindigkeit eingeordnet werden können.

3.3.2. externe Wachstumsrelationen

Im nächsten Schritt sollten nun die mGS-Kulturen gegenübergestellt werden, die sich aus unterschiedlichen Glioblastomen ableiteten, jedoch bei gleicher EGF-Konzentration kultiviert worden waren.

3.3.2.1. Kultivierung mit 0 ng/ml EGF

Die beiden mGS-Kulturen aus GB-03 und GB-19 unterschieden sich bezüglich der erreichten Passagenzahl und des Splittingverhältnisses von allen anderen ohne den Wachstumsfaktor EGF kultivierten mGS-Kulturen auch bei externer Betrachtung der Wachstumsrelationen durch ein hierbei im Vergleich deutlich zu sehendes schnelleres Wachstum. Dabei konnte dieser Unterschied in der Proliferation keineswegs schon zu Beginn der Untersuchungen festgestellt werden, sondern zeigte sich bei GB-03 erst nach Ablauf von ca. 180 Tagen durch ein beschleunigtes Wachstum gegenüber den anderen Zellkulturen, bei der am schnellsten proliferierenden mGS-Kultur GB-19 war dies bereits nach etwa 100 Tagen zu beobachten. Die mGS-Kultur aus GB-02 zeigte ohne EGF im Vergleich ein eher moderates Wachstum, wie auch schon unter 3.3.1.1 erläutert. Da sich hier jedoch immer wieder die bereits in Tabelle 3.2 und 3.3.1.1 erwähnte singuläre „Riesensphäre“ bildete, die entsprechend häufig mechanisch dissoziiert werden musste, trotzdem aber nur eine geringe Vermehrung der Zellzahl zeigte, erreichte diese mGS-Kultur aus GB-02 eine im Vergleich hohe Passage bei gleichzeitig niedrigem Splittingverhältnis. Hierdurch gruppiert sie sich in dieser externen Betrachtungsweise der Wachstumsrelationen eher zu der Gruppe der langsam wachsenden Zellkulturen. Zu dieser Gruppe gehörte unter anderem die mGS-Kultur aus GB-18, welche ohne EGF-Zusatz relativ schnell bereits nach ca. 50 Tagen eine Proliferation feststellen ließ, diese jedoch wie unter 3.3.1.4 beschrieben nach ca. 180 Tagen einstellte. Die mGS-Kulturen aus GB-17 und GB-22 zeigten im Vergleich dazu über einen sehr langen Zeitraum kaum eine Proliferation, so daß gerade bei den Letztgenannten der

Unterschied zu den schnell wachsenden Zellkulturen GB-03 und GB-19 sowohl bezogen auf die erreichte Passage als auch auf das kumulierte Splittingverhältnis noch deutlicher zu Tage tritt. Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.2.1.

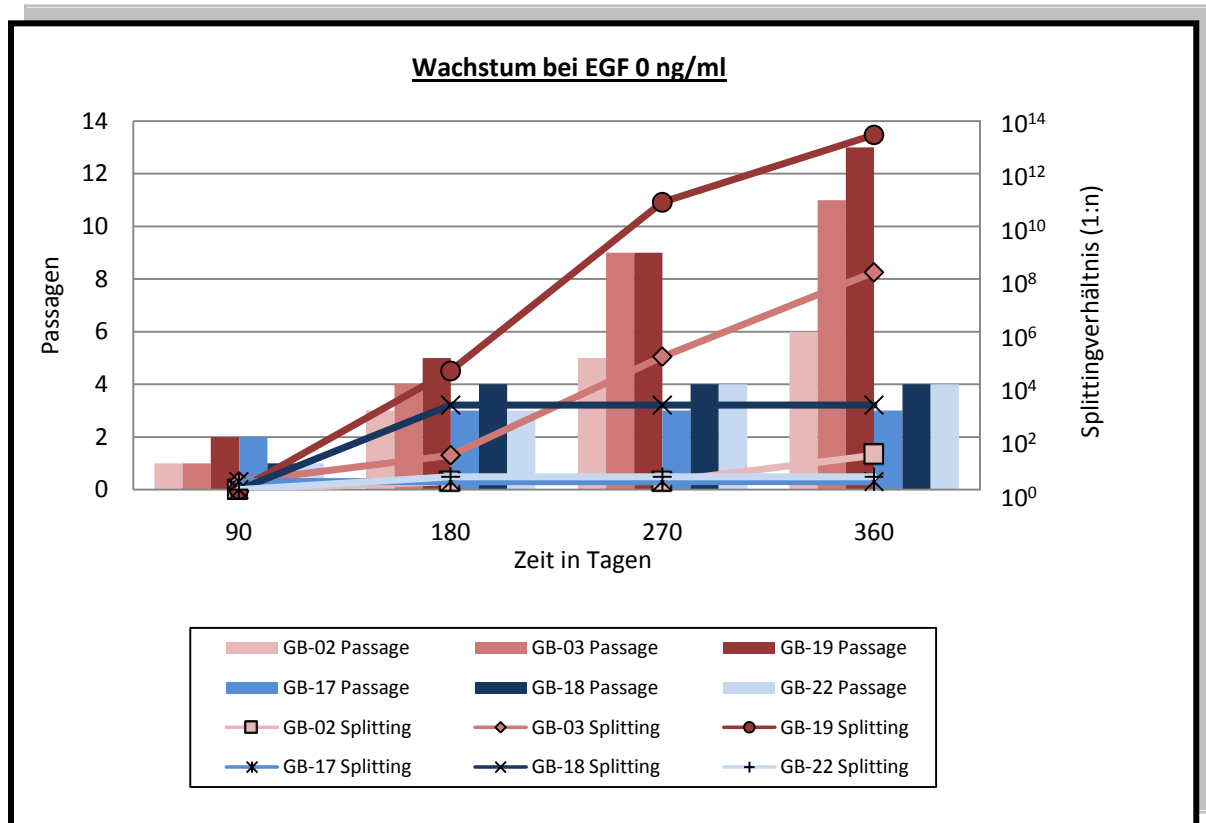


Abbildung 3.3.2.1: Gezeigt wird das Wachstum der mGS-Kulturen von GB-02, GB-03, GB-19 (rot schattiert) und GB-17, GB-18 und GB-22 (blau schattiert), die alle ohne den Wachstumsfaktor EGF kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die rot schattierten mGS-Kulturen wuchsen über den gesamten Zeitraum von 360 Tagen, die blau schattierten stellten vorher das Wachstum zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

3.3.2.2. Kultivierung mit 5 ng/ml EGF

Auch bei der Kultivierung mit einer Konzentration von 5 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF zeigte sich bezüglich der erreichten Passagenzahl und dem Splittingverhältnis ein deutlicher Unterschied der mGS-Kulturen aus GB-03 und GB-19 zu allen anderen bei diesem EGF-Zusatz untersuchten Zellkulturen. Bereits nach ca. 80 Tagen, somit später als bei der Kultivierung ohne EGF, zeigte sich ein beschleunigtes Wachstum dieser beiden mGS-Kulturen, welches bis zum Ende des hier dargestellten Zeitfensters aufrecht erhalten wurde, wobei GB-19 erneut am schnellsten proliferierte. Ebenfalls vergleichbar zu dem unter 3.3.2.1 geschilderten Sachverhalt bildete GB-02 auch bei dieser EGF-Konzentration in Relation zu den anderen Zellkulturen ein moderates Wachstum ab, welches korrigiert um das Splittingverhältnis diese mGS-Kultur wiederum in die Nähe der langsam wachsenden Gruppe rückt. GB-18 zeigte eher als GB-02 eine Proliferation, allerdings ließ sich nur GB-02 bei dieser EGF-Konzentration kontinuierlich über die abgebildeten 360 Tage expandieren, GB-18 stellte nach ca. 230 Tagen das weitere Wachstum ein (siehe 3.3.1.4.). Wie schon bei der Kultivierung

ohne EGF beschrieben, gehörten die beiden mGS-Kulturen aus GB-17 und GB-22 auch hier zu den langsam wachsenden Zellkulturen, was im Vergleich zu den anderen mGS-Kulturen umso deutlicher ausgeprägt war, und beide stellten vor Ablauf von 360 Tagen die weitere Proliferation ein (siehe 3.3.1.3 und 3.3.1.6). Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.2.2.

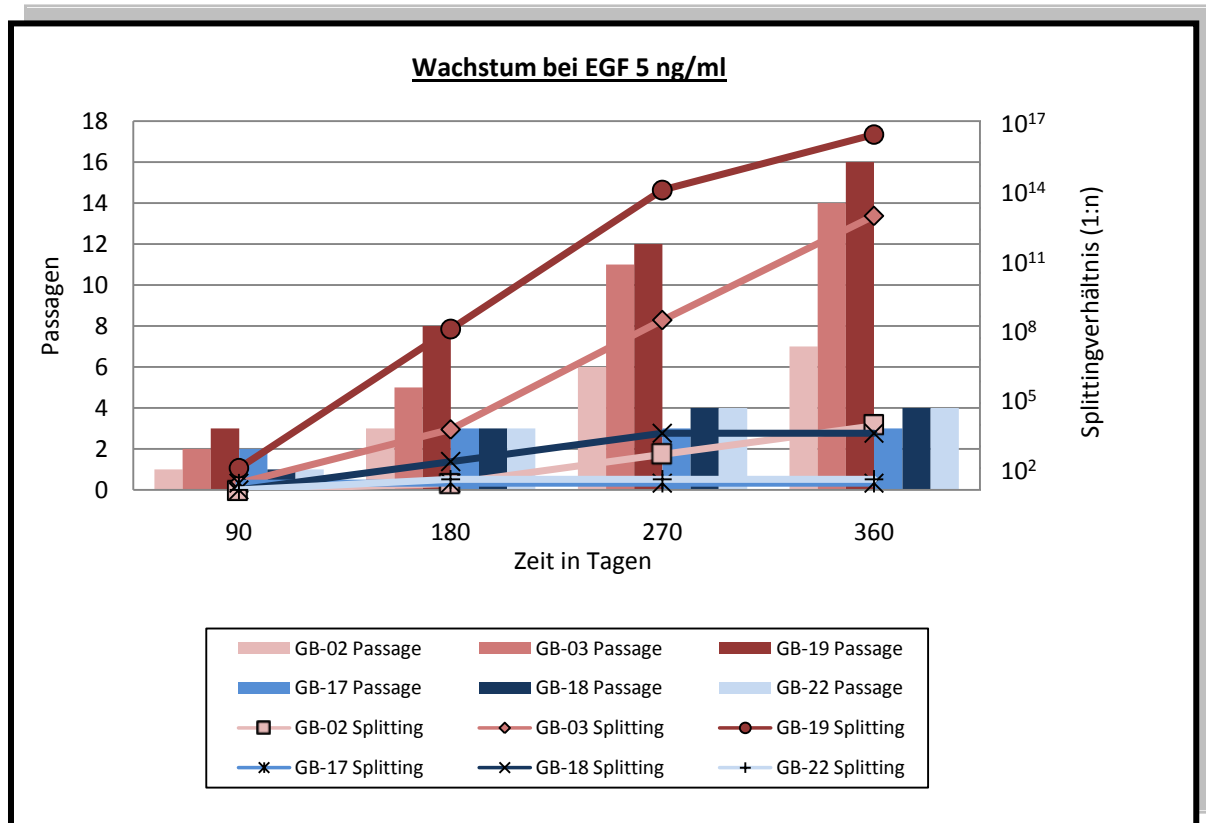


Abbildung 3.3.2.2: Gezeigt wird das Wachstum der mGS-Kulturen von GB-02, GB-03, GB-19 (rot schattiert) und GB-17, GB-18 und GB-22 (blau schattiert), die alle mit einer EGF-Konzentration von 5 ng/ml kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die rot schattierten mGS-Kulturen wuchsen über den gesamten Zeitraum von 360 Tagen, die blau schattierten stellten vorher das Wachstum zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

3.3.2.3. Kultivierung mit 10 ng/ml EGF

Diese EGF-Konzentration erlaubte einen Vergleich der externen Wachstumsrelationen aller 9 untersuchten mGS-Kulturen, und führte zu dem Ergebnis, daß, gemessen an Passagenzahl und Splittingverhältnis, zusätzlich zu GB-03 und GB-19 auch GB-10 und GB-15 eine schnelle Proliferationsgeschwindigkeit aufwiesen, welche sich von der bei den langsam wachsenden Zellkulturen deutlich unterschied. Nach ca. 300 Tagen zeigte die mGS-Kultur aus GB-10 jedoch ein verlangsamtes Wachstum, so daß diese Zellkultur zum Ende des dargestellten Zeitfensters eine etwas weniger klare Abgrenzung zu den anderen mGS-Kulturen erkennen ließ. Trotzdem konnten alle 4 schnell wachsenden mGS-Kulturen bei dieser EGF-Konzentration über den gesamten Untersuchungszeitraum kontinuierlich expandiert werden. Gleichwohl war ein klarer Wachstumsvorteil von GB-19 gegenüber den anderen 3 schnell wachsenden Zellkulturen bei diesem EGF-Zusatz nicht mehr auszumachen. Ähnlich bei GB-11: Diese mGS-Kultur zeigte unter den Kulturbedingungen von 10 ng/ml EGF ein im Vergleich moderates Wachstum, welches nur

geringfügig stärker ausgeprägt war als die Proliferation der ebenfalls moderat wachsenden mGS-Kultur GB-02. Letztere wuchs über den gesamten Untersuchungszeitraum, mithin länger als 360 Tage, wohingegen GB-11 nach etwa 320 Tagen keine weitere Proliferation aufzeigte. Beide dieser gemäß der unter 3.3.1 getroffenen Definition moderat wachsenden mGS-Kulturen erwiesen sich indes auch bei der Kultivierung mit 10 ng/ml bei Berücksichtigung sowohl der Passagenzahl als auch des Splittingverhältnisses als eher der Gruppe der langsam wachsenden Zellkulturen zugehörig. Bezüglich dieser Gruppe ist zu sagen, daß im Gegensatz zu den beiden auch bei dieser EGF-Konzentration langsam wachsenden mGS-Kulturen GB-17 und GB-22, die auch hier schon vor Ablauf von 360 Tagen nicht weiter proliferierten, GB-18 über den gesamten Untersuchungszeitraum kultiviert werden konnte, wenn sich auch das ohnehin gering ausgeprägte Wachstum wie unter 3.3.1.4 bereits beschrieben, nach 180 Tagen nochmals reduzierte (siehe Abbildung 3.3.2.3).

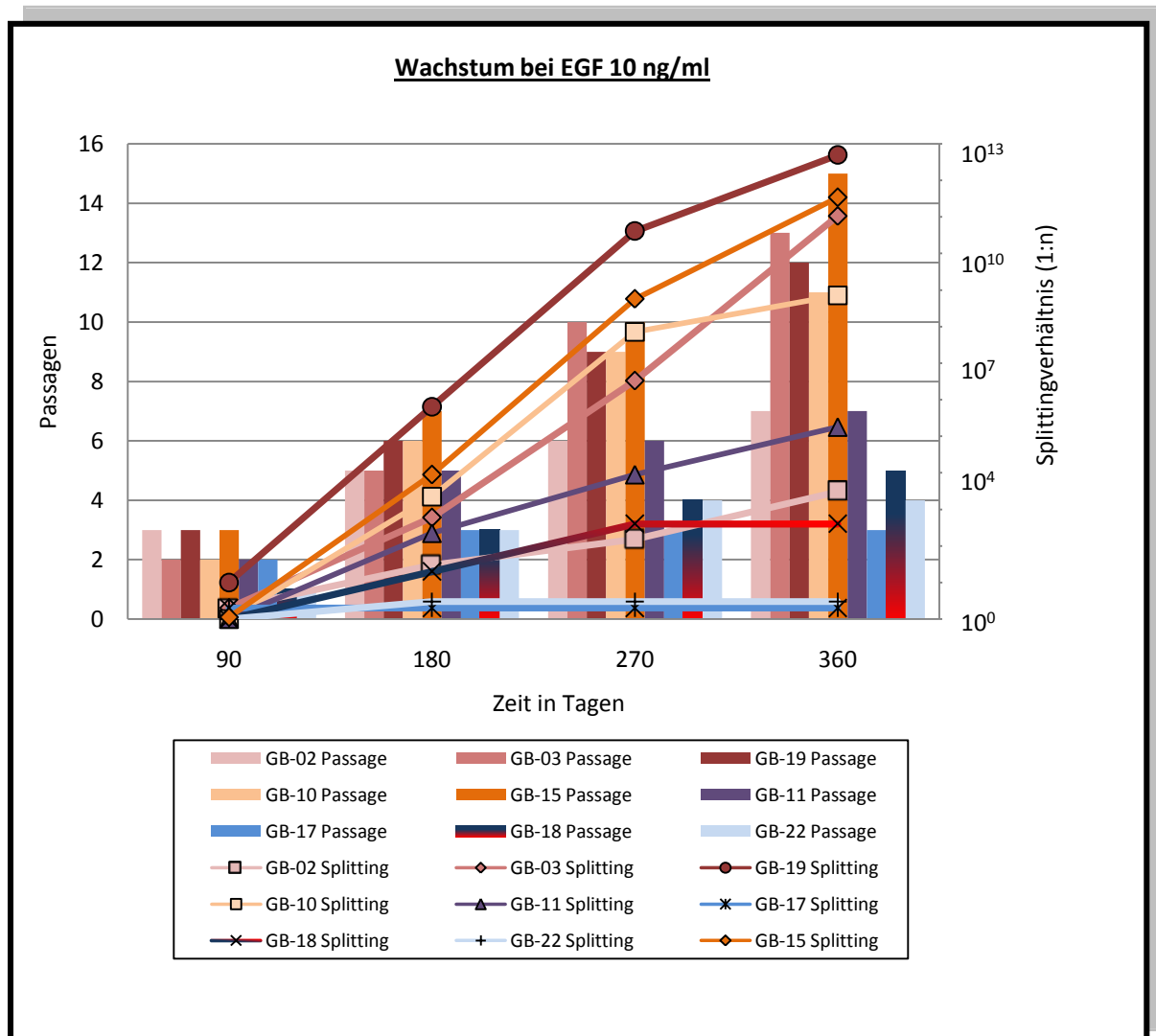


Abbildung 3.3.2.3: Gezeigt wird das Wachstum der mGS-Kulturen von GB-02, GB-03, GB-19, GB-10, GB-15 (rot und orange schattiert) und GB-17, GB-18, GB-22 und GB-11 (blau und violett schattiert), die alle mit einer EGF-Konzentration von 10 ng/ml kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die rot und orange schattierten mGS-Kulturen wuchsen über den gesamten Zeitraum von 360 Tagen, die blau und violett schattierten stellten vorher das Wachstum zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein. GB-18 hat in diesem Fall eine gradierte blau-rote Darstellung, weil nur bei der mGS-Kultur dieser EGF-Konzentration eine Kultivierung über den gesamten Zeitraum möglich war. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

3.3.2.4. Kultivierung mit 15 ng/ml EGF

Der externe Vergleich der Wachstumsrelationen der mGS-Kulturen von GB-10, GB-11 und GB-15 zeigte bei der Kultivierung mit 15 ng/ml EGF sowohl einen Unterschied zwischen den beiden schnell wachsenden mGS-Kulturen GB-10 und GB-15 als auch zwischen den schnell wachsenden und der langsam proliferierenden mGS-Kultur aus GB-11. GB-15 zeigte das schnellste Wachstum, und konnte wie auch GB-10 bis zum Ende der Untersuchungen kontinuierlich expandiert werden, demgegenüber stellte GB-11 vor Ablauf des dargestellten Zeitfensters von 360 Tagen seine moderate und damit in diesem Vergleich auch langsamste Proliferation ein. Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.2.4.

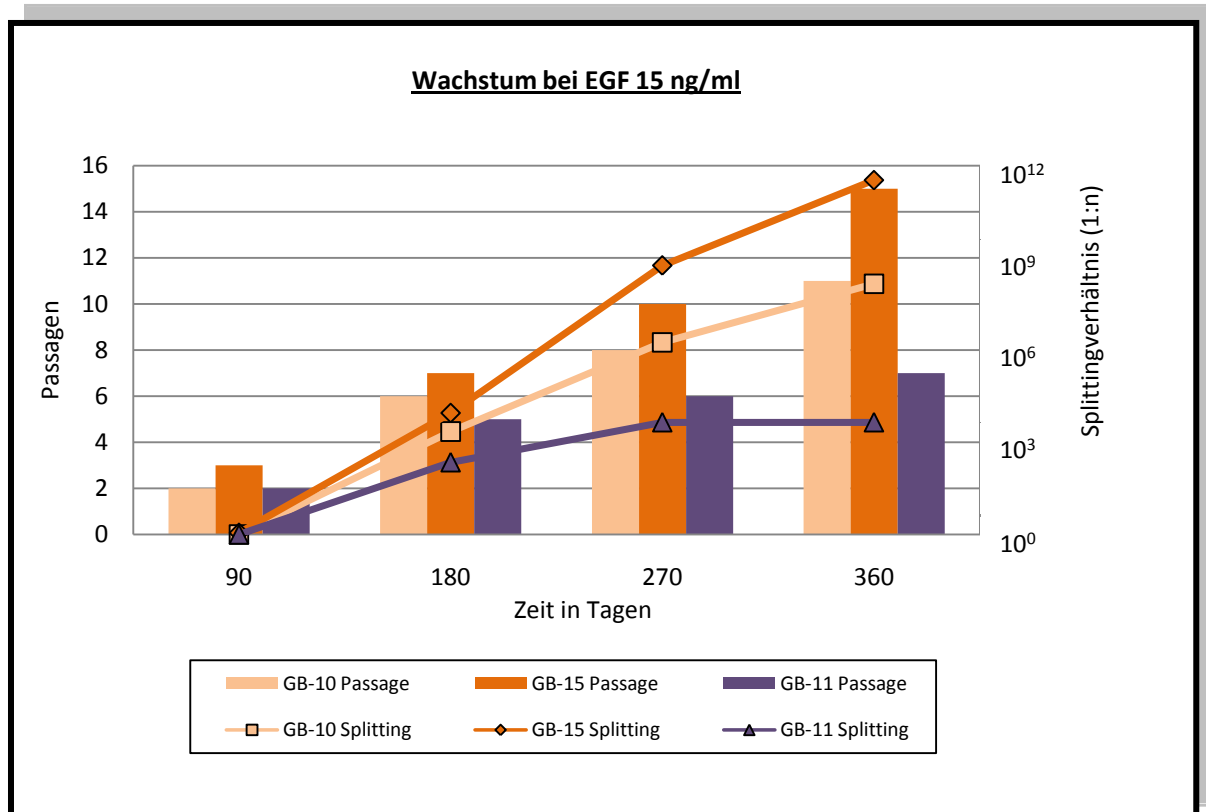


Abbildung 3.3.2.4: Gezeigt wird das Wachstum der mGS-Kulturen von GB-10, GB-15 (orange schattiert) und GB-11 (violett schattiert), die alle mit einer EGF-Konzentration von 15 ng/ml kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die orange schattierten mGS-Kulturen wuchsen über den gesamten Zeitraum von 360 Tagen, die violett schattierte stellte schon vorher das Wachstum ein. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

3.3.2.5. Kultivierung mit 20 ng/ml EGF

Ganz ähnlich wie für die Kultivierung mit einer Konzentration von 15 ng/ml EGF unter dem vorhergehenden Abschnitt beschrieben, stellten sich die Wachstumsrelationen bei 20 ng/ml EGF dar. Wiederum war die mGS-Kultur aus GB-15 die am schnellsten proliferierende, gefolgt von GB-10, und die mGS-Kultur aus GB-11 entsprechend die mit dem langsamsten Wachstum. Ebenfalls analog den Ergebnissen für die EGF-Konzentration von 15 ng/ml war auch hier eine kontinuierliche Expansion der Zellkulturen nur bei den beiden schnell wachsenden mGS-Kulturen aus GB-10 und GB-15 bis zum Ende der Untersuchungen möglich und nicht bei der mGS-Kultur aus GB-11, die demgemäß ihre

weitere Proliferation schon vor Ablauf des Zeitfensters von 360 Tagen einstellte. Einen Überblick gibt Abbildung 3.3.2.5.

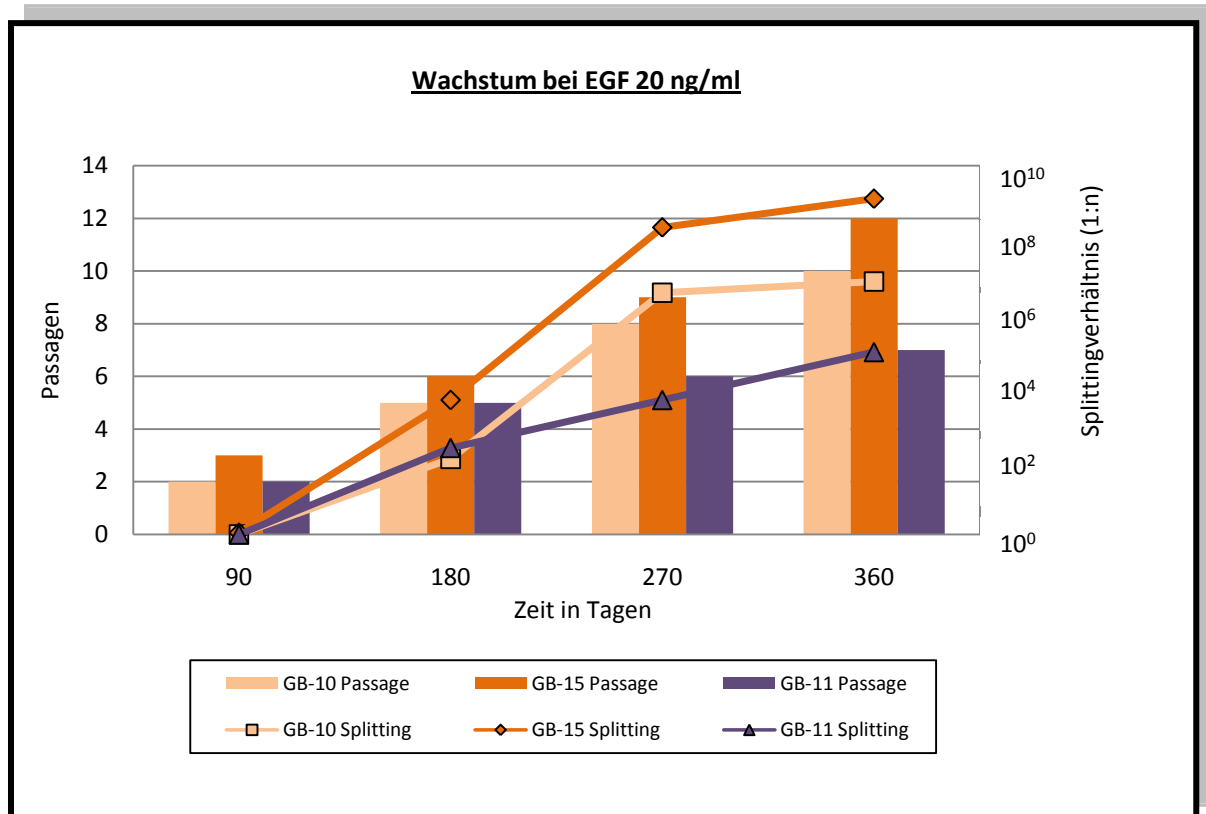


Abbildung 3.3.2.5: Gezeigt wird das Wachstum der mGS-Kulturen von GB-10, GB-15 (orange schattiert) und GB-11 (violett schattiert), die alle mit einer EGF-Konzentration von 20 ng/ml kultiviert wurden, nach 90, 180, 270 und 360 Tagen. Die orange schattierten mGS-Kulturen wuchsen über den gesamten Zeitraum von 360 Tagen, die violett schattierte stellte schon vorher das Wachstum ein. Die Balkendarstellung zeigt die jeweils erreichte Passagenzahl, die lineare Darstellung zeigt das zu dem jeweiligen Zeitpunkt erreichte gesamte Splittingverhältnis der jeweiligen Zellkultur.

Zusammenfassung

Betrachtet man die Ergebnisse aus 3.3.2 der externen Wachstumsrelationen zusammen mit den Ergebnissen aus 3.3.1 der internen Wachstumsrelationen, so zeigt sich, daß sich diese Relationen auch bei dem externen Vergleich der unterschiedlichen mGS bei gleichen EGF-Konzentrationen als jeweils charakteristisches gleichbleibendes Merkmal der jeweiligen mGS zeigten. Unabhängig von der EGF-Konzentration wuchsen die mGS-Kulturen entweder schnell, moderat oder langsam und zeigten sich auch konstant in dem gegenseitigen Vergleich einer jeweils relativ stärkeren oder schwächeren Proliferation. Derweil rückten die beiden moderat wachsenden mGS-Kulturen aus GB-02 und GB-11 im externen Vergleich bei Betrachtung der beiden Kriterien Passagenzahl und Splittingverhältnis näher an die Gruppe der langsam proliferierenden Zellkulturen, so daß im Hinblick auf das Wachstum auch eine Zweiteilung der mGS-Kulturen möglich scheint. Tabelle 3.3.2 soll dies verdeutlichen.

<u>mGS</u>	<u>mGS-Kulturen</u>	<u>Wachstum</u>
GB-03	0, 5 und 10 ng/ml EGF	schnell
GB-19		
GB-10		
GB-15	10, 15 und 20 ng/ml EGF	
GB-02	0, 5 und 10 ng/ml EGF	moderat bis langsam
GB-11	10, 15 und 20 ng/ml EGF	
GB-17	0, 5 und 10 ng/ml EGF	
GB-18		
GB-22		

Tabelle 3.3.2: Übersicht über die Wachstumsgeschwindigkeiten im Vergleich unter der Berücksichtigung der externen Wachstumsrelationen. Eine mögliche Zwei- anstatt einer Dreiteilung der mGS-Kulturen soll hier durch die gestrichelte Linie dargestellt werden, da bei externem Vergleich die moderat proliferierenden Zellkulturen näher an die langsam wachsende Gruppe heranrücken.

3.4. Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens

Die bisherige Selektion anhand des Wachstums erbrachte mGS-Kulturen mit unterschiedlichen EGF-Zusätzen aus insgesamt 9 verschiedenen Glioblastomen, die sich alle über mehr als 2 Passagen kultivieren ließen. Im nächsten Schritt sollte nun die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens analysiert werden, zum einen in dem ursprünglichen Tumorgewebe aller untersuchten Glioblastome, um einen Überblick über die Gesamtzahl der amplifizierten Tumore zu bekommen (3.4.1), zum anderen in den über einen längeren Zeitraum kultivierten mGS-Kulturen aus den 9 Tumoren, die als längerfristige Zellkultur etabliert werden konnten (3.4.2), um Unterschiede bei den verwendeten EGF-Konzentrationen in Bezug auf eine Veränderung der Amplifikation feststellen zu können. Desweiteren war das Ziel, eine mGS-Kultur zu finden, die aufgrund veränderter Kulturbedingungen hinsichtlich des EGF-Zusatzes ihre Amplifikation in vitro aufrecht erhält. Hierbei wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, einerseits die konventionelle PCR (3.4.1.1), andererseits die Real-Time PCR (3.4.1.2), was seinen Grund in der Tatsache findet, daß die in der quantitativen Analyse exaktere Real-Time PCR erst während der laufenden Untersuchungen etabliert worden ist, und somit zu Anfang nicht zur Verfügung stand.

3.4.1. Amplifikation im ursprünglichen Tumorgewebe

Ein Teil des Gewebes aus den Glioblastomen, welche die Grundlage für die Etablierung der Zellkulturen der einzelnen mGS-Kulturen bildeten, wurde unmittelbar vor der Verarbeitung wie in 2.2.1 beschrieben abgesondert, und als Kryopräparat bei -80°C gelagert. Hieraus wurde nun die genomische DNA präpariert, und den weiteren konventionellen und Real-Time PCR-Analysen auf EGF-Rezeptor-Genamplifikation zugeführt.

3.4.1.1. Analyse mittels differentieller PCR

Ein Teil der Analysen der Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens in dem Gewebe der zugrundeliegenden Glioblastome wurde mittels der konventionellen PCR vorgenommen. Hierbei wurde zunächst die genomische DNA aus dem Zellgewebe extrahiert (siehe 2.2.5.1) und anschließend der PCR-Analyse zugeführt. Zwecks eines Vergleichs der relativen Kopienzahl des EGFR-Gens wurde parallel IFN- γ als Referenz untersucht, da es in den Zellen als sogenanntes „single-copy“-Gen vorliegt, was durch das singuläre Vorkommen einen Vergleich zum teils amplifizierten und somit in mehreren Kopien vorkommenden EGFR-Gen ermöglicht. Für beide Gene wurde jeweils ein Primer-Paar wie unter 2.2.5.3 beschrieben verwendet und das Endprodukt der PCR gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden jeweils eine Positivkontrolle sowie ein DNA-Größenmarker mit aufgetragen, so daß die anschließende Intensität der Banden einen semi-quantitativen Nachweis einer EGFR-Amplifikation erlaubte. Die Abbildung 3.4.1 zeigt einige Beispiele: GB-06 wie auch GB-08 lassen keinen sichtbaren Unterschied in den Banden für das EGFR-Gen (obere Bande) und das IFN- γ -Gen (untere Bande) erkennen, und sind daher als nicht amplifiziert beurteilt worden. GB-09 hingegen zeigt eine deutliche Differenz zwischen beiden Banden, und dies sogar deutlicher als die Positivkontrolle, demgegenüber weisen GB-02 und GB-03 zwar auch einen Unterschied zwischen den Banden auf, welcher jedoch in Relation zur Positivkontrolle weniger stark ausgeprägt ist als bei GB-09. Daher sind alle drei letztgenannten als positiv und folglich amplifiziert beurteilt worden. GB-07 stellt einen Grenzfall dar, da die Differenz zwischen den Banden sehr gering ausfällt. Insofern wurde in solchen Fällen die Amplifikation als nur geringfügig ausgeprägt bewertet. Insgesamt sind von den durch diese Methode analysierten 22 Glioblastomen 10 (45%) als deutlich amplifiziert und 4 (18%) als nur gering amplifiziert beurteilt worden, eine Gesamtübersicht liefert Tabelle 3.4.1 in der mittleren Spalte.

3.4.1.2. Analyse mittels Real-Time PCR

Im Laufe der hier vorliegenden Arbeit wurde durch die Etablierung der Methode der Real-Time PCR eine genauere quantitative Analyse der EGFR-Genamplifikation möglich, so daß für alle 31 untersuchten Glioblastome eine erneute Auswertung vorgenommen werden konnte. Wie unter 2.2.5.4 detailliert erläutert, bildet bei der Real-Time PCR der sogenannte Ct-Wert als Anzahl der abgelaufenen PCR-Zyklen bis zum Überschreiten eines Schwellenwertes des gemessenen Signals (hier die Fluoreszenzintensität von SYBR-Green) die Grundlage für die festgestellte relative Kopienzahl eines Gens. Da hier das Ergebnis ein ganzzahliger Wert ist, kann eine im Vergleich zur konventionellen PCR sehr viel exaktere Aussage bezüglich der Stärke der Amplifikation getroffen werden. Entsprechend der konventionellen PCR (3.4.1.1) bildete IFN- γ auch hier das Referenzgen, wobei bei der späteren Auswertung die DNA von Leukozyten zusätzlich als Kalibrator herangezogen wurde. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.4.1. Diese erneute Analyse zeigte sich nicht in allen Fällen in Übereinstimmung mit den Resultaten aus der konventionellen PCR, so ist unter anderem GB-09, welcher in Abbildung 3.4.1 als deutlich positiv beurteilt werden kann, nach Bewertung durch die Real-Time PCR nicht amplifiziert. Aber auch die ebenfalls als positiv ausgewerteten Glioblastome GB-04, GB-12, GB-14 und GB-17 zeigen in den Analysen beider Methoden unterschiedliche Ergebnisse. Alle durch die konventionelle PCR als gering amplifiziert gewerteten Tumore wurden durch die Real-Time PCR ebenfalls als nicht amplifiziert beurteilt. Insgesamt sind so aus den 31 untersuchten Glioblastomen 7 (23%) als amplifiziert hervorgegangen, wobei der Grenzwert für eine positive Beurteilung bei einem relativen Vielfachen ≥ 5 und für eine negative bei einem relativen Vielfachen von ≤ 2 angenommen wurde, da keine Werte zwischen 2 und 5 fach gemessen werden konnten. Einen Überblick liefert erneut Tabelle 3.4.1 in der rechten Spalte.

Tumor	EGFR-Amplifikation	
GB-01	-	X
GB-02	+	35
GB-03	+	14
GB-04	+	X
GB-05	-	X
GB-06	-	X
GB-07	(+)	X
GB-08	-	X
GB-09	+	X
GB-10	+	75
GB-11	(+)	X
GB-12	+	X
GB-13	-	X
GB-14	+	X
GB-15	+	78
GB-16	-	X
GB-17	+	X
GB-18	(+)	X
GB-19	(+)	X
GB-20	-	X
GB-21	-	X
GB-22	+	5
GB-23	N.U.	6
GB-24	N.U.	X
GB-25	N.U.	X
GB-26	N.U.	X
GB-27	N.U.	X
GB-28	N.U.	30
GB-29	N.U.	X
GB-30	N.U.	X
GB-31	N.U.	X

Tabelle 3.4.1: Übersicht der Ergebnisse der Analyse der EGF-Rezeptor-Gen Amplifikation aller untersuchten Glioblastome mithilfe einer konventionellen PCR (mittlere Spalte) und der Real-Time PCR (rechte Spalte). Die Glioblastome, aus denen die 9 mGS-Kulturen hervorgingen, die über mehr als 2 Passagen kultiviert werden konnten, sind grau hinterlegt. Die Symbole in der mittleren Spalte bedeuten: +: Amplifikation vorhanden, (+): Amplifikation vorhanden, aber nur gering ausgeprägt, -: keine Amplifikation vorhanden, N.U.: nicht untersucht, weil Real-Time PCR bereits etabliert, die Werte der rechten Spalte geben das Vielfache der Amplifikation in Bezug auf das Referenzgen an, X bedeutet Vielfaches der Amplifikation <2 und damit nicht amplifiziert.

Abbildung 3.4.1: Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte der konventionellen PCR. Der Unterschied in der Ausprägung der beiden Banden für die DNA-Fragmente des EGFR-Gens (obere Bande) und des IFN- γ -Gens (untere Bande) sowie der Vergleich zur Differenz der Banden der Positivkontrolle erlaubt eine semi-quantitative Analyse der EGFR-Genamplifikation. Die Symbole bedeuten: M: DNA-Größenmarker, AD: Aqua dest., +: Positivkontrolle. Oben links: GB-06 zeigt keine Amplifikation, da beide Banden gleich stark gefärbt sind. Oben rechts: GB-02 und GB-03 zeigen beide eine ausgeprägte Amplifikation. Unten links: GB-09 zeigt eine Amplifikation, die später durch die Real-Time PCR nicht bestätigt wurde. Unten rechts: GB-07 zeigt hier nur eine schwach ausgeprägte Amplifikation, die allerdings durch die Real-Time PCR ebenfalls nicht bestätigt wurde, GB-08 war als nicht amplifiziert zu bewerten.

3.4.2. Veränderungen der Amplifikation innerhalb der mGS-Kulturen

Nach Analyse der Amplifikation in den ursprünglichen Glioblastomen sollten nun in einem zweiten Schritt Veränderungen dieses Wertes nach längerer Kultivierungszeit der einzelnen mGS-Kulturen untersucht werden. Da die Real-Time PCR zu diesem Zeitpunkt bereits etabliert war, konnten die dazu notwendigen Auswertungen auf diese Methode beschränkt werden, so daß die konventionelle PCR hier nicht zur Anwendung kam.

Aufgrund der bisherigen Selektion nach Wachstum und EGFR-Genamplifikation kamen für die weiteren Analysen zunächst nur die mGS-Kulturen aus den 5 Glioblastomen GB-02, GB-03, GB-10, GB-15 und GB-22 in Frage, da nur diese auf der einen Seite ein kontinuierliches Wachstum über einen längeren Zeitraum aufwiesen, und auf der anderen Seite eine durch die Real-Time PCR bestätigte Amplifikation zeigten. Zur Kontrolle insbesondere bezüglich des Einflusses der Zellkulturbedingungen wurden darüberhinaus jedoch auch einige der mGS-Kulturen aus den nicht amplifizierten Tumoren zusätzlich ausgewertet.

Wie unter 3.3 beschrieben, war die Proliferation der einzelnen mGS-Kulturen extrem unterschiedlich, so daß es aufgrund des fehlenden Zellmaterials weder zu gleichen Zeitpunkten noch zu gleichen Passagen möglich war, eine entsprechende Analyse durchzuführen. Aus diesem Grund wurde die Real-Time PCR jeweils zu möglichst nahe beieinander liegenden Zeitpunkten nach einem möglichst langen Kultivierungszeitraum ausgeführt, frühestens jedoch nach 100 Tagen und spätestens bei erkennbarer Verringerung der Proliferation. Bei allen nachfolgenden Darstellungen findet sich daher ein Hinweis auf den Zeitpunkt sowie auf die Passage, zu denen eine Untersuchung vorgenommen wurde.

Zusammenfassend werden unter den nachstehenden Punkten 3.4.2.1 bis 3.4.2.8 drei unterschiedliche Sachverhalte näher betrachtet:

- a) Eine Analyse der EGFR-Amplifikation nach Ablauf eines längeren Kultivierungszeitraums im Hinblick auf eine Verstärkung oder Abschwächung des gemessenen Wertes als quantitatives Merkmal der gesamten mGS-Kultur. Dafür werden bei den amplifizierten Tumoren GB-02, GB-03, GB-10, GB-15 und GB-22 jeweils die 3 mGS-Kulturen im Vergleich zum ursprünglichen Tumorgewebe betrachtet, die mit unterschiedlichen EGF-Konzentrationen kultiviert worden sind (3.4.2.1 bis 3.4.2.5). Dies sollte auch Aufschluss darüber geben, ob eine mGS-Kultur gefunden werden konnte, die trotz langer Kultivierungsdauer ihre EGFR-Genamplifikation aufrecht erhalten hatte.
- b) Eine Analyse der mGS-Kulturen aus den nicht amplifizierten Tumoren GB-11, GB-18 und GB-19 als Kontrolle etwaiger Einflüsse der besonderen Kulturbedingungen, auch hier im Hinblick auf die unterschiedlichen EGF-Konzentrationen (3.4.2.6).
- c) Bei den mGS-Kulturen aus GB-10 und GB-15, welche unabhängig von dem EGF-Zusatz in allen Fällen zwar einen reduzierten, aber dennoch als amplifiziert zu bezeichnenden Wert aufzeigten, eine Analyse hinsichtlich dem Zeitverlauf dieser Veränderung. Dazu wurde jeweils eine frühe und eine späte Passage verglichen, um eine Aussage treffen zu können, ob die Reduzierung des gemessenen Wertes ein entsprechend eher frühes oder spätes Ereignis darstellt (3.4.2.7 und 3.4.2.8).

3.4.2.1. GB-02

GB-02 zeigte im ursprünglichen Tumorgewebe eine ca. 35 fache Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens in Bezug auf die Referenz (IFN- γ) und den Kalibrator (Leukozyten-DNA). Bei den beiden mGS-Kulturen, die mit 5 und 10 ng/ml EGF kultiviert worden sind wurde die genomische DNA in der 7. Passage nach Ablauf von jeweils 286 Tagen präpariert, bei der mGS-Kultur ohne EGF-Zusatz konnte aufgrund des langsameren Wachstums erst nach 386 Tagen, jedoch ebenfalls in Passage 7 eine Analyse vorgenommen werden. Im Ergebnis ergab die Untersuchung der Amplifikation nach mehr als 9 Monaten bei den beiden mit EGF kultivierten mGS-Kulturen eine Reduzierung auf einen Wert <2 , was entsprechend der unter 3.4.1.2 getroffenen Definition als nicht mehr amplifiziert zu bewerten ist. Anders hingegen bei der mGS-Kultur, die ohne EGF-Zusatz gewachsen ist. Hier ist die Amplifikation noch vorhanden, jedoch deutlich reduziert, im Vergleich zum Ursprungstumor etwa um die Hälfte. Eine Übersicht zeigt Abbildung 3.4.2.1.

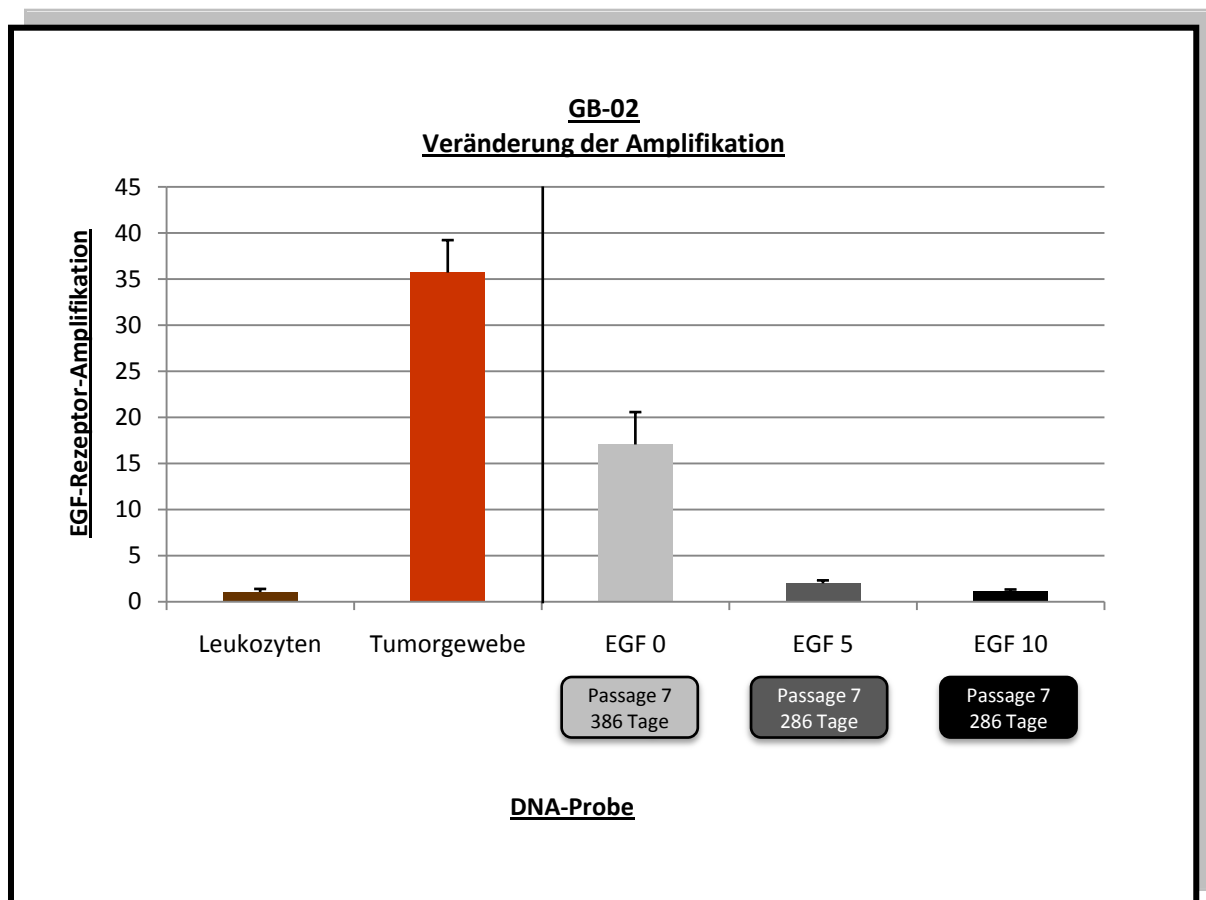


Abbildung 3.4.2.1: Veränderung der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation bei den mGS-Kulturen aus GB-02. Messung mittels Real-Time PCR. Dargestellt wird die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens als Vielfaches in Bezug auf das „single-copy“-Referenzgen IFN- γ als Merkmal der gesamten genomischen DNA der Zellen. Bräunlich gefärbte Balken linke Seite: DNA des ursprünglichen Tumorgewebes und Leukozyten-DNA als Kalibrator, Schwarz-grau gefärbte Balken rechte Seite: DNA der Zellkultur, bei vorausgegangener Kultivierung der entsprechenden mGS-Kultur mit 0, 5 oder 10 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF. Die schwarz-grau gefärbten Rechtecke bezeichnen die jeweilige Passage und den Kultivierungszeitraum, nach dem die genomische DNA zur Analyse der Amplifikation präpariert wurde.

3.4.2.2. GB-03

Die mGS-Kulturen aus GB-03 konnten alle länger als 11 Monate kultiviert werden, bevor die Analyse bezüglich einer Veränderung der EGFR-Genamplifikation vorgenommen wurde. Um jedoch wie unter 3.4.2 angestrebt möglichst nah beieinanderliegende Zeitpunkte der Untersuchung zu erreichen, mußten auch hier unterschiedliche Passagen verwendet werden, die genauen Daten zeigt Abbildung 3.4.2.2. Es wird deutlich, daß der Einfluß der Kultivierung mit unterschiedlichen EGF-Konzentrationen verschiedene Wirkungen bei den einzelnen mGS-Kulturen gezeigt hat. Während bei der Kultur mit einer EGF-Konzentration von 5 ng/ml die Amplifikation auf einen Wert <2 reduziert wurde, ist sie bei den beiden anderen im Vergleich zum Ursprungstumor nun deutlich erhöht. Mit einem Zusatz von 10 ng/ml EGF hat sie sich verdoppelt, von 14 auf 28 fach, und ohne den Wachstumsfaktor EGF sogar vervierfacht, von 14 auf mehr als das 67 fache. Somit konnte durch die Etablierung der Langzeitzellkulturen aus GB-03 sowohl bei der mGS-Kultur mit 10 ng/ml als auch ohne EGF das Ziel dieser Arbeit erreicht werden, unter serumfreien modifizierten Stammzellbedingungen auch in vitro die EGFR-Genamplifikation aufrecht zu erhalten. Dabei bleibt zunächst offen, ob hier wie auch bei den anderen untersuchten mGS-Kulturen der verschiedenen Glioblastome der gemessene Wert der Amplifikation eine Veränderung bezüglich der in den einzelnen Zellen vorhandenen Kopien des EGFR-Gens darstellt, oder aber durch eine positive oder negative Selektion der amplifizierten Zellen bei gleichbleibender Kopienzahl pro Zelle erreicht wird. Dies wird bei der weiteren Charakterisierung dieser mGS-Kulturen noch eingehender untersucht werden.

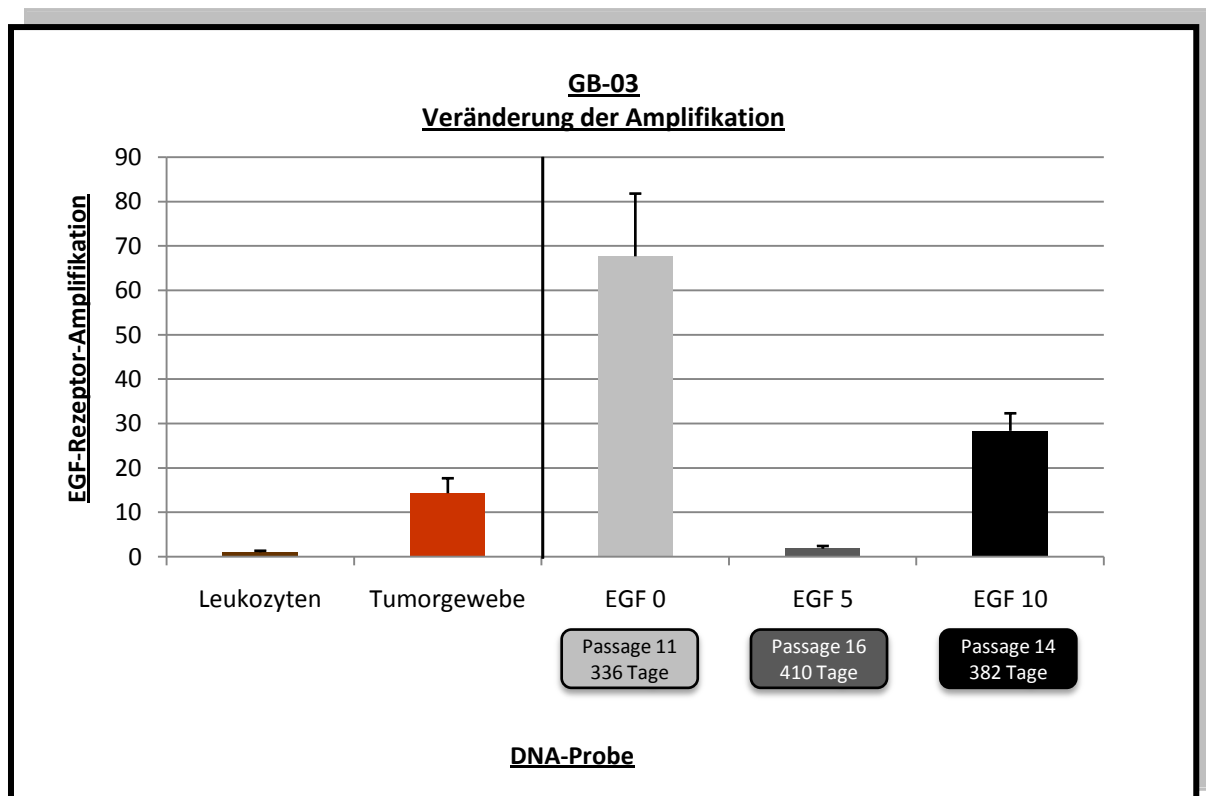


Abbildung 3.4.2.2: Veränderung der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation bei den mGS-Kulturen aus GB-03. Messung mittels Real-Time PCR. Dargestellt wird die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens als Vielfaches in Bezug auf das „single-copy“-Referenzgen IFN- γ als Merkmal der gesamten genomischen DNA der Zellen. Bräunlich gefärbte Balken linke Seite: DNA des ursprünglichen Tumorgewebes und Leukozyten-DNA als Kalibrator, Schwarz-grau gefärbte Balken rechte Seite: DNA der Zellkultur, bei vorausgegangener Kultivierung der entsprechenden mGS-Kultur mit 0, 5 oder 10 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF. Die schwarz-grau gefärbten Rechtecke bezeichnen die jeweilige Passage und den Kultivierungszeitraum, nach dem die genomische DNA zur Analyse der Amplifikation präpariert wurde.

3.4.2.3. GB-10

Das Glioblastom, welches die Grundlage für die mGS-Kulturen von GB-10 bildete, hatte mit einem Wert von 75-fach die zweitstärkste Amplifikation des EGFR-Gens im Tumorgewebe gezeigt. Bei allen drei mGS-Kulturen, welche jeweils die EGF-Zusätze von 10, 15 und 20 ng/ml erhalten hatten, konnte nach einem Ablauf von mehr als 7 Monaten genomische DNA aus den Zellkulturen zur weiteren Amplifikations-Analyse gewonnen werden. Das Resultat war für die einzelnen Kulturen relativ ähnlich, insofern, als daß alle drei einen deutlichen Rückgang des gemessenen Wertes aufzeigten, wobei im Mittel immer noch 1/3 der ursprünglichen Ausprägung erreicht wurde, mindestens jedoch 15-fach. Dabei gab es keinen erkennbaren Unterschied zwischen den Zellkulturen mit unterschiedlichen EGF-Konzentrationen. Gemäß der Definition (3.4.1.2) galten damit zwar alle mGS-Kulturen weiterhin als amplifiziert, durch die Verringerung des Wertes war hier allerdings das Ziel, die Amplifikation des Ursprungstumors aufrecht zu erhalten, nicht erreicht worden. Die unten stehende Abbildung 3.4.2.3 soll einen besseren Überblick schaffen.

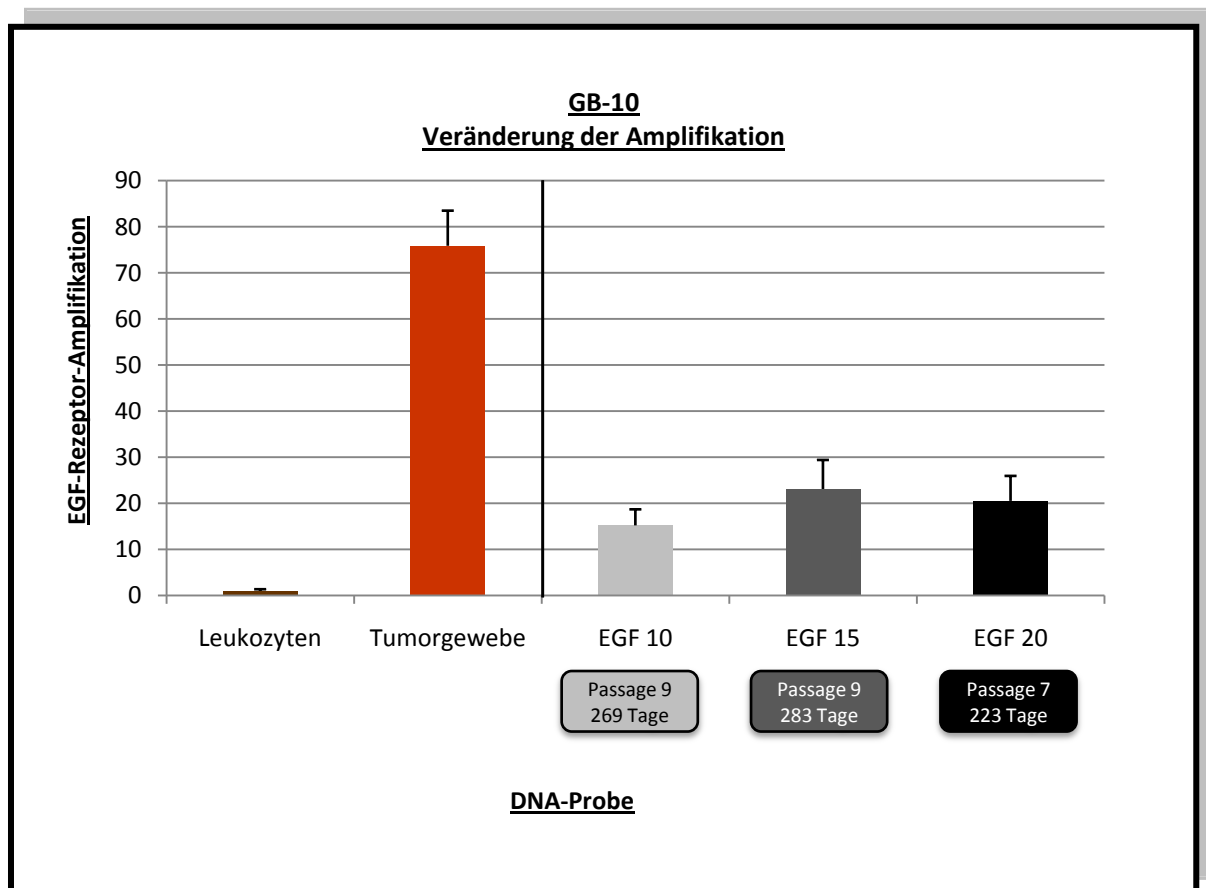


Abbildung 3.4.2.3: Veränderung der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation bei den mGS-Kulturen aus GB-10. Messung mittels Real-Time PCR. Dargestellt wird die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens als Vielfaches in Bezug auf das „single-copy“-Referenzgen IFN- γ als Merkmal der gesamten genomischen DNA der Zellen. Bräunlich gefärbte Balken linke Seite: DNA des ursprünglichen Tumorgewebes und Leukozyten-DNA als Kalibrator, Schwarz-grau gefärbte Balken rechte Seite: DNA der Zellkultur, bei vorausgegangener Kultivierung der entsprechenden mGS-Kultur mit 10, 15 oder 20 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF. Die schwarz-grau gefärbten Rechtecke bezeichnen die jeweilige Passage und den Kultivierungszeitraum, nach dem die genomische DNA zur Analyse der Amplifikation präpariert wurde.

3.4.2.4. GB-15

Vergleichbar zu dem unter dem vorherigen Punkt geschilderten Sachverhalt der mGS-Kulturen aus GB-10 zeigten sich die Zellkulturen von GB-15. Das Gewebe des hier zugrunde liegenden Glioblastoms zeigte von allen 31 untersuchten Tumoren die stärkste Amplifikation mit einem Wert von 78 fach. Aufgrund des bei diesen mGS-Kulturen recht gleichmäßigen Wachstums konnte zu fast gleichen Passagen und Zeitpunkten eine Analyse auf die Veränderung der EGFR-Genamplifikation durchgeführt werden, was die Abbildung 3.4.2.4 verdeutlicht. Nach mehr als 8 Monaten war wie schon bei den Kulturen von GB-10 die Amplifikation ebenfalls reduziert, allerdings durch die Verringerung auf durchschnittlich 1/5 und mindestens 13 fach etwas stärker ausgeprägt. Trotzdem konnten auch diese langzeitkultivierten mGS-Kulturen weiterhin als amplifiziert beurteilt werden, und gleichermaßen den Verhältnissen von GB-10 folgend gab es entsprechend keinen erkennbaren Unterschied bezüglich der verwendeten EGF-Konzentrationen.

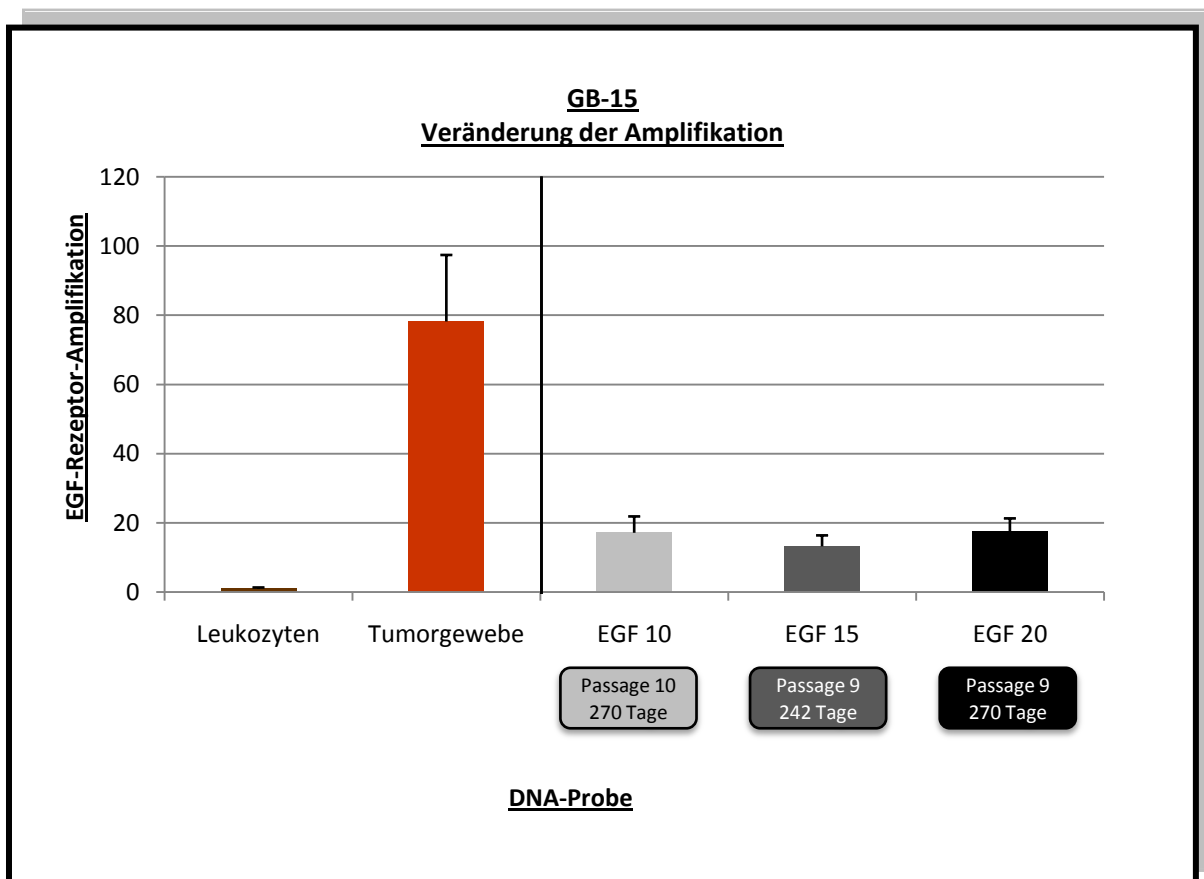


Abbildung 3.4.2.4: Veränderung der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation bei den mGS-Kulturen aus GB-15. Messung mittels Real-Time PCR. Dargestellt wird die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens als Vielfaches in Bezug auf das „single-copy“-Referenzgen IFN- γ als Merkmal der gesamten genomischen DNA der Zellen. Bräunlich gefärbte Balken linke Seite: DNA des ursprünglichen Tumorgewebes und Leukozyten-DNA als Kalibrator, Schwarz-grau gefärbte Balken rechte Seite: DNA der Zellkultur, bei vorausgegangener Kultivierung der entsprechenden mGS-Kultur mit 10, 15 oder 20 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF. Die schwarz-grau gefärbten Rechtecke bezeichnen die jeweilige Passage und den Kultivierungszeitraum, nach dem die genomische DNA zur Analyse der Amplifikation präpariert wurde.

3.4.2.5. GB-22

Mit einer etwa 5 fachen Amplifikation kann GB-22 als Grenzfall betrachtet werden. Entsprechend der Definition unter 3.4.1.2 wurde dieser zwar als amplifiziert beurteilt, jedoch zeigt er von allen untersuchten Glioblastomen die geringste Ausprägung der EGFR-Genamplifikation mit einem Wert von 5 fach. Angesichts des sehr langsamen und sich zunehmend verringernden Wachstums konnte hier nur bis zum Ablauf von 4 Monaten zugewartet werden, bevor eine Analyse vorgenommen wurde, jedoch war dies wenigstens zu identischen Zeitpunkten und Passagen möglich. Bei allen drei mit 0, 5 oder 10 ng/ml EGF kultivierten mGS-Kulturen war der gemessene Wert auf <2 zurück gegangen, so daß keine der Zellkulturen mehr als amplifiziert beurteilt werden konnte. Wie schon bei GB-10 und GB-15 geschildert, gab es auch hier keine erkennbare Differenz bezüglich der eingesetzten EGF-Konzentration. Die Abbildung 3.4.2.5 zeigt diese Erläuterungen nochmals in grafischer Darstellung.

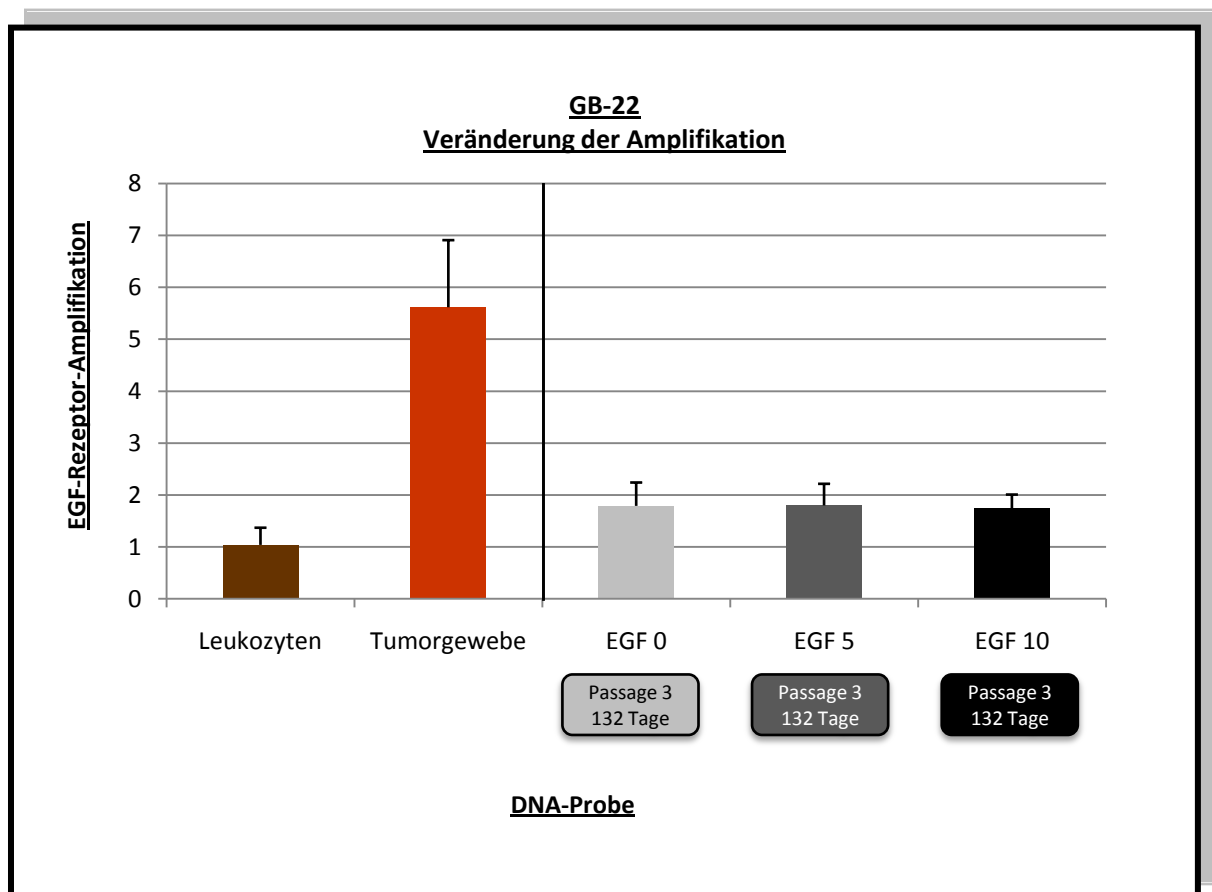


Abbildung 3.4.2.5: Veränderung der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation bei den mGS-Kulturen aus GB-22. Messung mittels Real-Time PCR. Dargestellt wird die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens als Vielfaches in Bezug auf das „single-copy“-Referenzgen IFN- γ als Merkmal der gesamten genomischen DNA der Zellen. Bräunlich gefärbte Balken linke Seite: DNA des ursprünglichen Tumorgewebes und Leukozyten-DNA als Kalibrator, Schwarz-grau gefärbte Balken rechte Seite: DNA der Zellkultur, bei vorausgegangener Kultivierung der entsprechenden mGS-Kultur mit 0, 5 oder 10 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF. Die schwarz-grau gefärbten Rechtecke bezeichnen die jeweilige Passage und den Kultivierungszeitraum, nach dem die genomische DNA zur Analyse der Amplifikation präpariert wurde.

3.4.2.6. GB-11, GB-18 und GB-19 als Kontrolle

Um eventuelle Einflüsse der Zellkulturbedingungen festzustellen, wurden die Kulturen aus 3 verschiedenen nicht amplifizierten mGS (GB-11, GB-18 und GB-19) als Kontrolle analysiert (siehe auch 3.4.2 Abschnitt b). Um jeweils einen Vertreter aus den Gruppen mit unterschiedlicher Proliferationsgeschwindigkeit untersuchen zu können wurde GB-18 als langsam, GB-11 als moderat und GB-19 als schnell wachsendes Mitglied ausgewählt. Keines der den vorstehenden mGS-Kulturen zugrunde liegenden Glioblastome wurde unter 3.4.1.2 als amplifiziert beurteilt, somit war jedes als Kontrolle geeignet. Die Analyse konnte bei allen Zellkulturen nach mindestens 5 Monaten durchgeführt werden, zu welchen Zeitpunkten und Passagen geben die Abbildungen 3.4.2.6.A und 3.4.2.6.B ausführlich wieder. Im Ergebnis zeigt sich deutlich, daß weder bei den EGF-Konzentrationen 0, 5 und 10 ng/ml (GB-18 und GB-19) noch bei 10, 15 und 20 ng/ml EGF eine erkennbare Veränderung des für die EGFR-Genamplifikation gemessenen Wertes aufgetreten ist, sie bleibt sowohl im Vergleich der mGS-Kulturen untereinander als auch im Verhältnis zum ursprünglichen Tumorgewebe ≤ 2 fach.

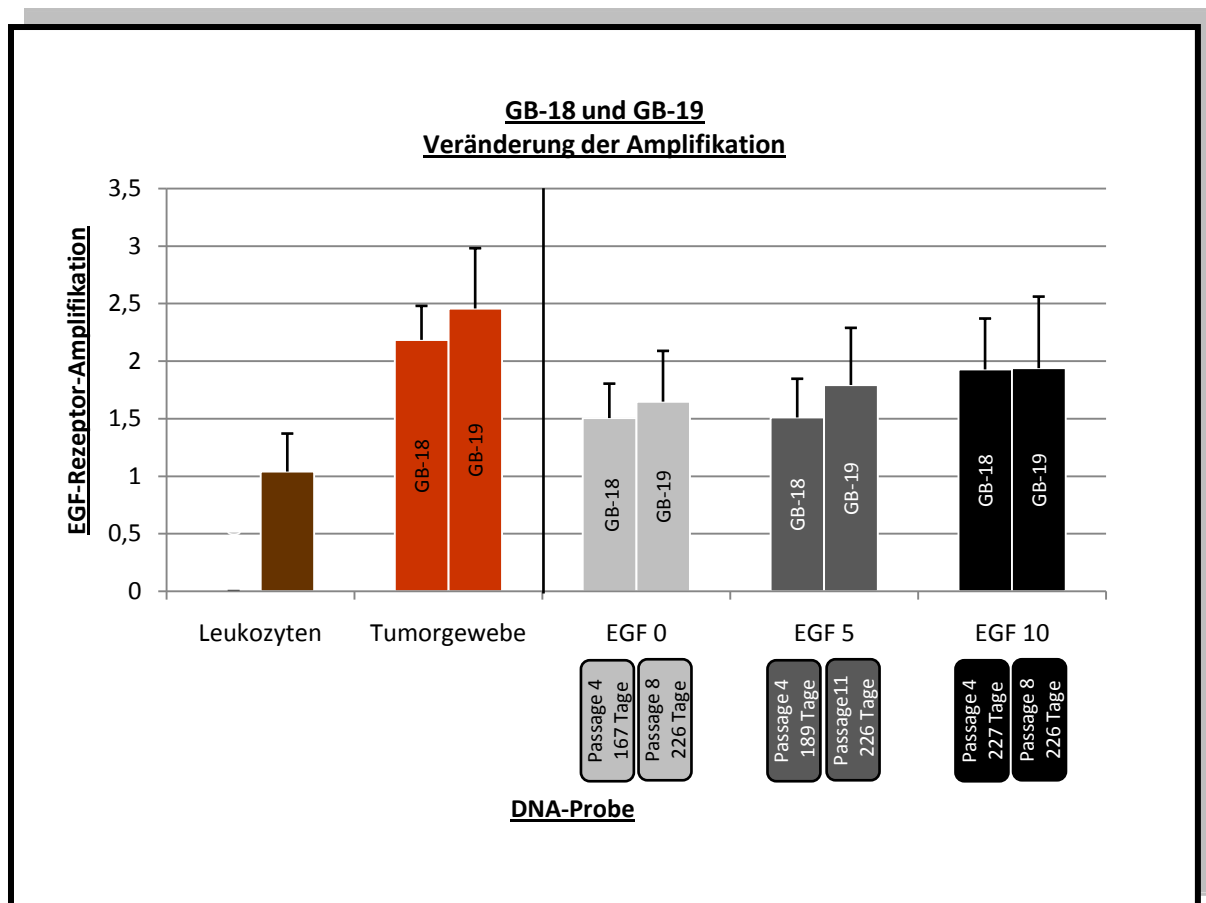


Abbildung 3.4.2.6.A: Veränderung der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation bei den mGS-Kulturen aus GB-18 und GB-19. Messung mittels Real-Time PCR. Dargestellt wird die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens als Vielfaches in Bezug auf das „single-copy“-Referenzgen IFN- γ als Merkmal der gesamten genomischen DNA der Zellen. Bräunlich gefärbte Balken linke Seite: DNA des ursprünglichen Tumorgewebes und Leukozyten-DNA als Kalibrator, Schwarz-grau gefärbte Balken rechte Seite: DNA der Zellkultur, bei vorausgegangener Kultivierung der entsprechenden mGS-Kultur mit 0, 5 oder 10 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF. Die schwarz-grau gefärbten Rechtecke bezeichnen die jeweilige Passage und den Kultivierungszeitraum, nach dem die genomische DNA zur Analyse der Amplifikation präpariert wurde.

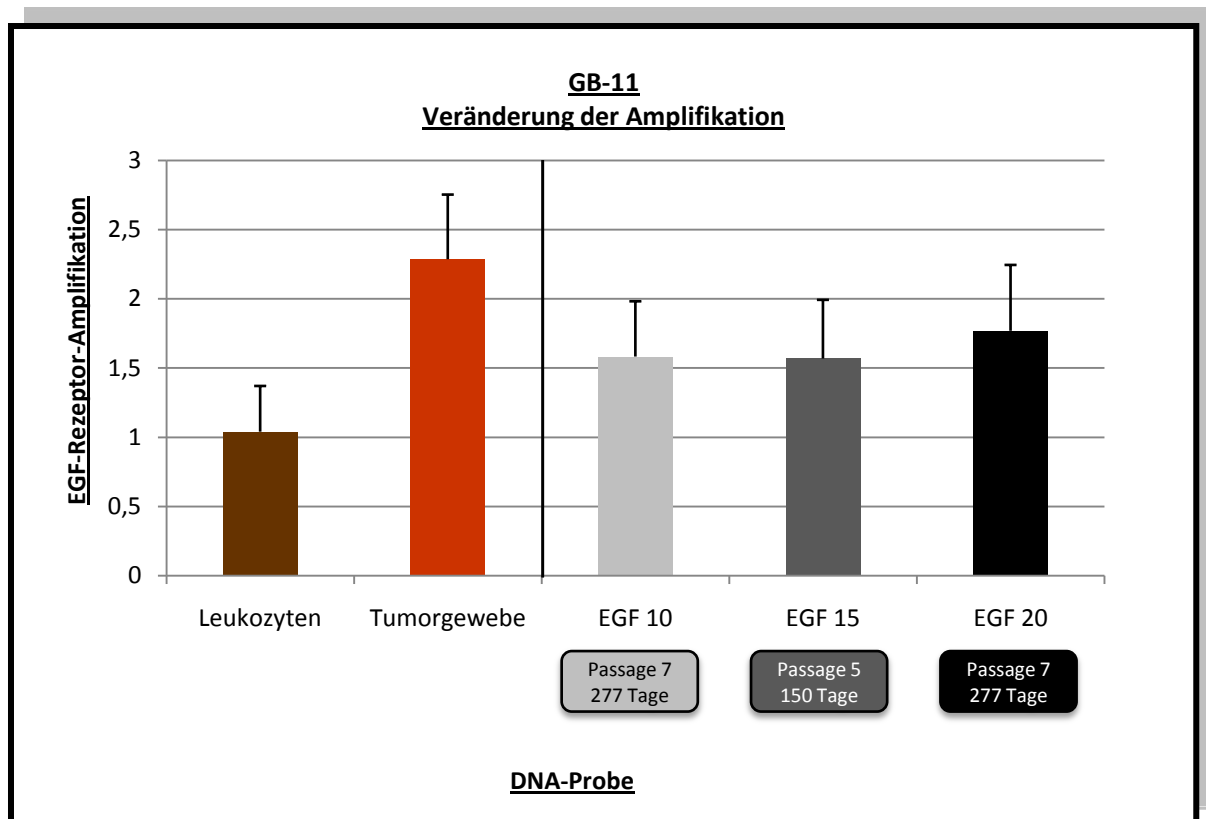
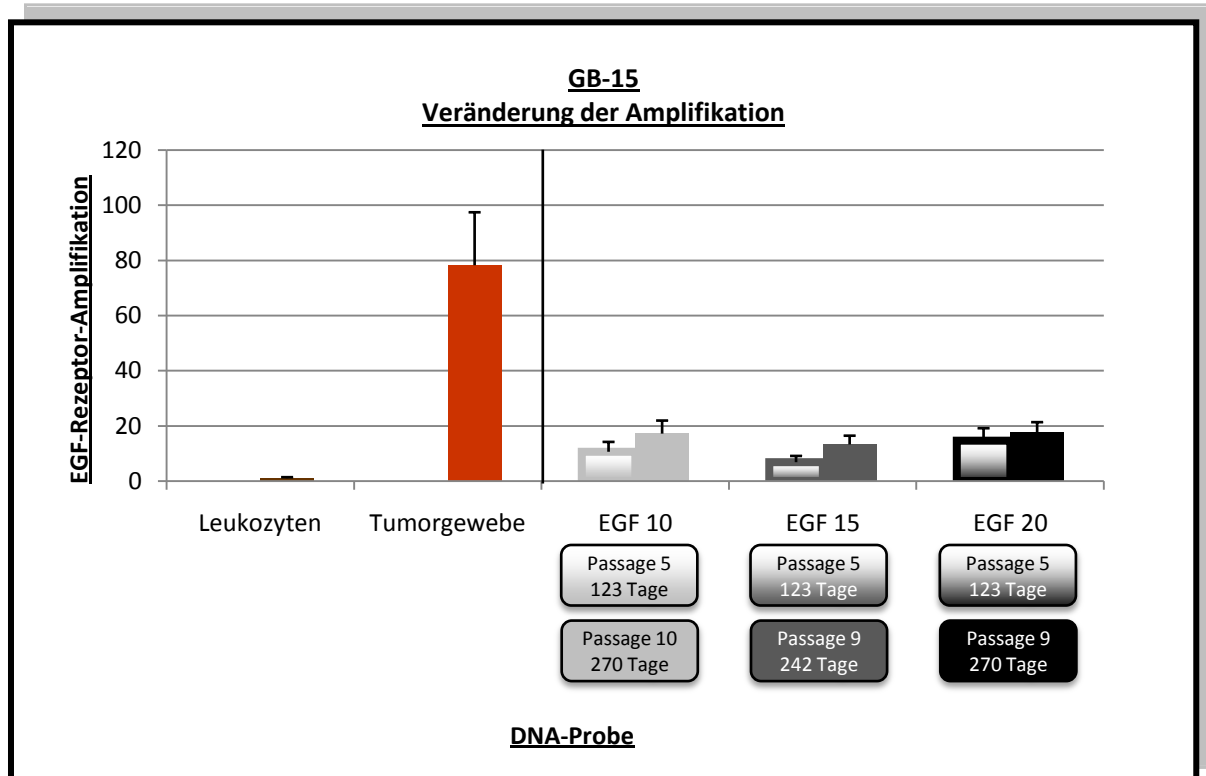
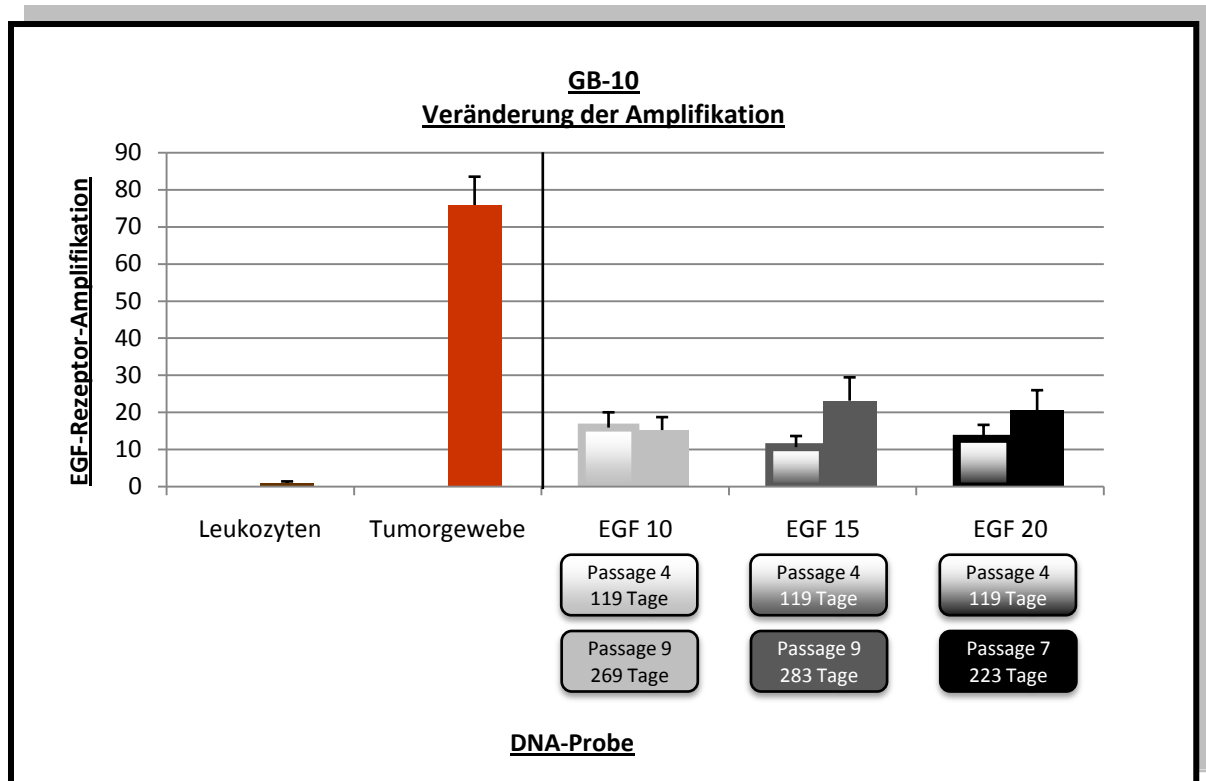


Abbildung 3.4.2.6.B: Veränderung der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation bei den mGS-Kulturen aus GB-11. Messung mittels Real-Time PCR. Dargestellt wird die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens als Vielfaches in Bezug auf das „single-copy“-Referenzgen IFN- γ als Merkmal der gesamten genomischen DNA der Zellen. Bräunlich gefärbte Balken linke Seite: DNA des ursprünglichen Tumorgewebes und Leukozyten-DNA als Kalibrator, Schwarz-grau gefärbte Balken rechte Seite: DNA der Zellkultur, bei vorausgegangener Kultivierung der entsprechenden mGS-Kultur mit 10, 15 oder 20 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF. Die schwarz-grau gefärbten Rechtecke bezeichnen die jeweilige Passage und den Kultivierungszeitraum, nach dem die genomische DNA zur Analyse der Amplifikation präpariert wurde.

3.4.2.7. GB-10 und GB-15 – Frühe und späte Passage

Nach Analyse der Veränderung der EGFR-Genamplifikation waren als einzige jeweils alle drei mGS-Kulturen aus GB-10 und GB-15 nach wie vor amplifiziert, wie auch die Kultur aus GB-02, die ohne EGF-Zusatz kultiviert worden war. Wie unter 3.4.2 Abschnitt c) erwähnt sollte bei diesen nun untersucht werden, ob die Reduktion des gemessenen Wertes eher ein frühes oder spätes Ereignis ist, indem jeweils noch eine frühere mit der bereits analysierten späten Passage verglichen wurde. Aufgrund des sehr spät einsetzenden Wachstums der mGS-Kultur aus GB-02 ohne EGF konnte für diese keine frühe Passage verwendet werden, so daß hier kein Vergleich möglich war. Das Resultat für alle mGS-Kulturen aus GB-10 und GB-15 hingegen war einheitlich, insoweit als daß alle zwischen der frühen und späten Passage keinen erkennbaren Unterschied aufwiesen, was die Reduktion der EGFR-Genamplifikation als eher frühes Ereignis bei der Kultivierung vermuten lässt. Die Abbildungen 3.4.2.7.A und 3.4.2.7.B geben einen Überblick.



Abbildungen 3.4.2.7.A(oben) und B(unten): Vergleich der EGF-Rezeptor-Gen-Amplifikation bei den mGS-Kulturen aus GB-10 und GB-15 einer frühen und einer späten Passage. Messung mittels Real-Time PCR. Dargestellt wird die Amplifikation des EGF-Rezeptor-Gens als Vielfaches in Bezug auf das „single-copy“-Referenzgen IFN- γ als Merkmal der gesamten genomischen DNA der Zellen. Bräunlich gefärbte Balken linke Seite: DNA des ursprünglichen Tumorgewebes und Leukozyten-DNA als Kalibrator, Schwarz-grau gefärbte Balken rechte Seite: DNA der Zellkultur, bei vorausgegangener Kultivierung der entsprechenden mGS-Kultur mit 10, 15 oder 20 ng/ml des Wachstumsfaktors EGF. Die schwarz-grau gefärbten Rechtecke bezeichnen die jeweilige Passage und den Kultivierungszeitraum, nach dem die genomische DNA zur Analyse der Amplifikation präpariert wurde. Ein halb gefülltes Rechteck bezeichnet die frühe, ein ganz gefülltes die späte Passage.

Zusammenfassung

Es hat sich gezeigt, daß unabhängig von der Zugabe an EGF, sowohl bei komplettem Verzicht während der Kultivierung als auch bei unterschiedlichen Konzentrationen die EGFR-Genamplifikation entweder stark reduziert wird, oder aber auf einen Wert ≤ 2 sinkt, so daß die Zellkultur als nicht länger amplifiziert zu bewerten ist. Dies ist nicht immer ein einheitliches Merkmal für die jeweiligen Kulturen aus einem mGS, sondern durchaus unterschiedlich, wie im Falle von GB-02. Letztlich konnten nur 2 mGS-Kulturen, beide aus GB-03 als langfristige stabil zu expandierende Zellkulturen etabliert werden, die gleichzeitig den Wert der analysierten Amplifikation vergrößert hatten. Zum einen war dies die Kultur, die ganz ohne EGF-Zusatz, zum anderen die, die mit einer Konzentration von 10 ng/ml EGF kultiviert worden war. Beide mGS-Kulturen konnten auch nach Abschluß dieser Arbeit noch mehrere Monate weiter unter diesen Bedingungen aufrecht erhalten werden. Tabelle 3.4.2 schafft einen Überblick.

mGS	EGF-Konzentration	EGFR-Amplifikation in vitro nach mehreren Monaten			
		verstärkt	Reduziert / aber amplifiziert	Reduziert / und nicht mehr amplifiziert	Unverändert / nicht amplifiziert
GB-03	0	X	X		
	5				
	10				
GB-02	0	X			
	5				
	10				
GB-22	0, 5 und 10	X			
GB-10	10, 15 und 20	X			
GB-15	10, 15 und 20	X			
GB-18	0, 5 und 10	X			
GB-19	0, 5 und 10	X			
GB-11	10, 15 und 20	X			

Tabelle 3.4.2: Übersicht über die Ergebnisse der Analyse bezüglich einer Veränderung der EGFR-Genamplifikation nach längerer Kultivierungsdauer bei allen untersuchten mGS-Kulturen. Die roten Kreuze zeigen die beiden Kulturen aus GB-03, bei denen das Ziel dieser Arbeit – die Aufrechterhaltung der Amplifikation in vitro – erreicht wurde. GB-18, GB-19 und GB-11 dienten als Kontrolle

3.5. Charakterisierung von GB-03

Im letzten Teil dieser Arbeit sollten nun die beiden mGS-Kulturen aus GB-03, die als stabile Langzeitkulturen über mehr als 17 Monate mit aufrecht erhaltener EGFR-Genamplifikation etabliert werden konnten, auf weitere für die Charakterisierung von Tumorstammzellen wichtige Merkmale untersucht werden. Dabei wurde auch die mGS-Kultur mit einbezogen, welche bei einer EGF-Konzentration von 5 ng/ml gemäß der vorausgegangenen Analyse als nicht mehr amplifiziert zu beurteilen war, um etwaige Unterschiede zu den anderen beiden Kulturen ohne und mit 10 ng/ml

EGF feststellen zu können. Sämtliche Ergebnisse der folgenden 4 Punkte 3.5.1 bis 3.5.4 geben die Eigenschaften der mGS-Kulturen nach einem Kultivierungszeitraum von mehr als 12 Monaten wieder. Zur Vereinfachung werden die 3 mGS-Kulturen aus GB-03 im weiteren Verlauf als GB-03/EGF(0), GB-03/EGF(5) und GB-03/EGF(10) bezeichnet. Insofern finden sich in den folgenden Abschnitten Untersuchungen zur Lokalisation und Ausprägung der EGFR-Genamplifikation in den einzelnen Zellen (FISH-Analyse), zur genauen Wachstumsgeschwindigkeit, zum Differenzierungspotential und zur Tumorigenität in vivo anhand eines Mausmodells.

3.5.1. FISH-Analyse

Nachdem die Real-Time PCR Analysen nur einen Querschnitt über die relative Zahl der EGFR-Genkopien in allen Zellen einer Zellkultur geben konnten, war dieser Wert der Amplifikation nur eingeschränkt aussagefähig bezüglich der Genkopien einzelner Zellen sowie deren Anzahl im Verhältnis zu den nicht amplifizierten Zellen. Näheren Aufschluß darüber konnte die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bringen, bei der wie unter 2.2.5.5 erläutert, die spezifische Fluoreszenz-Markierung des zu untersuchenden Genabschnittes Aufschluß darüber gibt, wie die Lokalisation und Stärke der Amplifikation bei einzelnen Zellen ausgeprägt ist. Durch mikroskopische Auswertung lassen sich dabei auch die Amplikons extrachromosomaler Strukturen, sogenannter „double minutes“ von Duplikationen innerhalb der Chromosomen unterscheiden, da im letzteren Fall stärker homogen gefärbte chromosomale Banden auftreten. Diese Untersuchungen fanden in enger Kooperation mit dem Institut für Tumorbilogie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf statt. Das Resultat brachte deutlich zum Vorschein, daß die in den Real-Time PCR Analysen (3.4.2.2.) gemessene Reduzierung beziehungsweise Verstärkung des Wertes für die EGFR-Genamplifikation bei allen drei mGS-Kulturen GB-03/EGF(0), GB-03/EGF(5) und GB-03/EGF(10) trotz geringer Unterschiede in den Signalen pro Zellkern weniger auf einer Veränderung der Genkopienzahl innerhalb einzelner Zellen zurückzuführen ist, als vielmehr auf der Anzahl der in einer Kultur vorkommenden amplifizierten Zellen im Verhältnis zu den nicht-amplifizierten beruht. Daher scheinen die Kulturbedingungen eine entsprechende Selektion jeweils zu begünstigen oder zu verhindern. Die Beurteilung der Signallokalisation bestätigte das Vorhandensein der EGFR-Amplikons vorwiegend in den extrachromosomalen double minutes, wobei die Zahl der Signale als Maß für die Stärke der Amplifikation in den einzelnen Zellen durchaus vergleichbar schien. Die Bilder der Abbildung 3.5.1 sollen dies verdeutlichen. Anhand des Vergleichs der beiden mGS-Kulturen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10) wird ersichtlich, daß ohne Zusatz des Wachstumsfaktors EGF immer viele Kerne mit entsprechend vielen Signalen erkennbar sind, wohingegen bei Kultivierung mit 10 ng/ml lediglich einige wenige Kerne mit viel Signal auftreten zwischen einer sehr viel größeren Zahl an nicht amplifizierten Zellen ohne oder mit nur vereinzelt Signalen, wobei die Bildausschnitte jeweils einen repräsentativen Ausschnitt aus dem gesamten untersuchten Präparat zeigen. GB-03/EGF(5) wird in dieser Abbildung nicht gezeigt, hatte aber diesen Ergebnissen folgend nur noch selten auffindbare Zellkerne mit viel Signal als Hinweis auf amplifizierte Zellen.

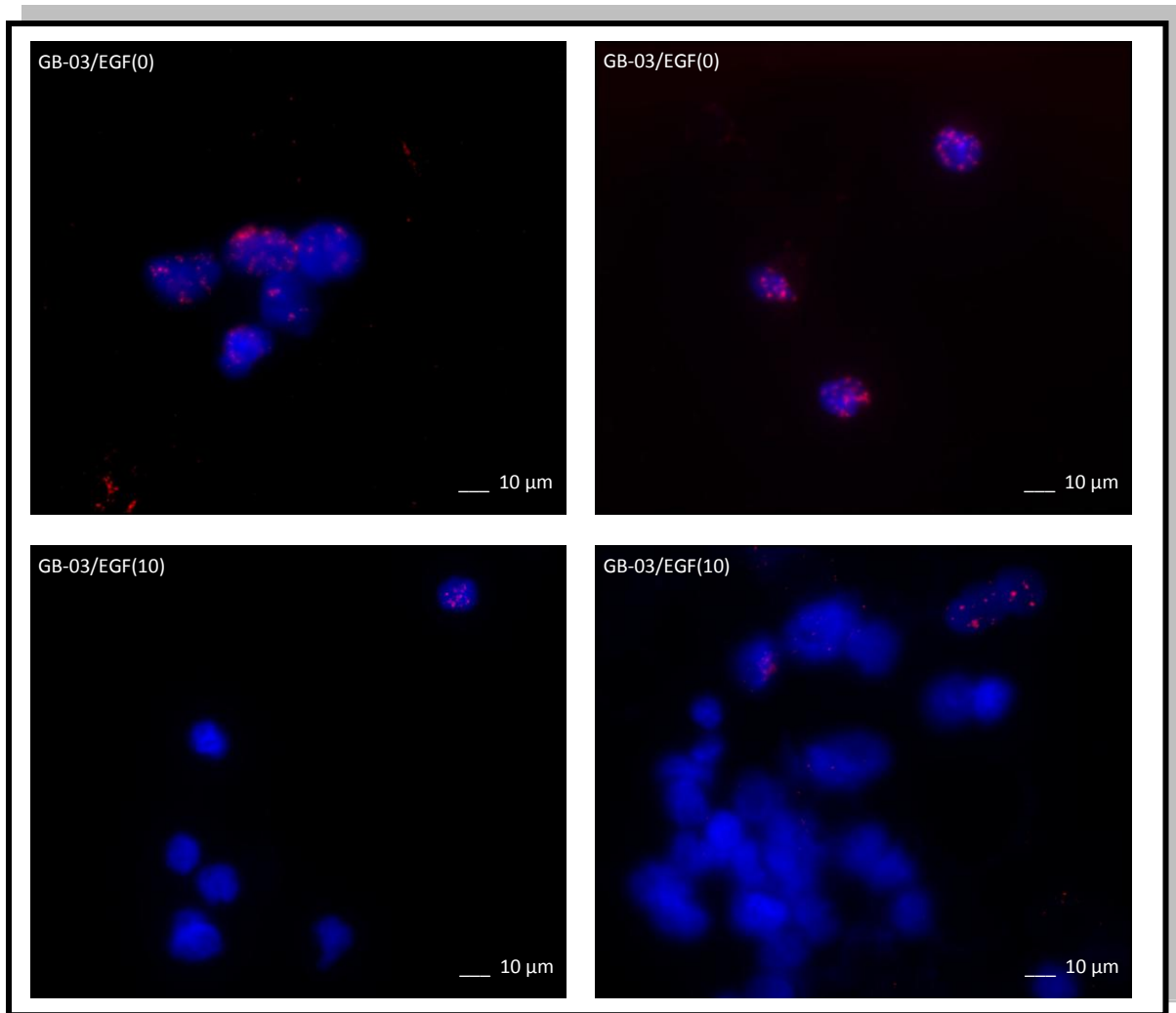


Abbildung 3.5.1: Auszugsweise Darstellung der Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH): Oben links und oben rechts: GB-03/EGF(0), unten links und unten rechts: GB-03/EGF(10). Das Fluoreszenz-Signal wird als punktuelle rote Färbung vorwiegend in extrachromosomalen Bereichen sichtbar. In den beiden oberen Bildern erkennt man viele Signale in den einzelnen Zellen als Korrelat der markierten Kopien des amplifizierten EGFR-Gens, sowie mehrere dieser Zellen im Verbund. In den beiden unteren Bildern erkennt man nur noch einzelne Zellen mit viel Signal neben einer Vielzahl von nicht amplifizierten Zellen. Die Anzahl der Signale pro Zelle ist dabei in allen Bildern vergleichbar stark ausgeprägt.

3.5.2. Proliferationskinetik

Sämtliche mGS-Kulturen aus GB-03 hatten nach dem Zeitraum von 12 Monaten eine kontinuierliche Proliferation ausgebildet, so daß zur vergleichenden Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit eine klassische Proliferationskinetik von GB-03/EGF(0), GB-03/EGF(5) und GB-03/EGF(10) angefertigt werden konnte. Das Resultat der über 8 Tage durchgeführten Messungen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10), lediglich GB-03/EGF(5) zeigte eine signifikante leicht verringerte Proliferationsrate, korrespondierend zu den anderen Ergebnissen, die sie von den beiden nach wie vor amplifizierten mGS-Kulturen differenzieren. Die Abbildung 3.5.2. stellt dies nochmals grafisch dar.

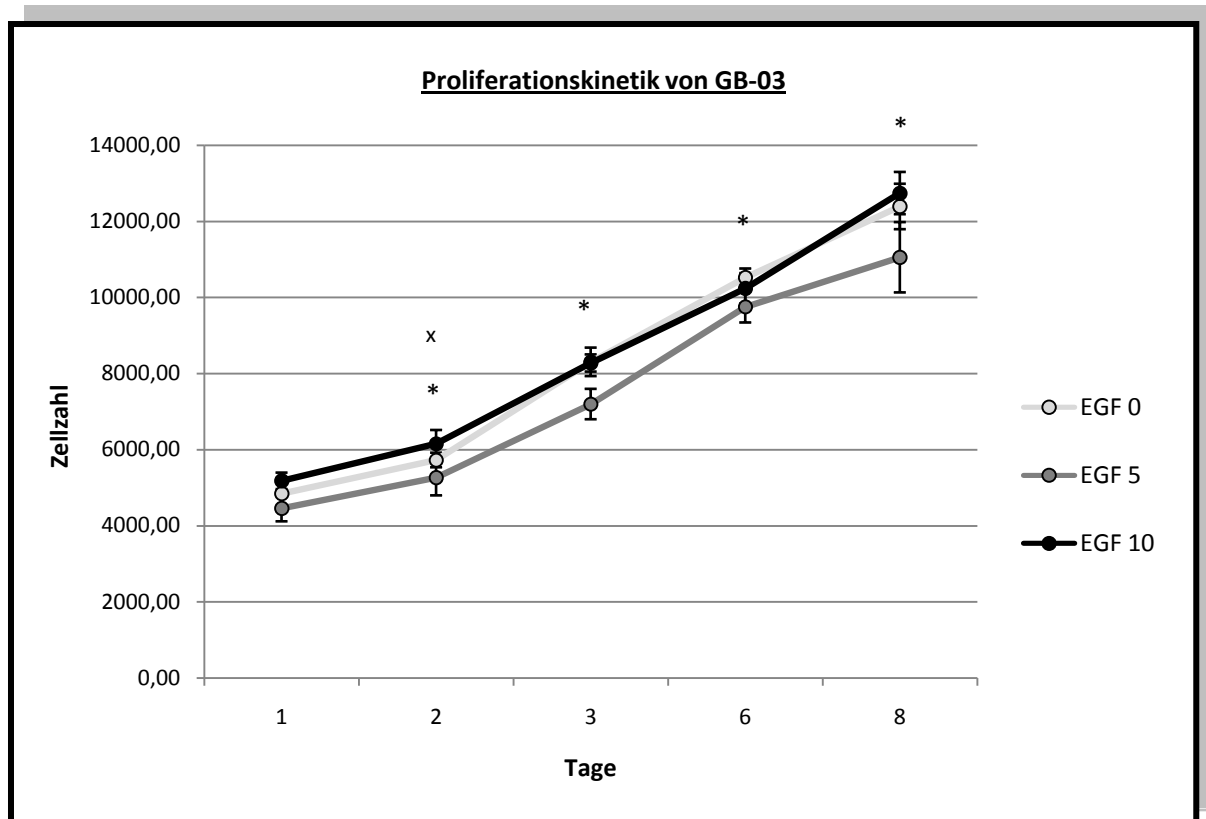


Abbildung 3.5.2: Proliferationskinetik der mGS-Kulturen GB-03/EGF(0), GB-03/EGF(5) und GB-03/EGF(10) über einen Zeitraum von 8 Tagen. GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10) zeigen eine vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit wohingegen GB-03/EGF(5) langsamer proliferiert. Signifikante Unterschiede bei $P < 0,01$: 'x' = zwischen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10), '*' = zwischen GB-03/EGF(5) und den beiden anderen mGS-Kulturen.

3.5.3. Differenzierungspotential

Als weiteres Charakteristikum wurde bei den mGS-Kulturen aus GB-03 deren Reaktion auf eine chemisch induzierte Zelldifferenzierung untersucht. Mittels der unter 2.2.7.2 beschriebenen Methode des FACS konnte die Signalintensität verschiedener molekularer Marker als Eigenschaft der gesamten Zellpopulation einer mGS-Kultur gemessen werden, als Hinweis auf die Fähigkeit der Zellen, sich entweder weiter auszudifferenzieren, oder aber einem solchen Mechanismus Widerstand entgegenzusetzen. Für die Analyse dieses als Differenzierungspotential bezeichneten Merkmals kamen die Marker NF (Neurofilaments), MAP-2 (Microtubule-associated protein 2), GFAP (Glial fibrillary acidic protein), GalC (Galactocerebrosidase), das Intermediärfilament Nestin und SOX-2 ([Sex determining region Y]-box 2) zum Einsatz. Kennzeichnend für die weitere Ausbildung reifer Zellen verschiedener neuraler Linien sind dabei NF (neuronal), MAP-2 (neuronal), GFAP (astrozytär) und GalC (oligodendrozytär), demgegenüber die Expression von Nestin und SOX-2 eher die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters anzeigt. Da für Tumorstammzellen in der Literatur bereits öfter beschrieben worden ist, daß diese bei der chemisch induzierten Zelldifferenzierung selbiger meist widerstehen, sollte auch bei allen drei mGS-Kulturen aus GB-03 geprüft werden, inwieweit hier eine Übereinstimmung mit den bisherigen Beobachtungen zu finden ist. Auf eine statistische Berechnung der signifikanten Unterschiede wurde verzichtet, da vor allem die Darstellung von Tendenzen wichtig war.

3.5.3.1. GB-03/EGF(0)

Die den Stammzellcharakter kennzeichnenden Marker Nestin und SOX-2 sind bei der mGS-Kultur GB-03/EGF(0) vor Induktion der Differenzierung deutlich ausgeprägt. Im Verlauf zeigen beide dann unterschiedliche Reaktionen: Während Nestin in seiner Signalintensität unverändert hoch bleibt, fällt diese bei SOX-2 auf einen Wert nahe Null. Auch der für Oligodendrozyten charakteristische Marker GalC weist vor Beginn der Differenzierung bereits einen hohen Wert mit über 50% positiver Zellen auf, wohingegen zu diesem Zeitpunkt eine Expression des astrozytären Markers GFAP nicht messbar ist. Während unter Differenzierungsbedingungen dann das Signal von GalC auf einem hohen Niveau verbleibt, steigt die Zahl GFAP-positiver Zellen zunächst auf über 50% der Gesamtpopulation an, um sich dann nach 6 Tagen wieder auf etwa 20% zu reduzieren. Eine weitere neuronale Differenzierung scheint nicht zu erfolgen, da sowohl bei MAP-2 als auch NF das Signal bei etwa 10-30% positiver Zellen wie schon vor Induktion verbleibt, mit einer kurzen Reduktion des Wertes bei MAP-2 am Tag 4, der aber an Tag 6 wieder auf sein Ausgangsniveau zurückgekehrt ist. Abbildung 3.5.3.1 gibt einen Überblick.

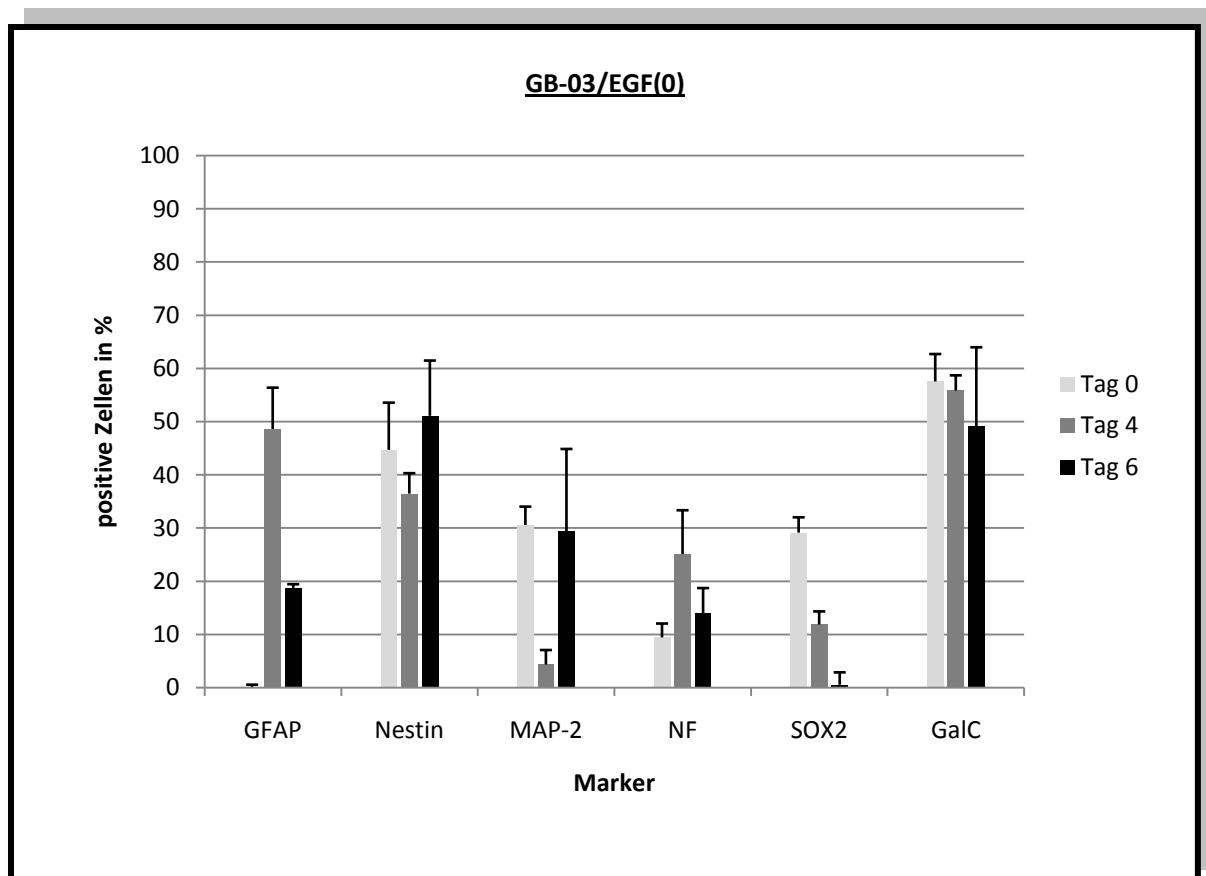


Abbildung 3.5.3.1: Differenzierung der mGS-Kultur GB-03/EGF(0) nach Kultivierung über mehr als 360 Tage. Gezeigt wird die relative Anzahl der für den jeweils mittels FACS gemessenen Marker positiven Zellen der Gesamtpopulation sowohl vor Induktion als auch nach chemisch induzierter Zelldifferenzierung nach Ablauf von 4 und 6 Tagen.

3.5.3.2. GB-03/EGF(5)

Etwas anders als zuvor für GB-03/EGF(0) stellen sich die Verhältnisse für Nestin und SOX-2 bei GB-03/EGF(5) dar: Mit einem leicht erniedrigten Ausgangsniveau für Nestin bei dieser Zellkultur sinkt auch hier unter Differenzierungsbedingungen die Zahl positiver Zellen bei SOX-2 auf nahe Null, demgegenüber sie bei Nestin auf einem höheren Wert verbleibt, mit leicht abnehmendem Trend. Wiederum eher gleiche Verhältnisse lassen sich bei GalC beobachten, indem mehr als die Hälfte aller Zellen der untersuchten Population diesen Marker exprimieren, was über den Zeitverlauf unverändert bleibt. Ein Unterschied zeigt sich bei GFAP: Vor Induktion der Differenzierung ist bei GB-03/EGF(5) wie schon bei GB-03/EGF(0) kein Signal für diesen Marker messbar, und ebenso ist er nach dem 4 Tag auf mehr als 50% angestiegen, jedoch verbleibt er bei GB-03/EGF(5) auf diesem Wert auch nach 6 Tagen, derweil er bei GB-03/EGF(0) wieder deutlich reduziert war. MAP-2 und NF liefern wieder ein vergleichbares Bild zwischen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(5), indem sie beide auf ihrem Ausgangsniveau verbleiben und MAP-2 sich wie auch schon zuvor an Tag 4 leicht reduziert darstellt, mit einem etwas erhöhten Ausgangswert positiver Zellen für MAP-2 bei GB-03/EGF(5) gegenüber GB-03/EGF(0). Abbildung 3.5.3.2 soll dies verdeutlichen.

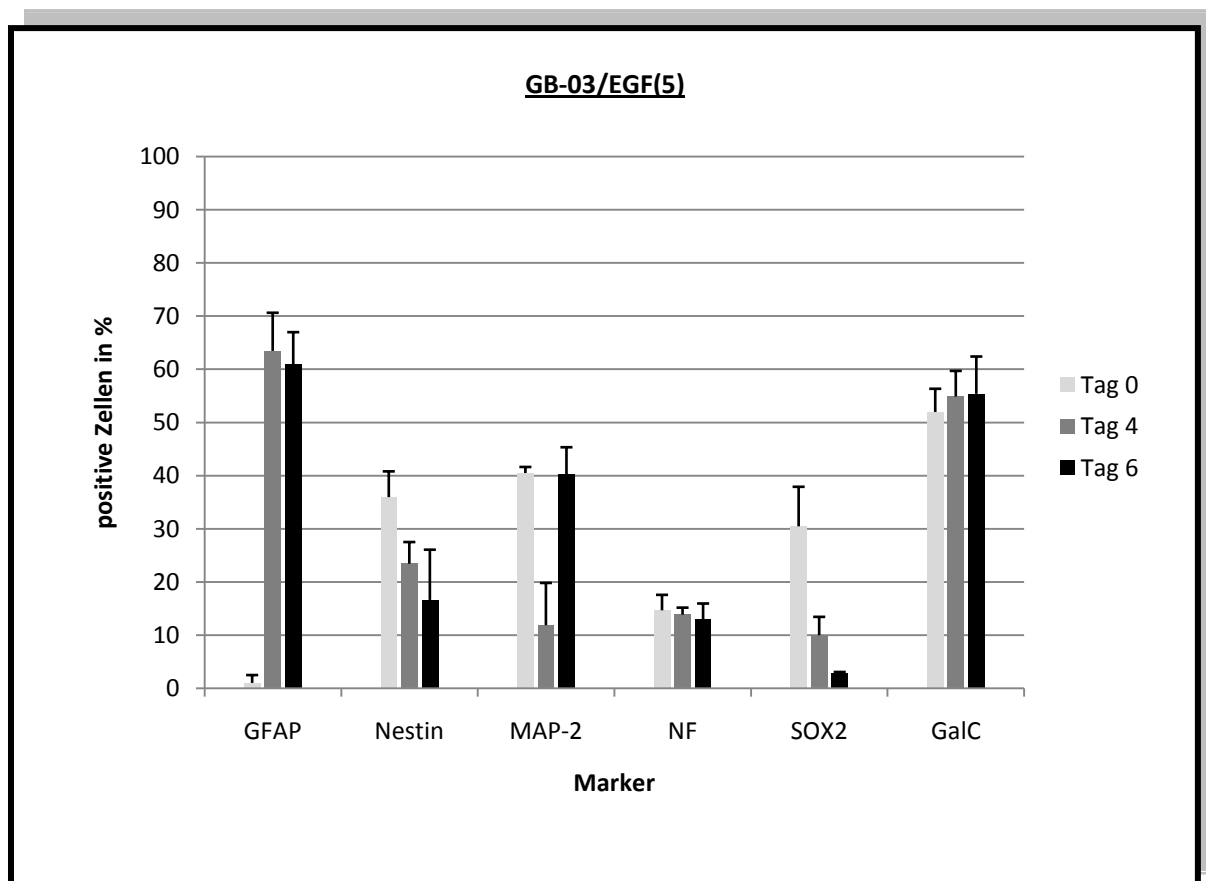


Abbildung 3.5.3.2: Differenzierung der mGS-Kultur GB-03/EGF(5) nach Kultivierung über mehr als 360 Tage. Gezeigt wird die relative Anzahl der für den jeweils mittels FACS gemessenen Marker positiven Zellen der Gesamtpopulation sowohl vor Induktion der Differenzierung, als auch nach chemisch induzierter Zelldifferenzierung nach Ablauf von 4 und 6 Tagen.

3.5.3.3. GB-03/EGF(10)

Die dritte untersuchte mGS-Kultur GB-03/EGF(10) folgt bezüglich der Ausprägung der für die Marker Nestin und SOX-2 gemessenen Werte eher der Zellkultur GB-03/EGF(0), indem auch hier die Anzahl Nestin positiver Zellen mit über 30% eher gleich bleibt, und das Signal von SOX-2 von einem Ausgangswert von über 20% kommend, an Tag 6 nahe Null gemessen wird. GalC erweist sich mit über 50% bei GB-03/EGF(10) ebenfalls vor Differenzierungsinduktion als deutlich ausgeprägt, sinkt jedoch im weiteren Verlauf auf etwa 30% ab, und GFAP ist in diesem Fall zu Beginn der Untersuchungen bei ca. 10% aller Zellen messbar. Ein so deutlicher Unterschied unter Differenzierungsbedingungen in der Ausprägung dieses Markers wie bei GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(5) ist bei GB-03/EGF(10) nicht erkennbar, durch den Anstieg nach 4 sowie die Reduktion nach 6 Tagen lässt sich jedoch eine Ähnlichkeit der Reaktion zu GB-03/EGF(0) vermuten. MAP-2 und NF folgen in den Ergebnissen für N41/EGFR(10) weitestgehend denen der anderen beiden mGS-Kulturen, so daß NF einen gleichbleibend niedrigen Wert von 10-20% positiver Zellen aufzeigt, lediglich die sonst beobachtete Reduktion von MAP-2 an Tag 4 von etwa 30-40% auf 10%, welche bei GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(5) nach Tag 6 wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt war, verbleibt bei GB-03/EGF(10) auf niedrigem Niveau. Abbildung 3.5.3.3 soll erneut diese Ergebnisse zusammenfassen.

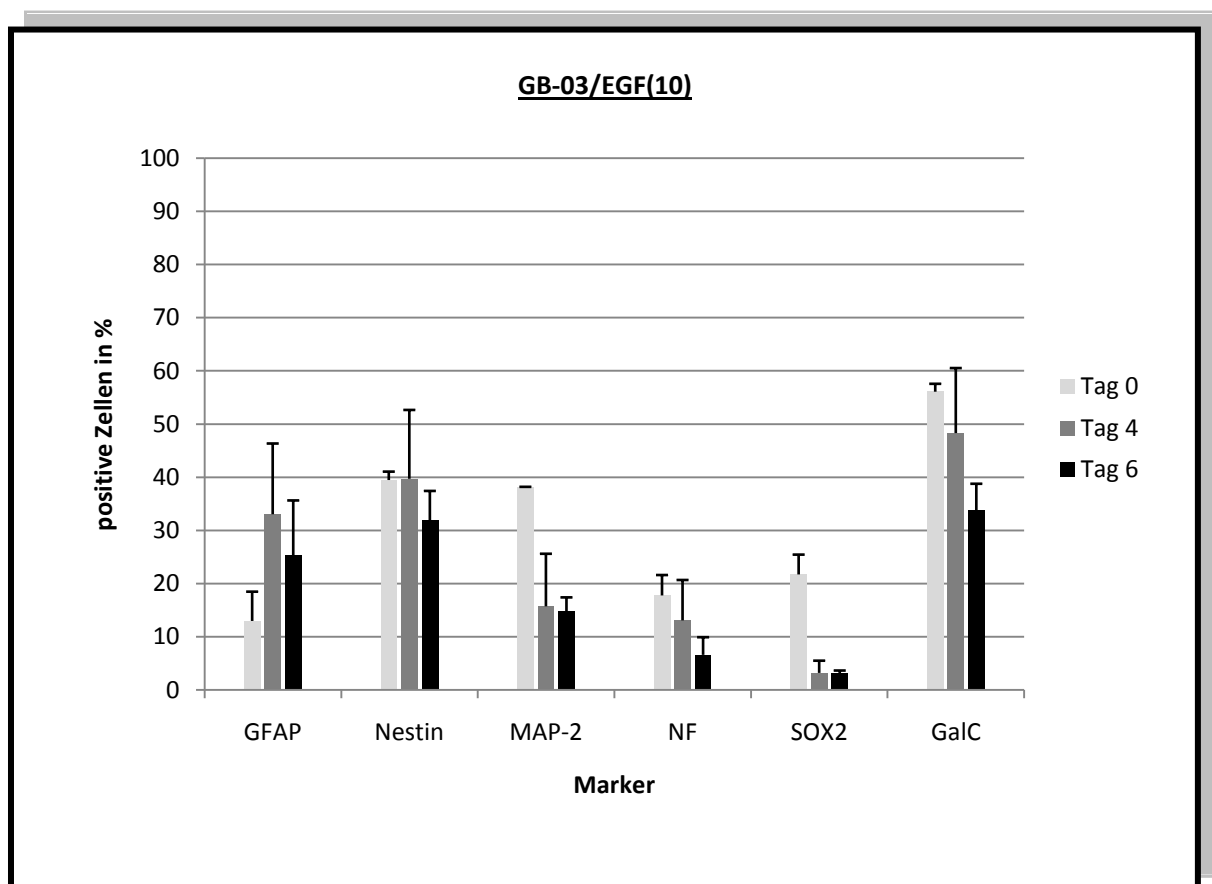


Abbildung 3.5.3.3: Differenzierung der mGS-Kultur GB-03/EGF(10) nach Kultivierung über mehr als 360 Tage. Gezeigt wird die relative Anzahl der für den jeweils mittels FACS gemessenen Marker positiven Zellen der Gesamtpopulation sowohl vor Induktion der Differenzierung, als auch nach chemisch induzierter Zelldifferenzierung nach Ablauf von 4 und 6 Tagen.

Zusammenfassung

Alle drei mGS-Kulturen zeigen vor Beginn der Differenzierung eine Ausprägung der Marker Nestin (30-40% positiver Zellen) sowie SOX-2 (20-30% positiver Zellen), beide kennzeichnend für Stammzeleigenschaften. Unter Differenzierungsbedingungen verbleibt dann Nestin immer auf etwa gleichem Niveau, wohingegen der für SOX-2 gemessene Wert regelmäßig auf nahe Null absinkt. Eine oligodendrozytäre Vordifferenzierung lässt sich aufgrund der Tatsache vermuten, daß ebenfalls bei allen 3 Zellkulturen vor Differenzierungsinduktion immer mehr als 50% GalC positiver Zellen innerhalb der Gesamtpopulation festgestellt werden konnten, eine weitere Ausprägung in diese Richtung war hingegen nicht zu beobachten, da sich die Zahl der GalC exprimierenden Zellen bis auf eine leichte Reduktion bei GB-03/EGF(10) an Tag 6 nicht veränderte. Da die astrozytäre Ausreifung markierende saure Gliafaserprotein GFAP konnte bis auf eine kleine Anzahl positiver Zellen bei GB-03/EGF(10) zu Anfang der Differenzierung nicht detektiert werden, stieg dann jedoch unter Differenzierungsbedingungen auf über 50-60% stark an. Diese Besonderheit blieb nur bei GB-03/EGF(5) nach 6 Tagen erhalten, bei den beiden anderen mGS-Kulturen reduzierte sich der Wert positiver Zellen um mehr als die Hälfte auf unter 20-30%. Eine weitere neuronale Differenzierung der Zellen konnte offensichtlich in keinem Fall induziert werden, da die mit 30-40% MAP-2- und 10-20% NF-positiver Zellen konstatierte leichte neuronale Vordifferenzierung aller Zellkulturen zu Beginn im weiteren Verlauf der Differenzierung keine erkennbaren Veränderungen erkennen ließ.

3.5.4. Tumorigenität in vivo

Zur Vervollständigung der Charakterisierung aller mGS-Kulturen aus GB-03 kam ein in vivo-Modell mit immunsupprimierten Nacktmäusen zum Einsatz, anhand dessen die Tumorigenität überprüft werden sollte. Bisherige Untersuchungen in anderen Arbeiten hatten gezeigt, daß unter serumfreien Kulturbedingungen wachsende Hirntumorstammzellen durchaus in der Lage sind, einen Tumor in vivo zu induzieren, dessen morphologisches Erscheinungsbild ein Korrelat zu dem bei menschlichen Glioblastomen beobachteten histologischen Merkmalen darstellt. Daher ließe ein ähnliches Resultat für die mGS-Kulturen aus GB-03 das Vorhandensein solcher Hirntumorstammzellen vermuten. Das Modell umfasste die intrakranielle Injektion von jeweils etwa 1000 Zellen aus den Kulturen GB-03/EGF(0), GB-03/EGF(5) und GB-03/EGF(10) im Rahmen einer stereotaktischen Operation, die im Bereich des Striatums vorgenommen wurde. Als Indiz für eine mögliche Tumorinduktion und Proliferation galt ein Gewichtsverlust von mehr als 10%, der sich bei einigen der Mäuse nach 4 Monaten feststellen ließ, so daß der Versuch nach diesem Zeitraum beendet und die Tiere getötet wurden. Nach anschließender Explantation des Hirns und Aufarbeitung der hiervon angefertigten Schnitte konnte eine histologische Analyse durchgeführt werden. In der HE-Färbung wiesen die mGS-Kulturen von GB-03/EGF(0) deutliche Unterschiede zu denen von GB-03/EGF(5) und GB-03/EGF(10) auf. Ausschließlich die Präparate von GB-03/EGF(0) bestätigten in allen Tieren die Induktion eines Tumors dessen Zellen bereits vorwiegend entlang myelinisierter Bahnen nahezu das gesamte Hirnparenchym durchwandert hatten. Dabei präsentierte sich histologisch in der Tat ein ähnliches Bild der diffusen Infiltration durch migrierende Tumorzellen mit Mitosen, Kernpolymorphismen und erhöhter Zelldichte, wie sie auch bei humanen Glioblastomen typischerweise beobachtet wird. Die Abbildungen 3.5.4.A bis 3.5.4.C zeigen dies an Beispielen von GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10) recht gut, indem bei GB-03/EGF(0) im gesamten striatalen Bereich mit Schwerpunkt rechts basal Tumorgewebe sichtbar wird, dessen migrierende Zellen vorwiegend entlang myelinisierter Bahnen des Corpus Callosum sowie zwischen Cortex und Basalganglien diffus das gesamte Hirnparenchym durchwandert haben (Abbildung 3.5.4.A). Durch die Ausbreitung der

Tumorzellen erscheint das Corpus Callosum extrem verbreitert, und scheint den Ausgangspunkt für die weitere Durchwanderung corticaler sowie subcorticaler Strukturen darzustellen (Abbildung 3.5.4.B). In höherer Auflösung zeigt sich dann der Einbruch der Tumorzellen in den Cortex und die damit einhergehende subsequeute Auflösung seiner laminaren Struktur, bei einer ausgeprägten Kernpolymorphie mit deutlich erhöhter Zellzahl (Abbildung 3.5.4.C). Interessanterweise konnte in keinem der analysierten Hirngewebsschnitte aus den mGS-Kulturen von GB-03/EGF(5) und GB-03/EGF(10) eine Tumorinduktion beobachtet werden, was im Ergebnis dem bei diesen Tieren fehlenden Gewichtsverlust entsprach. Daher dient hier GB-03/EGF(10) als Vergleich zum physiologischen Zustand.

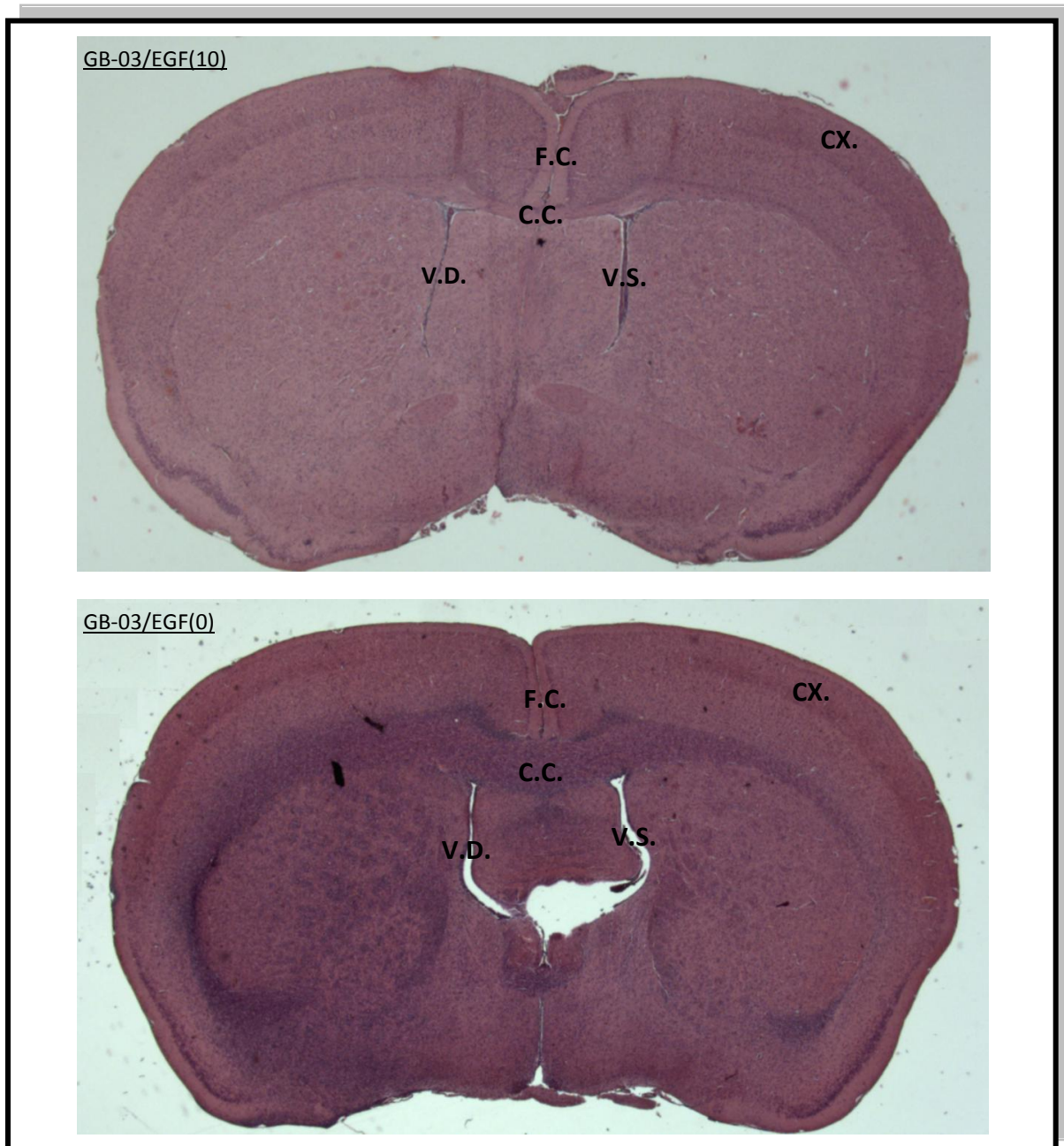


Abbildung 3.5.4.A: Übersicht der Koronarschnitte durch die Hirne einer gesunden und einer erkrankten Maus in HE-Färbung. Oben: Das gesunde Hirn einer Maus, die Zellen aus der mGS-Kultur GB-03/EGF(10) erhalten hatte, als physiologischer Zustand zum Vergleich. Unten: Das Hirn einer Maus, die Zellen aus der mGS-Kultur GB-03/EGF(0) erhalten hatte. Hier wird der diffus wachsende Tumor mit Ausbreitung über das gesamte Hirnparenchym sichtbar. Vergrößerung 1,6 fach. F.C.: Falx Cerebri, C.C.: Corpus Callosum, V.D.: Rechter Ventrikel, V.S.: Linker Ventrikel, CX.: Cortex.

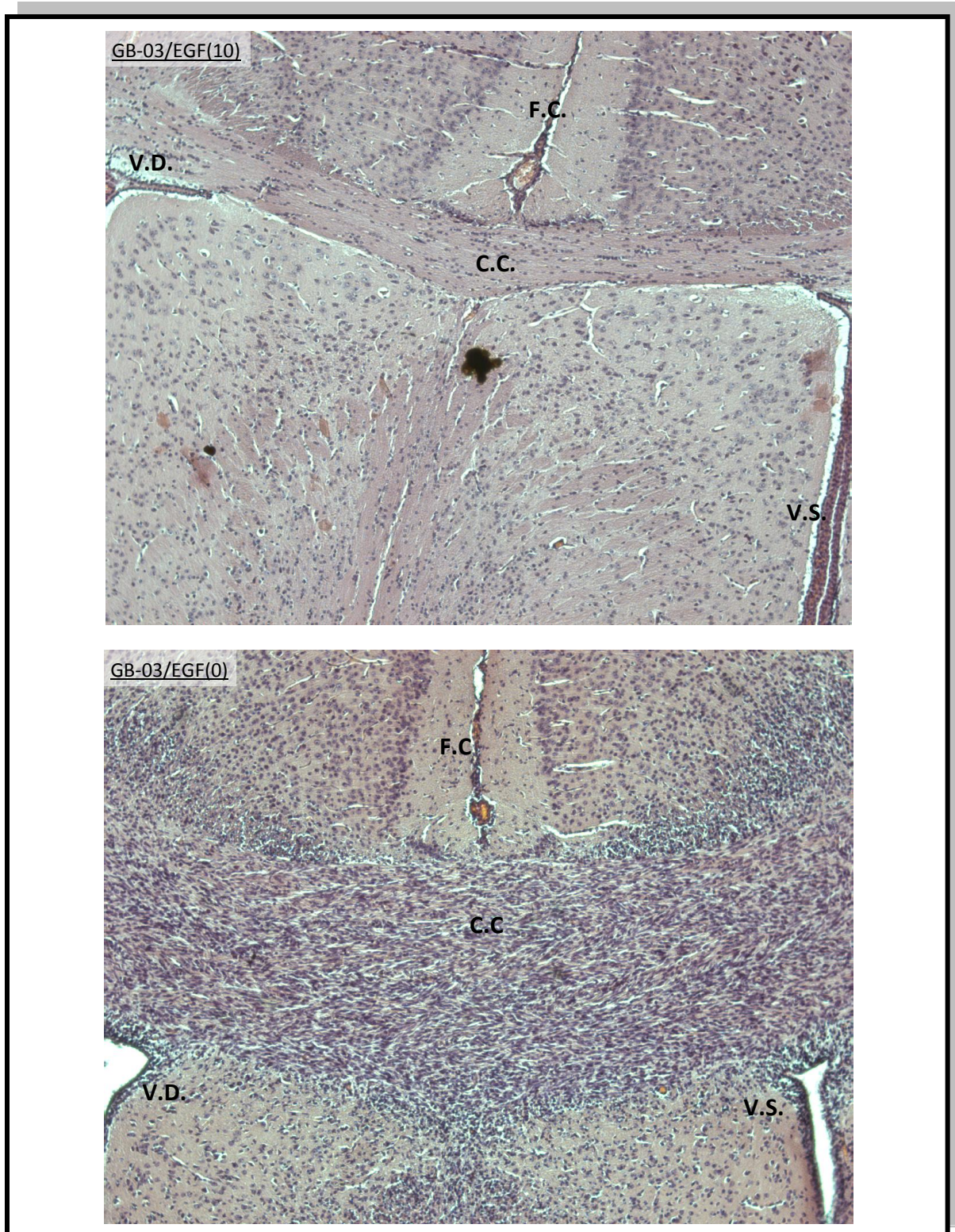


Abbildung 3.5.4.B: Ausschnittsvergrößerungen um den medialen Bereich des Corpus Callosum in HE-Färbung. Oben: Physiologischer Zustand bei dem Hirn einer Maus, die Zellen aus der mGS-Kultur GB-03/EGF(10) erhalten hatte. Unten: Pathologischer Zustand bei dem Hirn einer Maus mit Zellen aus der mGS-Kultur GB-03/EGF(0). Man erkennt deutlich die Verbreiterung des Corpus Callosum mit einer stark erhöhten Zahl an atypischen Zellen, die auch benachbarte anatomische Strukturen durchwandert haben. Vergrößerung 10 fach. F.C.: Falx Cerebri, C.C.: Corpus Callosum, V.D.: Rechter Ventrikel, V.S.: Linker Ventrikel.

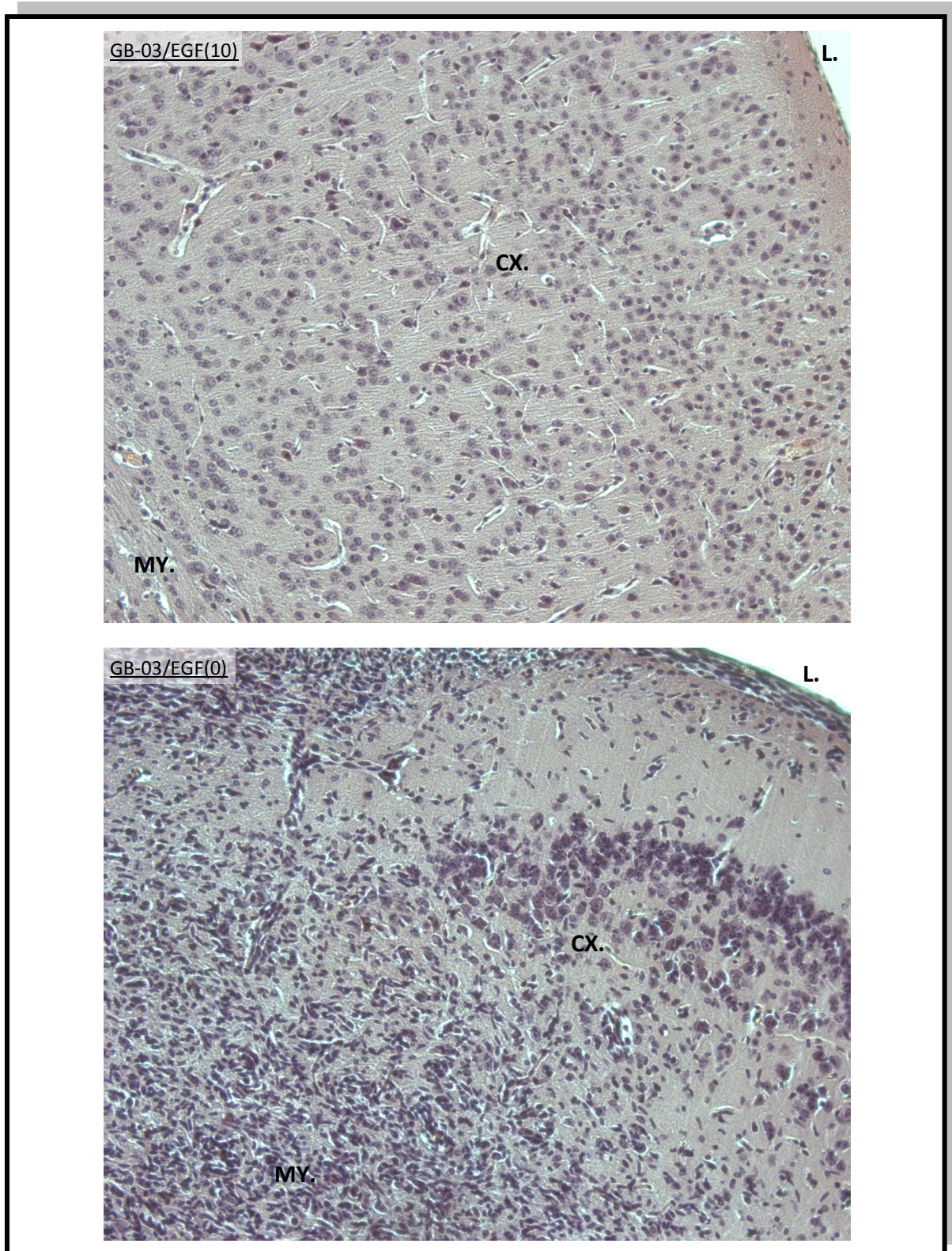


Abbildung 3.5.4.C: Ausschnittsvergrößerungen des parietalen Cortex rechts cranial in HE-Färbung. Oben: Physiologischer Zustand bei einem Hirn einer Maus, die Zellen aus der mGS-Kultur GB-03/EGF(10) erhalten hatte. Unten: Pathologischer Zustand bei dem Hirn einer Maus, die Zellen aus der mGS-Kultur GB-03/EGF(0) erhalten hatte. Man erkennt unten rechts im Bild noch die ursprüngliche laminare Struktur des Cortex, die links durch die Durchwanderung mit Tumorzellen bereits aufgelöst erscheint. Vergrößerung 20 fach. L.: Lumen, CX.: Cortex, MY.: Myelinisierte Bahn als Grenze zu den Basalganglien.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer stabilen Langzeitzellkultur unter modifizierten Stammzellbedingungen aus dem Tumorgewebe eines Glioblastoms, welche die EGFR-Genamplifikation über den gesamten Untersuchungszeitraum aufrecht erhält. Dies sollte mithilfe einer ursprünglich für die Kultivierung von normalen neuronalen Stammzellen entwickelten Methode geschehen, welche unter serumfreien Bedingungen die Anreicherung wenig differenzierter Hirntumorstammzellen ermöglicht, indem in einem solchen selektiven System die stärker differenzierten Zellen aufgrund des Selektionsnachteils zugrunde gehen. Durch die beiden mGS-Kulturen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10) wurde dieses Ziel erreicht, beide konnten auch nach Abschluß dieser Arbeit kontinuierlich weiter expandiert werden. Die Untersuchungen bezüglich der Wachstumsrelationen und der EGFR-Genamplifikation in Zusammenhang mit dem Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen des Wachstumsfaktors EGF ermöglichte einige interessante Beobachtungen, welche nun im folgenden diskutiert werden sollen, bevor im Anschluß daran die Charakteristik der mGS-Kulturen aus GB-03 anhand einiger für Hirntumorstammzellkulturen als typisch beschriebenen Eigenschaften näher erläutert wird.

4.1. Wachstum und EGF-Konzentration

Zunächst ist festzuhalten, daß von insgesamt 31 zur Verfügung stehenden Glioblastom-OP-Präparaten aus 9 dieser Präparate Zellkulturen als unterschiedliche mGS-Kulturen etabliert werden konnten, wobei wiederum nur bei 5 dieser Glioblastome die mGS-Kulturen als stabil zu expandierende Langzeitzellkulturen aus den Untersuchungen hervorgingen, wohingegen die mGS-Kulturen der restlichen 4 Glioblastome keine weitere Proliferation zeigten, dies jedoch nach sehr unterschiedlichen Zeiträumen. Hierbei fiel auf, daß bei den jeweils verwendeten 3 verschiedenen EGF-Konzentrationen immer entweder alle mGS-Kulturen eines Glioblastoms kontinuierliches Wachstum zeigten, oder aber entsprechend einheitlich die Proliferation einstellten. Und nur bei 1 Glioblastom konnte die EGFR-Amplifikation bei zwei der sich davon ableitenden stabil expandierten mGS-Kulturen aufrecht erhalten werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 4.1.

<u>mGS</u>	<u>Wachstum der mGS-Kulturen</u>
GB-02 GB-03 GB-10 GB-15 GB-19	Stabil zu expandierende Langzeitzellkulturen
GB-11 GB-17 GB-18 GB-22	Proliferation zu unterschiedlichen Zeitpunkten eingestellt

Tabelle 4.1: Glioblastome, deren mGS-Kulturen entweder alle stabil expandiert werden konnten, oder aber alle zu verschiedenen Zeiten kein weiteres Wachstum zeigten, rot markiert GB-03, von dem zwei der drei mGS-Kulturen die EGFR-Amplifikation aufrecht erhalten haben.

Der Hintergrund für die eher geringe Zahl an erfolgreichen Kultivierungsversuchen könnte die Tatsache sein, daß wahrscheinlich stets nur eine relativ kleine Population an Zellen die Gruppe der Hirntumorstammzellen bildet (Reya et al., 2001; Singh et al., 2003) (siehe auch Abbildung 4.1.A), so daß bei Inkulturnahme der Gewebeprobe nicht immer eine ausreichende Menge dieser Zellen überführt wird. Denn wahrscheinlich braucht es eine bestimmte Zahl an Hirntumorstammzellen in einem bestimmten Kulturvolumen, um eine Mikroumgebung zu schaffen, welche ein dauerhaftes Überleben dieser Zellen und der weiteren aus ihnen hervorgehenden Progenitoren sichert. Das Wachstumsmuster der Zellkulturen war insgesamt sehr heterogen, jedoch konnte bei allen Zellkulturen, die über einen langen Zeitraum expandiert wurden, eine Tendenz zu sphärischem Wachstum beobachtet werden. Keine der mGS-Kulturen zeigte ein ausschließlich durch einzeln adhärent wachsende Zellen geprägtes Bild, wie es bei der Kultur unter konventionellen Serumbedingungen wie zum Beispiel der Linie U87-MG zu beobachten ist (Gan, Kaye, und Luwor et al., 2009). Vielmehr zeigten die Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer eher eine Neigung, ihr zu Anfang semi-adhärentes Wachstum in Richtung des nicht adhärenen Wachstums zu verändern. Dies wäre im Einklang mit der bisherigen Beobachtung, daß sich Hirntumorstammzellkulturen unter serumfreien Bedingungen durch ihr sphärisches Wachstum ähnlich verhalten wie normale neurale Stammzellen, aus denen bei Kultivierung in vitro „Neurosphären“ entstehen (Ignatova et al., 2002; Hemmati et al., 2003).

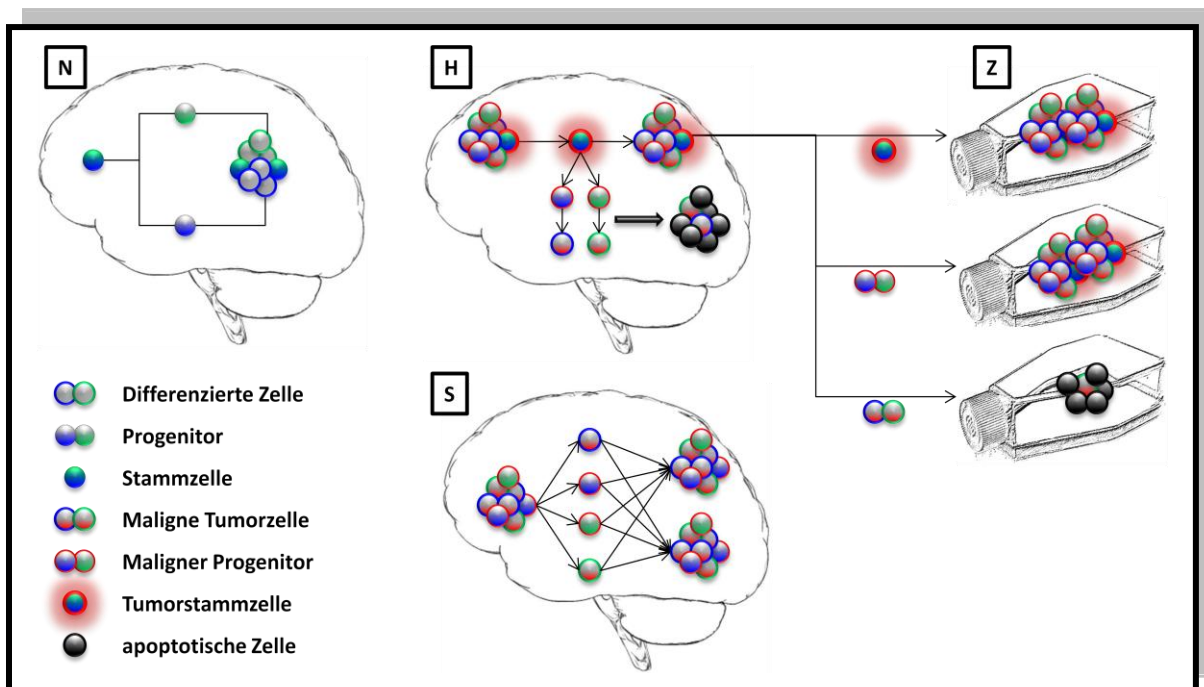


Abbildung 4.1.A: Schematische Darstellung der hypothetischen Modelle der Stammzellentwicklung in normalem neuronalen Gewebe (N) links, von Hirntumorstammzellen bei der Tumorigenese (H-Hierarchisches Modell / S-Stochastisches Modell) mitte, und der Zellkultivierung der mGS-Kulturen (Z) rechts. In Bild (N) entwickeln sich aus Stammzellen zunächst Progenitoren, und aus diesen im weiteren Verlauf die differenzierten Zellen. Während im stochastischen Modell (S) alle Tumorzellen unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad einen neuen Tumor induzieren können, ist diese Fähigkeit beim hierarchischen Modell (H) auf die sogenannten Hirntumorstammzellen begrenzt. Weiter ausdifferenzierte Tumorzellen können hiernach keinen neuen Tumor induzieren und sterben ab. Bild (Z) zeigt die angenommenen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Etablierung von Zellkulturen, indem nur bei Überführung einer ausreichenden Anzahl entweder von Hirntumorstammzellen oder aber deren unmittelbaren Progenitoren eine Proliferation in vitro induziert wird (obere zwei Bilder rechts), da die weiter ausdifferenzierten Tumorzellen dieses Potential nicht aufzeigen (unteres Bild rechts).

Auch hier läßt sich eine Ursache am ehesten bei der für das Wachstum von Zellen wichtigen Mikroumgebung finden, da durch Bildung einer Sphäre die Zellen auto- und parakrine Effekte am effektivsten umsetzen können, weil hier eine Zelle stets von der maximal möglichen Zahl anderer Zellen umgeben ist. Die letztgenannte Gegebenheit wird um so bedeutsamer, da in diesem Mikromilieu Strukturen und Komponenten der Extrazellulären Matrix produziert werden, was zusammen betrachtet mit den auto- und parakrinen Interaktionen der Situation der Tumorzellen in vivo am ehesten entspricht (*Gilbertson und Rich et al., 2007*). Indes sind zwei unterschiedliche Mechanismen denkbar, die zu solch einheitlichem Wachstums-Phänotyp führen. Zum einen könnten sich die Zellen durch Veränderungen ihrer Physiologie an die in vitro Bedingungen anpassen, zum anderen mag die natürliche Selektion bei Expansion der Kultur schlicht die Zellen begünstigen, die nicht adhärent in Sphären wachsen, so daß die Population an Zellen, die noch adhärentes Wachstum zeigt, zugrunde geht. Für einen Vorteil des sphärischen Erscheinungsbildes spricht auch die Tatsache, daß alle mGS-Kulturen unabhängig von der zugegebenen EGF-Konzentration am Ende der Untersuchungen nach dem relativ langen Zeitraum von einem Jahr und vielen Passagen ausschließlich nicht adhärentes Wachstum zeigten. Die Abbildung 4.1.B unternimmt den Versuch einer grafischen Darstellung der Mikroumgebung.

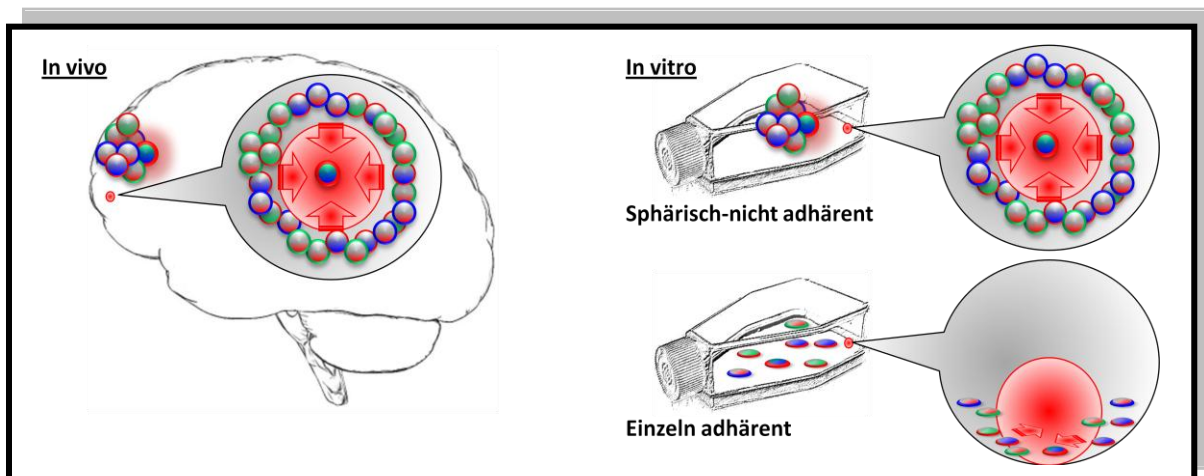


Abbildung 4.1.B: Vergleich der Mikroumgebung in vivo (links) und in vitro (rechts). Der runde grau hinterlegte Bereich soll einen vergrößerten Ausschnitt darstellen, der runde rot schattierte die Mikroumgebung einer Hirntumorstammzelle. Die Legende der unterschiedlichen Zellen folgt Abbildung 4.1.A. Die roten Pfeile bezeichnen sowohl die auto- und parakrinen Effekte als auch die Produktion von Komponenten der Extrazellulären Matrix durch die umgebenden Zellen auf die Effektorzelle in der Mitte. Der Vergleich der beiden verschiedenen Wachstumsmuster in vitro (rechts) soll verdeutlichen, daß bei nicht-adhärenenten Sphären die Wirkungen innerhalb der Mikroumgebung wahrscheinlich deutlich stärker ausgeprägt sind, als bei vereinzelt adhärenent wachsenden Zellen.

Der Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen des Wachstumsfaktors EGF während der Kultivierung zeigte verschiedenste Auswirkungen. Zunächst haben alle mGS-Kulturen ohne EGF-Zusatz deutlich länger gebraucht, eine sichtbare Proliferation zu generieren als alle anderen, bei denen EGF in unterschiedlicher Konzentration Bestandteil des Zellkulturmediums gewesen ist. Haben die Zellen unter Zusatz von EGF schon innerhalb der ersten Wochen ein sichtbares Wachstum und die damit verbundene Möglichkeit der Expansion gezeigt, so war dies ohne EGF erst nach mehreren Monaten der Fall. Interessanterweise hat sich dieses langsamere Wachstum unter fehlendem EGF-Zusatz aber

nicht bei allen Zellkulturen über den gesamten Zeitraum fortgesetzt, sondern ist nur bei GB-02 und GB-03 bestehen geblieben, welche wiederum beide im ursprünglichen Tumor eine Amplifikation aufwiesen. Hingegen ist zum Beispiel die nicht amplifizierte mGS-Kultur aus GB-19 ohne EGF nach einigen Monaten durchaus vergleichbar schnell gewachsen wie mit 5 oder 10 ng/ml dieses Wachstumsfaktors. Dies spricht für einen schon vorher beschriebenen negativen Einfluß einer vorhandenen EGFR-Amplifikation auf das Wachstum in vitro (Bigner et al., 1990; Nishikawa et al., 1994). Insbesondere auch aus dem Grund, da sich der zunächst im Vergleich zu GB-03 um das Doppelte stärker amplifizierte Tumor GB-02 durch ein im Verhältnis zu selbigem betrachtet deutlich langsames Wachstum unter EGF-Entzug auszeichnet. Hier könnte die durch die Amplifikation des EGFR-Gens verursachte Überexpression des Rezeptor-Proteins eine Rolle spielen. Denn eine Verstärkung des proliferierenden Effekts einer höheren Rezeptorzahl benötigt zumindest für den wt-EGFR unter anderem die entsprechenden Liganden. Da diese weder durch Zugabe zur Kultur, noch durch eher unwahrscheinliche auto- und parakrine Effekte aufgrund der gerade zu Kulturbeginn relativen Abgesondertheit der einzelnen Zellen in größerer Menge vorhanden sind, mag eine Zelle, welche ursprünglich in vivo einen Selektionsvorteil aufgrund der durch EGFR-Überexpression verstärkten Proliferation hat (Okada et al., 2003), diesen in vitro verlieren, wohingegen andere Zellen, bei denen die verstärkte Proliferation auf der Dysregulation anderer Signaltransduktionskaskaden und/oder Liganden/Rezeptor-Systeme beruht, für ihr Wachstum in vitro auch nicht zwingend EGF benötigen (siehe Abbildung 4.1.C).

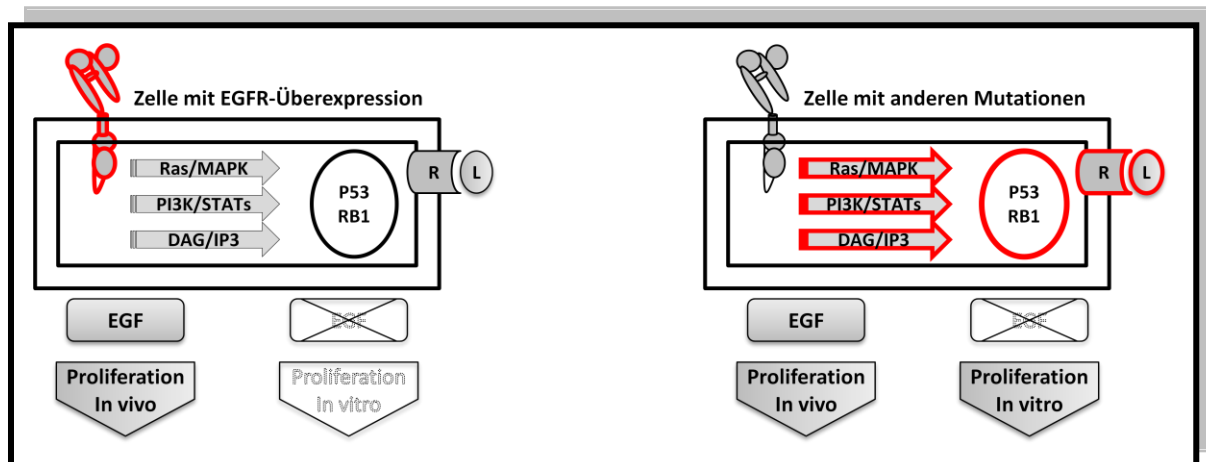


Abbildung 4.1.C: Unterschiede in den Mutationen von Tumorzellen, die zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Kultivierung ohne EGF führen. Die Symbolik folgt der in den Abbildungen 1.5.1.B und C der Einleitung eingeführten Darstellung. Die rote Umrandung bezeichnet Mutationen der jeweiligen Komponenten. Links: Zelle mit Überexpression des EGFR meist aufgrund von Genamplifikation, die in vivo durch den vorhandenen Liganden EGF einen Selektionsvorteil hat, und diesen in vitro ohne EGF verliert. Rechts: Zelle mit Mutationen innerhalb anderer Signaltransduktionskaskaden und /oder in anderen Rezeptor (R) / Ligand (L)-Systemen, die unabhängig vom Vorhandensein des Liganden EGF eine Proliferation in vitro sicherstellen.

Weiteren Aufschluß könnte hier eine Untersuchung der Zellkulturen auf die Amplifikation der EGFR-Mutation EGFRvIII geben, welche im Gegensatz zu dem wt-EGFR keine Liganden für ihr verstärktes Proliferationssignal benötigt (Ramnarain et al., 2006). Trotzdem scheint EGF für die Mikroumgebung aller Tumorzellen wichtig, da alle Kulturen ohne EGF vergleichsweise lange gebraucht haben, um in vitro ein Wachstum zu generieren. Der Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen an EGF scheint

ansonsten keinen weiteren Einfluß auf das Wachstum bezüglich der aus dem gleichen Glioblastom gewonnenen mGS-Kulturen zu haben, lediglich ein kleiner Vorteil bei der jeweils geringsten EGF-Konzentration von 5 ng/ml bei GB-02, GB-03 und GB-19 sowie 10 ng/ml bei GB-10 und GB-15 könnte anhand der Ergebnisse vermutet werden, dieser müsste jedoch durch entsprechende Proliferationskinetiken untermauert werden.

Vergleicht man nun das Wachstum der mGS-Kulturen aus unterschiedlichen Glioblastomen bei einer bestimmten EGF-Konzentration untereinander, so fällt bei allen Ansätzen eine Dichotomie auf. Unabhängig von der zugesetzten Menge an EGF gibt es zum einen Zellkulturen, welche entsprechend der unter 3.3 getroffenen Definition langsam oder moderat expandiert werden konnten, meist nicht über mehr als 4-7 Passagen, mit entsprechend geringen Splittingverhältnissen, zum anderen zeigten sich Zellkulturen, die stabil über 11-16 Passagen gewachsen sind, und auch anhand des Splittingverhältnisses ein im Vergleich zur anderen Gruppe deutlich schnelleres Wachstum zeigten. Eine ähnliche dichotomische Spaltung wurde bereits von (Gunther *et al.*, 2008) beschrieben, und soll hier durch 2 Gruppen bezeichnet mit zum einen beschleunigtem und zum anderen verzögertem Wachstum bezeichnet werden, Abbildung 4.1.D veranschaulicht die folgenden Erläuterungen.

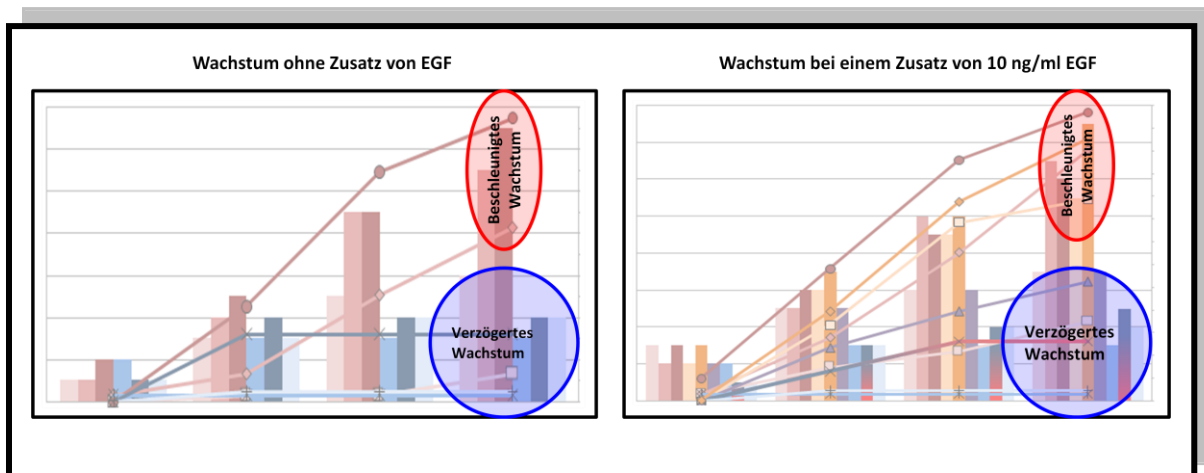


Abbildung 4.1.D: Dichotomie in der beobachteten Verteilung der Wachstumsrelationen. Vergleich aller mGS-Kulturen unterschiedlicher Glioblastome bei Kultivierung ohne (links) und mit 10 ng/ml EGF (rechts). In beiden Fällen wird die Aufspaltung in 2 Gruppen mit deutlich differierenden Proliferationsgeschwindigkeiten anhand der Passagenzahl (Balken) und dem Splittingverhältnis (Linien) sichtbar, hier mit rotem (beschleunigtes Wachstum) und blauem Kreis (verzögertes Wachstum) markiert.

Es könnte vermutet werden, daß das hier beobachtete Phänomen der dort beschriebenen Aufteilung der Zellkulturen in bestimmte Phänotypen entspricht, bei dem die resultierenden Hirntumorstammzellen einer Langzeitzellkultur ihren Stammzellcharakter mehr oder weniger aufrecht erhalten können, wobei das eher langsame Wachstum nur eine der für Stammzellen beschriebenen Charakteristika ist. So zeigt sich sowohl ohne Zusatz von EGF, als auch bei Zusatz von 5 ng/ml dieses Wachstumsfaktors genauso ein einheitliches Bild, in dem die mGS-Kultur aus GB-19 am schnellsten proliferiert, gefolgt von GB-03, wie auch bei 10 ng/ml EGF, bei der zu diesen beiden schnell wachsenden Zellkulturen noch die Kulturen aus GB-10 und GB-15 hinzukommen, und damit die eine Gruppe mit beschleunigtem Wachstum bilden. Die beiden letztgenannten folgen dann diesem

Schema, indem bei allen Kulturen aus GB-10 und GB-15 unabhängig von den eingesetzten EGF-Konzentrationen 10, 15 und 20 ng/ml diejenigen aus GB-15 die stärker proliferierenden darstellen. Alle anderen mGS-Kulturen (aus GB-02, GB-11, GB-17, GB-18 und GB-22) bilden mit ihrem langsamen und moderaten Wachstum die Gruppe der verzögert wachsenden Zellkulturen, bei denen eine detailliertere Unterscheidung anhand der hier gewählten Kriterien Passagenzahl und Splittingverhältnis nicht möglich ist. Die Ursache für die scheinbar fehlende Bedeutung der Menge des EGF-Zusatzes für das Wachstum der Kultur könnte die für Glioblastome typische Anhäufung vielfältiger Mutationen sein, die neben dem EGFR auch noch mannigfaltige andere Rezeptoren und Signaltransduktionskaskaden betreffen (*Ohgaki und Kleihues et al., 2007*). Somit wäre ein mehr oder weniger dynamisch eingestelltes „Gleichgewicht“ der Dysregulation (siehe auch Abbildung 4.2.B im folgenden Abschnitt) mehrerer zellulärer Funktionen bei verschiedenen Glioblastomen unterschiedlich ausgeprägt, und würde damit einen weitaus dominanteren Einfluß auf das Wachstum des Tumors haben als nur die singulär betrachtete Veränderung im EGFR-Signal. Dies wäre im Einklang mit der häufig beschriebenen multifaktoriellen Pathogenese und damit verbundenen notwendigen multimodalen Therapieansätzen beim Glioblastom (*Arjona, Rey, und Taylor et al., 2006; Furnari et al., 2007*).

Das Wachstumsverhalten hat aber offensichtlich keinen Einfluß auf die Prognose, ob eine mGS-Kultur als stabile Langzeitkultur erhalten bleibt. So haben alle Kulturen aus GB-11, die deutlich stärker als zum Beispiel die aus GB-02 expandiert sind, nach ca. 300 Tagen das Wachstum komplett eingestellt, wohingegen bei GB-02 auch nach Ende der Untersuchungen alle mGS-Kulturen zumindest über weitere 3 Monate expandiert werden konnten.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß eine unterschiedliche Konzentration des Wachstumsfaktors EGF bei der Langzeitkultivierung scheinbar keinen Einfluß auf das Wachstum hat, die Zellkulturen expandieren entweder schnell oder langsam unabhängig von der EGF-Zugabe. Lediglich der komplette Verzicht auf EGF scheint bei den Zellkulturen, die eine Amplifikation des EGFR-Gens zeigten, einen Einfluß auf das Wachstum zu haben, wobei dies zu Beginn der Kultivierung deutlicher ausgeprägt war, als am Ende der Untersuchungen.

4.2. Amplifikation des EGFR-Gens und EGF-Konzentration

Übereinstimmend mit bisherigen Beobachtungen gestaltete es sich auch in dieser Arbeit sehr schwierig, eine Zellkultur zu finden, welche über einen langen Zeitraum expandiert werden kann, und gleichzeitig ihre EGFR-Genamplifikation aufrecht erhält (*Humphrey et al., 1988; Besson und Yong et al., 2001; Okada et al., 2003; Huang et al., 2007a*). Lediglich bei zwei mGS-Kulturen [GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10)] aus nur einem einzigen von 31 Glioblastomen wurde dies bei GB-03 zum ersten Mal erreicht. In der Gesamtheit zeigten durch die Real-Time PCR-Analyse bei diesen Untersuchungen 23% der Glioblastome im Ursprungstumor eine EGFR-Genamplifikation, was geringfügig weniger ist, als sonst in der Literatur beschrieben wird (*Ohgaki und Kleihues et al., 2007*). Dabei zeigten sich Werte zwischen einer 5 fachen bis zu einer 78 fachen Amplifikation des EGFR-Gens in den Tumoren, dies nun wiederum konform mit den festgestellten Werten anderer Autoren, dort lag die gemessene Amplifikation dieses Rezeptorgens zum Beispiel zwischen Werten von 6-60fach (*Libermann et al., 1985*), 10-110fach (*Ekstrand et al., 1991*) oder 40-120fach (*Hegi et al., 1997*). Die Höhe dieses Wertes scheint allerdings keine einheitliche Wirkung auf das Wachstum der Zellkulturen in vitro zu haben, da das Vorhandensein und die Ausprägung der Amplifikation im Ursprungstumor weder unter Entzug des Wachstumsfaktors EGF, noch bei Zugabe eine einheitlich verstärkende oder abschwächende

Wirkung auf das Wachstum zu Beginn oder am Ende der untersuchten Kultivierungsdauer zeigt. Es könnte vermutet werden, daß die Zellkulturen wahrscheinlich ein bestimmtes pathophysiologisches Gleichgewicht innerhalb der in vitro Bedingungen einstellen, welches dann einen Phänotyp hervorbringt, der charakteristisch für eine mGS-Kultur ist, jedoch relativ unabhängig von der Veränderung nur einzelner Faktoren, wie auch dem Zusatz von EGF oder einer Veränderung der Kopienzahl des EGFR-Gens aus den bereits unter 4.1 beschriebenen Gründen der mannigfaltig veränderten Zellphysiologie. Die Abbildungen 4.2.A und 4.2.B unternehmen den Versuch der näheren Erläuterung, indem zum einen nochmals die schon in 1.2.2 und 1.5.1 erwähnten molekularbiologischen Komponenten und Wege zusammengefasst werden (Abbildung 4.2.A), und zum anderen das vermutete pathophysiologische Gleichgewicht grafisch dargestellt wird (Abbildung 4.2.B).

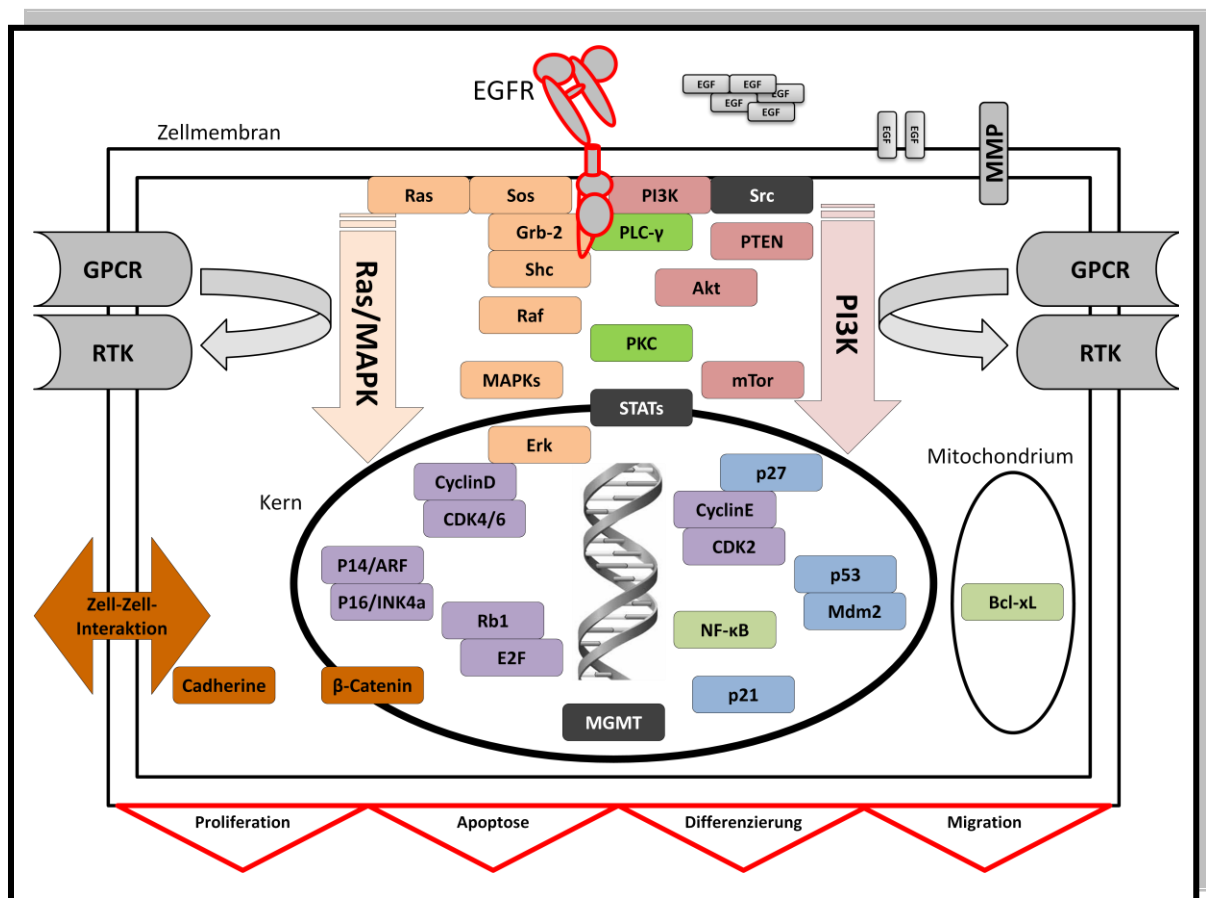


Abbildung 4.2.A: Übersicht der Komponenten und Wege, die bei der Signaltransduktion des EGF-Rezeptors eine Rolle spielen. Das Rezeptorsymbol folgt Abbildung 1.5.1.B, Die Doppelhelix im Kern symbolisiert das EGFR-Gen, die abgerundeten Rechtecke stehen für einzelne Peptide, Proteine oder Proteinfamilien, die geraden Pfeile symbolisieren zwei wichtige Wege der Weiterleitung des EGFR-Signals. Gleiche Farben stellen die Zugehörigkeit der Komponenten zu einem bestimmten System dar, orange=Ras/MAPK-Weg, rot=PI3K-Weg, grün=PLC-γ-Weg, violett=Rb1/CDK gesteuerter Zellzyklus, blau=p53-Regulation, hellgrün=Apoptose-Regulation, braun=Zelladhäsion. Dabei gibt es natürlich vielfältige Wechselwirkungen einzelner Komponenten untereinander, auf deren Darstellung aus Übersichtsgründen verzichtet wurde. Die dunkelgrau markierten Komponenten sind übergeordnet (MGMT), eigenständig (STAT's) oder in mannigfaltige Systeme involviert (src). Die hellgrauen Symbole in der Zellmembran stehen für G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und andere Rezeptortyrosinkinasen (RTK), die mittels „crosstalk“ die Signaltransduktion beeinflussen (durch runde Pfeile angedeutet). Die rote Umrandung des Rezeptors deutet eine pathologische Aktivitätssteigerung an, die zu ebenfalls rot umrandeten weil pathologisch veränderten Reaktionen der Zelle führt. Die Abkürzungen finden sich sämtlich im Abkürzungsverzeichnis.

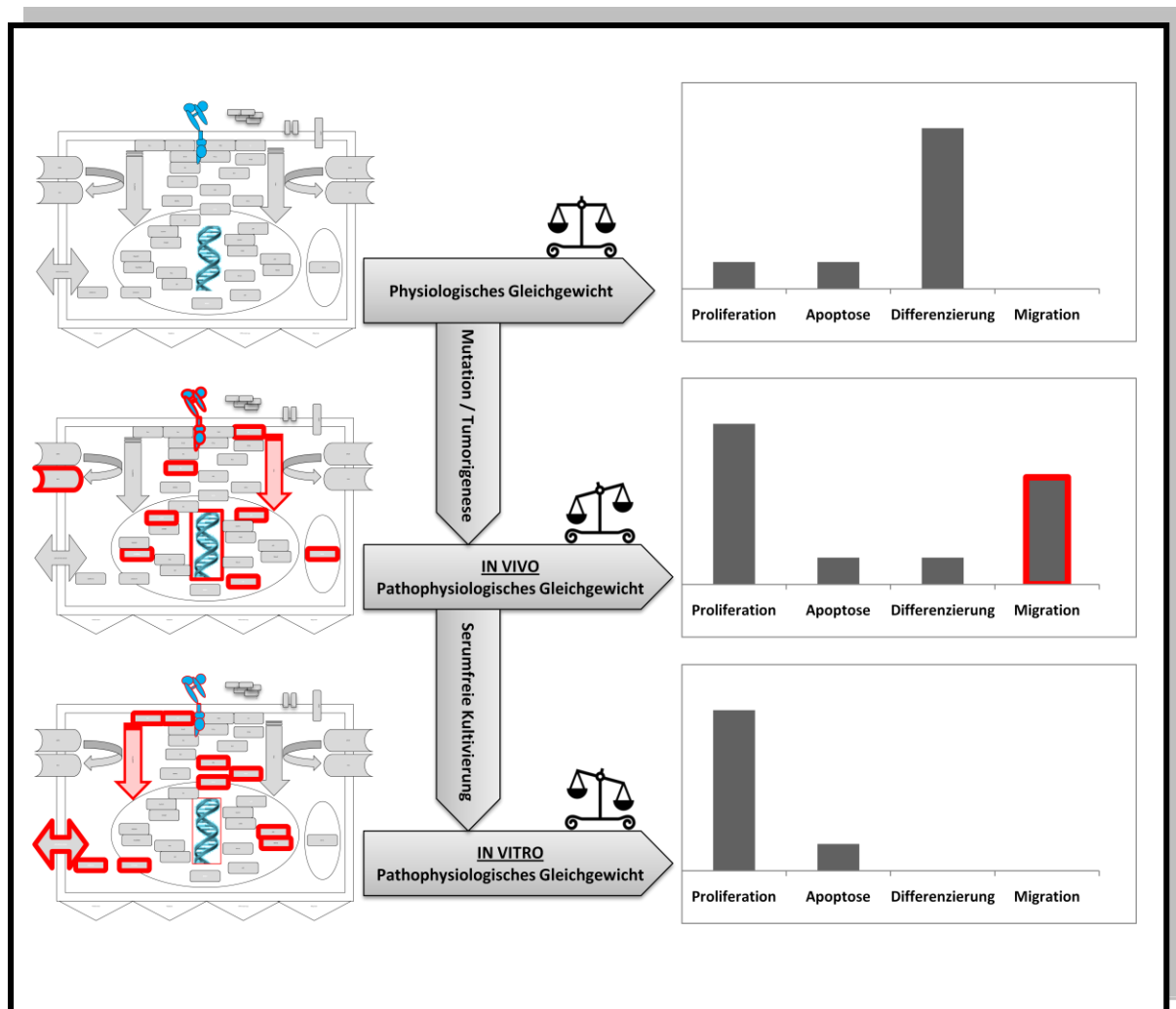


Abbildung 4.2.B: Schematische Darstellung der Ausbildung eines vermuteten pathophysiologischen Gleichgewichts. Mittlere Spalte von oben nach unten: Das pathophysiologische Gleichgewicht, welches sich aus einem physiologischen Zustand heraus (Waage im Gleichgewicht) zunächst während der Tumorigenese *in vivo* neu einstellt (Waage in einem Ungleichgewicht), um unter der serumfreien Zellkultur aufgrund der veränderten Mikroumgebung der Zellen wiederum verändert zu werden (Waage im anderen Ungleichgewicht). Links: Die Symbole folgen Abbildung 4.2.A, EGFR-Protein und EGFR-Gen sind blau markiert, die rote Umrandung zeigt eine Veränderung einzelner Komponenten an, ohne dabei spezifisch die in Abbildung 4.2.A an gleicher Stelle positionierten Proteine bezeichnen zu wollen. Rechts: Verhältnismässige Darstellung der Ausprägung der ebenfalls in Abbildung 4.2.A eingeführten zellulären Reaktionen. Obere Zeile: Während im physiologischen Zustand keine pathologische Veränderung der Komponenten (links) zu erkennen ist, zeigen sich die meisten Zellen als ausdifferenziert (rechts). Mittlere Zeile: Bei der Tumorigenese *in vivo* erfolgt nun durch Mutationen eine pathologische Veränderung vielfältiger Komponenten, auch des EGFR-Gens, dessen Amplifikation und vermehrte Rezeptorproteinexpression durch dicke rote Umrandung (links) gekennzeichnet ist, woraufhin eine verstärkte Proliferation und Migration der Zellen (rechts) ermöglicht wird. Untere Zeile: Unter Serumfreien Kulturbedingungen stellt sich *in vitro* nun ein verändertes pathophysiologisches Gleichgewicht ein, bei dem möglicherweise ganz andere Komponenten der intrazellulären Regulation durch Mutationen betroffen sind (links), die unter anderem nunmehr die *in vivo* eher kontraproduktive Zelladhäsion fördern (Doppelpfeil rot umrandet links unten), um eine kontinuierliche Proliferation sicherzustellen (rechts unten fehlt die Migrationsfähigkeit, die *in vivo* einen Selektionsvorteil bot – Mitte rechts rot umrandet). Dabei reduziert sich die EGFR-Amplifikation und Expression des Proteins (schwache rote Umrandung links unten).

Bis auf die beiden Kulturen aus GB-03 zeigten die Langzeitzellkulturen aller anderen Glioblastome eine Reduktion des für die EGFR-Genamplifikation gemessenen Wertes unter den gewählten in vitro Bedingungen, welche jedoch recht unterschiedlich ausgeprägt war. Wurde er bei GB-02 unter Entzug des Wachstumsfaktors EGF halbiert, so zeigte sich bei anderen mGS-Kulturen aus diesem Tumor unter Zugabe von unterschiedlichen Mengen an EGF nach längerer Kultivierungszeit ein Ergebnis nahe Null, wohingegen bei den beiden ursprünglich stärker amplifizierten Glioblastomen GB-10 und GB-15 unabhängig von der Zugabe einer bestimmten Menge an EGF jeweils eine etwa gleich hohe Restamplifikation in Höhe von ca. 25% des Ausgangswertes zu beobachten war. Diese Restamplifikation der mGS-Kulturen von GB-10 und GB-15 zeigte sich auch zu beiden untersuchten Zeitpunkten einer frühen und einer späten Passage mit einem etwa gleich hohen Wert, was vermuten lässt, daß sich diese EGFR-Genkopienzahl eher früh unter der veränderten in vitro-Mikroumgebung einstellt, und dann während der Expansion relativ unverändert bleibt. Bei dem nur schwach amplifizierten Glioblastom GB-22 erfolgte eine totale Reduktion der Amplifikation, ebenfalls ohne Zusammenhang mit der Zugabe einer bestimmten Menge an EGF. Betrachtet man nun all diese Ergebnisse in Kombination mit der Tatsache, daß die zwecks einer Kontrolle bezüglich des direkten Einflusses der Kulturbedingungen untersuchten mGS-Kulturen aus GB-11, GB-18 und GB-19, welche im Ursprungstumor keine EGFR-Genamplifikation zeigten, sich auch unter in vitro Bedingungen sowohl bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des Wachstumsfaktors EGF als auch ohne Zusatz dieses Faktors unverändert darstellten, läßt sich folgendes feststellen: Die EGFR-Genamplifikation, welche in vivo den Tumorzellen einen deutlichen Vorteil bringt, scheint unter den bisher zur serumfreien und stammzellähnlichen Kultivierung verwendeten Bedingungen keinerlei Selektionsvorteile zu bieten, was letztlich in der Reduktion der EGFR-Genkopienzahl über den Expansionszeitraum resultiert (*Okada et al., 2003*). Dabei scheint die Zugabe des Wachstumsfaktors EGF kaum eine Rolle zu spielen, dies scheint eher die Reduzierung zu verstärken.

Ein wichtiger Grund könnte der folgende sein: Immer wieder wurde beschrieben, daß die unterschiedlichen Bereiche des Glioblastoms, vor allem das solide und eher hypoxische Zentrum einerseits und die invasiven hochinfiltrativ wachsenden Randbereiche andererseits bezüglich des EGFR-Gens verschieden stark amplifizierte Tumorzellen enthalten (*Sauter et al., 1996; Nafe et al., 2004*). Wahrscheinlich spielt gerade für die Invasion des umliegenden Gewebes, die insbesondere durch verstärkte Interaktion mit der Extrazellulären Matrix und neu erworbene migratorische Eigenschaften der Tumorzellen, hier insbesondere der Hirntumorstammzellen erreicht wird, der EGFR eine entscheidende Rolle, da er über den PI3K- oder MAPK-Signalweg unter anderem Einfluß nimmt auf hierfür notwendige Komponenten wie Thrombin oder Integrine sowie den wnt/ β -Catenin-Weg (*Kumar et al., 1998; Porter und Vaillancourt et al., 1998; Prenzel et al., 1999*). Somit wird deutlich – grafisch vereinfacht in Abbildung 4.2.C dargestellt –, warum die Amplifikation und damit verbundene Überexpression des EGFR-Gens in vivo einen Vorteil bezüglich der Migration und Invasion bietet, genauso jedoch, warum sie in vitro nicht mehr notwendig scheint, da hier die Mikroumgebung der Tumorzellen eine völlig andersartige ist, und gerade eine die Zelladhäsion vermindernde Eigenschaft (siehe 1.5.2) nur kontraproduktiv sein kann, denn das sphärische Wachstum in der Umgebung jeweils möglichst vieler Zellen bedeutet in vitro zweifelsohne den größeren Selektionsvorteil (vergleiche auch 4.1 und Abbildung 4.1.B).

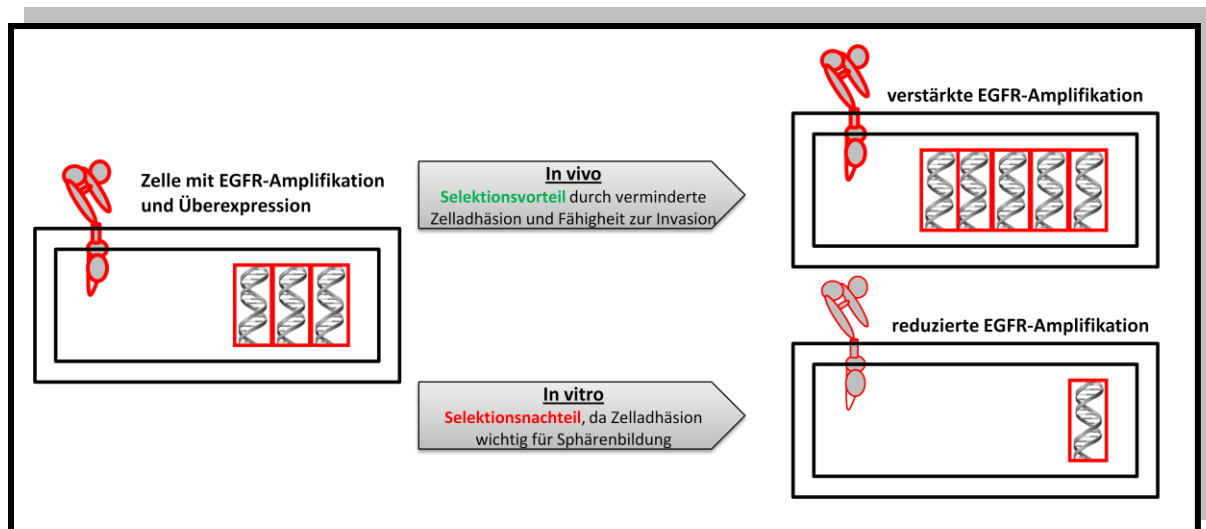


Abbildung 4.2.C: Vereinfachte Darstellung der vermuteten Selektionsvor- und Nachteile der EGFR-Amplifikation und entsprechend verstärkten Proteinexpression. Die Symbolik folgt den bisherigen Abbildungen. Die EGFR-vermittelte verminderte Zelladhäsion als Voraussetzung für die Invasion bietet in vivo einen Selektionsvorteil, während sie in vitro einen Selektionsnachteil darstellt, da für die Sphärenbildung die interzelluläre Adhäsion wichtig ist. Daher reagiert die Zelle entsprechend mit Reduzierung oder Erhöhung der EGFR-Genkopienzahl, was eine entsprechende Auswirkung auf die Expression des Rezeptorproteins an der Zelloberfläche hat.

Warum aber hat nun die Zugabe von EGF einen scheinbar verstärkenden Effekt auf den Rückgang der Amplifikation? Geht man von dem Vorhandensein der ebenfalls häufig und detailliert für Glioblastome beschriebenen autokrinen Loops aus (Nister et al., 1988; Tang, Steck, und Yung et al., 1997), so könnte man dies wie folgt interpretieren: Um in vitro den optimalen Selektionsvorteil durch ein bestimmtes integriertes EGFR Signal (siehe 1.4 und 1.5.1) zu erreichen, muss die Kopienzahl auf ein bestimmtes Maß reduziert werden, welches jedoch nicht nur vom Level der Rezeptorexpression abhängt, sondern gleichermaßen von der bei autokrinen Loops vorhandenen Liganden-überexpression (Yung et al., 1990; Schlegel et al., 1990; Mishima et al., 1998; Nicholas et al., 2006). Der künstliche Zusatz eines Liganden für den EGFR, in diesem Falle EGF würde dieses Gleichgewicht in Richtung weniger für das integrierte Signal notwendiger Rezeptoren verschieben, so daß die Amplifikation durch natürliche Selektion weiter verringert würde. Hierbei müsste natürlich auch ein eventuell vorhandener Einfluß des zugegebenen Liganden auf die schon vorhandene Expression von Liganden durch die Tumorzellen berücksichtigt werden, ein solcher negativer Feedback-Loop ist jedoch bisher nach Kenntnisstand des Autors nicht beschrieben. Die Abbildung 4.2.D mag der Ansatz einer mathematischen Beschreibung solch eines integrierten EGFR-Signals sein.

Die Feststellung bei den Glioblastomen GB-10 und GB-15, die im Ursprungstumorgewebe etwa doppelt bis zehnmals stärker amplifiziert sind als GB-02, GB-03 und GB-22, daß mit zunehmendem Ausgangsniveau der Amplifikation deren Reduktion unter in vitro Bedingungen nicht mehr vollständig vollzogen wird, könnte auf die unterschiedliche Lokalisation der EGFR-Amplifikons zurückzuführen sein. Da diese zum einen direkt auf dem das wt-EGFR-Gen enthaltenen Chromosom 7 zu finden sind, als auch in den extrachromosomalen „double minutes“ (Vogt et al., 2004), könnte eine höhere Kopienzahl sich im Verlauf auch verstärkt innerhalb des Chromosoms 7 finden, welche dort bei der Mitose der Tumorzellen seltener einer genetischen Alteration unterliegen, welche zur Deletion der Amplifikons führen würde, als daß sie in Form extrachromosomaler Abschnitte innerhalb der „double

minutes“ aufgrund der fehlenden Centromere nicht gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben werden.

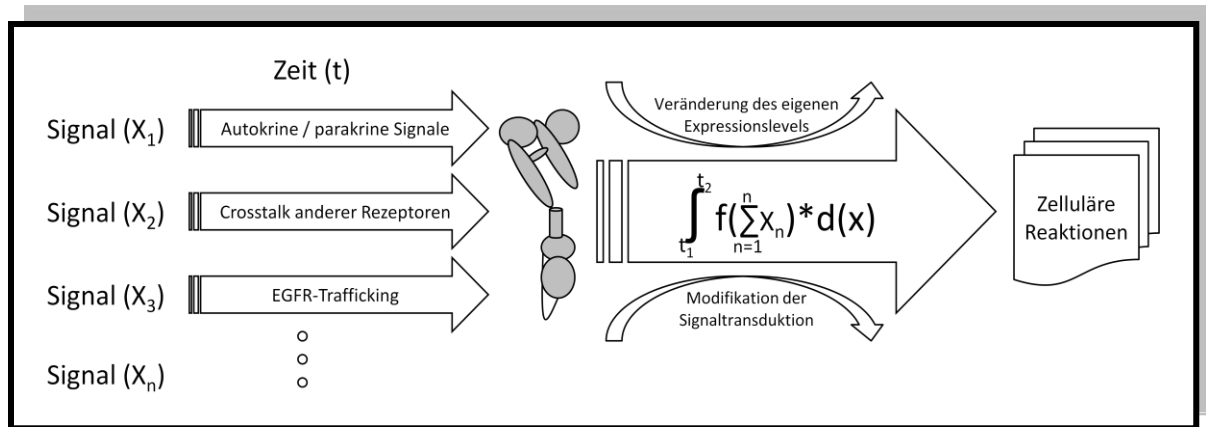


Abbildung 4.2.D: Mathematischer Ansatz einer Beschreibung des integrierten EGFR-Signals. Verschiedene Signale X_n (links) wirken über einen Zeitraum t (oben links) auf den EGF-Rezeptor (graues Symbol mitte) ein. Der EGFR integriert dann über einen Zeitraum t_1 bis t_2 die Summe aller Signale X_n (großer Pfeil). Zusätzlichen Einfluß auf das Resultat dieser Signalintegration nehmen dann unter anderem die Veränderung des eigenen Expressionslevels, sowie eine zum Beispiel durch Mutationen erfolgte genetische Alteration anderer Komponenten der Signaltransduktion, welche diesen Prozess zusätzlich modifiziert (runde Pfeile oben und unten). Das Ergebnis spiegeln dann die verschiedenen zellulären Reaktionen wieder (rechts).

Darüberhinaus ließen sich sicher noch vielfache andere Gründe für diese unter in vitro Bedingungen beobachtete EGFR-Genamplifikationsveränderung anführen, der Versuch der vollständigen Beschreibung aller Zusammenhänge würde jedoch sicher den Rahmen dieser medizinischen Dissertation sprengen. Daher soll hier nur noch auf einen weiteren wichtigen Zusammenhang eingegangen werden, der nicht nur die Reduktion sondern genauso die Verstärkung der Amplifikation bei den beiden mGS-Kulturen aus GB-03 erklären könnte.

Wir beobachten bei GB-03 nicht nur ein Aufrechterhalten des im Ursprungstumor vorhandenen Wertes einer 15 fachen Amplifikation, sondern unter Verzicht auf den Wachstumsfaktor EGF sogar eine Verstärkung auf das 68 fache, mithin um mehr als das Vierfache. Während hingegen bei Zugabe einer Konzentration von 5 ng/ml EGF die Amplifikation gegen Null tendiert, bleibt das Ergebnis bei Zugabe von 10 ng/ml EGF über den Untersuchungszeitraum relativ konstant. Da die mGS-Kulturen aus GB-03 den gleichen Selektionsvor- und Nachteilen in vitro unterliegen wie auch alle anderen Zellkulturen könnte hier die Ursache für die zunehmende Amplifikation des EGFR-Gens die folgende sein: Wie bereits unter 1.5 ausführlich beschrieben nimmt das durch den EGFR vermittelte integrierte Signal Einfluß auf viele verschiedene Komponenten unter anderem der Regulation von p53, aber auch anderer, den Zellzyklus regulierender Proteine, und damit auf einen wesentlichen der das Überleben der Zelle sichernden Faktoren (Besson und Yong et al., 2001; Oda et al., 2005; Ohgaki und Kleihues et al., 2007). P53 unterliegt wiederum der Kontrolle von Mdm2 und viele der die Transition von der G1 zur S-Phase mittels des pRb-Proteins steuernden Cyclin/CDK-Komplexe werden durch spezifische Inhibitoren, zum Beispiel den Produkten von Genen der INK4a/ARF-Familie wie p16/ink4a oder p14/arf reguliert (vergleiche auch Abbildung 4.2.A). Nun finden sich für fast alle dieser soeben genannten Proteine und Gene auch genetische Alterationen, welche in Astrozytomen

unterschiedlicher Malignität beschrieben wurden, so zum Beispiel Amplifikationen von MDM2 und CDK4 oder Mutationen beziehungsweise Deletionen von P14/ARF, P16/INK4A und RB1. Interessanterweise wurde aber auch beobachtet, daß einige dieser Veränderungen der einzelnen Gene und damit verbundenen unterschiedlichen Proteinexpressionen eher selten zusammen auftreten, dies konnte gezeigt werden für Mutationen von P14/ARF, MDM2 und P53 sowie für CDK4, P16/INK4A und RB1 (*Reifenberger et al., 1993; Schmidt et al., 1994; Reifenberger et al., 1994; Collins et al., 1995; He, Olson, und James et al., 1995; Reifenberger et al., 1996; Ichimura et al., 1996; Biernat et al., 1997a; Biernat et al., 1997b; Burns et al., 1998; Ichimura et al., 2000*).

Dies zusammen mit der Beobachtung, daß die EGFR-Genamplifikation in fast allen Fällen reduziert wird, könnte bedeuten, daß in der überwiegenden Zahl der Glioblastome, bei denen eine Kultivierung unter serumfreien Bedingungen versucht wurde, die genetischen Alterationen in den eben genannten Bereichen der Zellzykluskontrolle ausreichend sind, die Proliferation unter in vitro Bedingungen sicher zu stellen, so daß das EGFR-Signal, welches nicht nur der Proliferation dient, sondern daneben auch andere für diese in vitro Bedingungen eher kontraproduktiven Signale vermittelt, durch Verringerung des Amplifikationslevels reduziert werden kann, wohingegen bei den mGS-Kulturen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10) eine andere jedoch seltene Situation gegeben ist: Hier könnte durch spezifische Mutationen in den genannten Zellzyklus-Komponenten ein Fall eingetreten sein, der unter in vitro Bedingungen für eine weitere Proliferation ein verstärktes EGFR-Signal zwingend benötigt, so daß hier die Sicherstellung der weiteren Proliferation gegenüber dem Nachteil eventueller nicht benötigter Effekte des EGFR-Signals bei der natürlichen Selektion überwiegt, und daher Zellen, die das EGFR-Gen weiter amplifizieren begünstigt werden. Dazu würde auch die Beobachtung passen, daß bei Zugabe des Wachstumsfaktors EGF die Amplifikation nicht verstärkt sondern nur aufrecht erhalten wird, da die Zugabe von EGF den Wachstumsvorteil bieten könnte, der sonst nur durch zusätzliche Genkopien erreicht werden kann. Die Abbildung 4.2.E soll dies verdeutlichen, wobei sie das in der Abbildung 4.2.B eingeführte Schema eines pathophysiologischen Gleichgewichts mit einbezieht.

Nicht einzuordnen ist hingegen die totale Reduktion der Amplifikation bei einer EGF-Zugabe von 5 ng/ml, was seine Ursache nach Ansicht des Autors am ehesten in einer frühen zufälligen Mutation dieser mGS-Kultur findet, die das sonst bei GB-03 vorgefundene pathophysiologische Gleichgewicht zum Vorteil des EGFR-Signals wieder zugunsten einer normalerweise stattfindenden Selektion auf die Reduzierung der EGFR-Genamplifikation verschiebt.

Obwohl die EGFR-Genamplifikation kennzeichnend für primäre Glioblastome ist (*Ohgaki und Kleihues et al., 2007*), könnte vermutet werden, daß aufgrund dieses seltenen Sonderfalls bei weiteren molekulargenetischen Analysen das ursprünglich als primär klassifizierte Glioblastom GB-03 doch eine – ebenfalls eher seltene – sekundäre Entstehungsgeschichte haben könnte, mit einer ursprünglichen klinisch unauffälligen Präkursorläsion, nicht zuletzt aufgrund der Ergebnisse bezüglich des Differenzierungspotentials, wie im nächsten Teil noch detaillierter zu sehen sein wird. Aufschluß über diese Hypothesen könnte sicher eine genauere Untersuchung von GB-03 bezogen auf sämtliche genetischen Alterationen geben, die in dem Ursprungstumorgewebe sowie in den daraus abgeleiteten 3 verschiedenen mGS-Kulturen vorhanden sind, sowie eine weitere Analyse bezüglich einer eventuell vorhandenen EGFR-Mutation, welche mit dem wt-EGFR koamplifiziert wird.

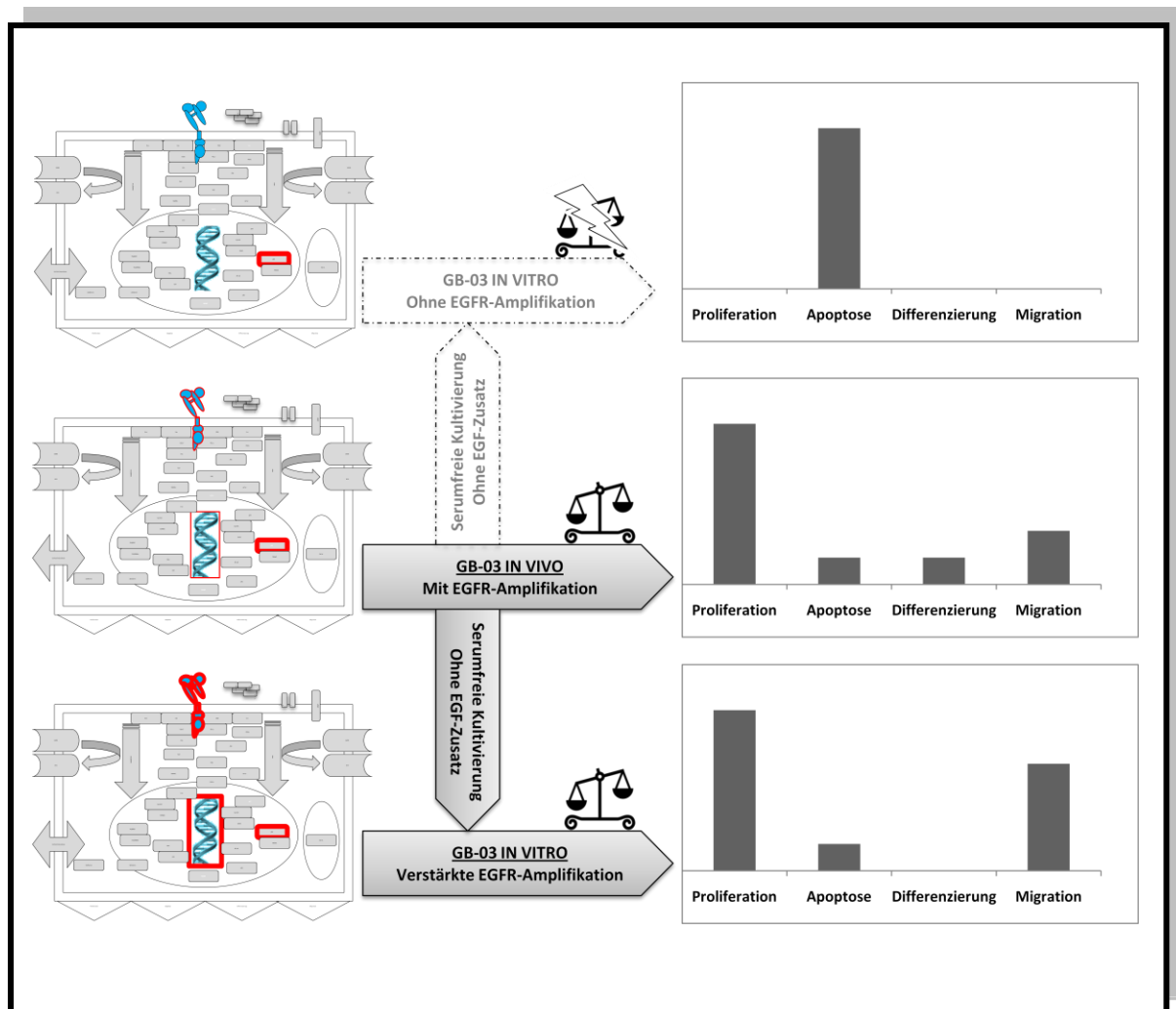


Abbildung 4.2.E: Schematische Darstellung der Ausbildung eines vermuteten pathophysiologischen Gleichgewichts im besonderen Fall von GB-03. Mittlere Spalte von der mittleren Zeile ausgehend: Das pathophysiologische Gleichgewicht, welches sich während der Tumorigenese in vivo eingestellt hat (Waage in einem Ungleichgewicht) kann nur mithilfe des durch Gen-Amplifikation verstärkten EGFR-Signals unter in vitro Bedingungen die Proliferation aufrecht erhalten (Pfeil nach unten), ohne diese Amplifikation würden die Zellkulturen absterben (oben). Links: Die Symbole folgen Abbildung 4.2.A, EGFR-Protein und EGFR-Gen sind blau markiert, die rote Umrandung zeigt eine Veränderung einzelner Komponenten an, ohne dabei spezifisch die in Abbildung 4.2.A an gleicher Stelle positionierten Proteine bezeichnen zu wollen. Rechts: Verhältnismässige Darstellung der Ausprägung der ebenfalls in Abbildung 4.2.A eingeführten zellulären Reaktionen. Mittlere Zeile: Durch möglicherweise fehlende andere Mutationen im Bereich der Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle und Regulation (links nur wenige rote Markierungen) stellt die Tumorzelle in vivo Proliferation und Migration durch EGFR-Amplifikation und verstärkte Rezeptorproteinexpression (links rote Markierung) sicher. Obere Zeile: Hypothetischer Fall bei Reduzierung der EGFR-Genamplifikation mit diesen Voraussetzungen unter Entzug des Wachstumsfaktors EGF während der Kultivierung: Die Zelle hätte keine Möglichkeit mehr, die weitere Proliferation in vitro aufrecht zu erhalten, und die Zellkulturen würden absterben. Untere Zeile: Lediglich eine Verstärkung der EGFR-Genamplifikation (dicke rote Umrandung links unten) während der Zellkultur kann die weitere Proliferation ohne EGF sicherstellen, hierbei wird deswegen die sonst ebenfalls durch den EGFR vermittelte in vitro jedoch eher kontraproduktive verstärkte Migrationsfähigkeit (rechts unten) in Kauf genommen.

4.3. GB-03: Hirntumorstammzellen mit EGFR-Genamplifikation ?

Nachdem sich am Ende des Untersuchungszeitraumes die beiden mGS-Kulturen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10) als die beiden einzigen gezeigt hatten, die nach wie vor den ursprünglichen Wert der EGFR-Genamplifikation aufwiesen, sollten nun die für Hirntumorstammzellkulturen beschriebenen charakteristischen Merkmale untersucht werden, um eine Einschätzung geben zu können, inwieweit diese Eigenschaften bei allen mGS-Kulturen aus GB-03 noch ausgeprägt waren. Desweiteren sollte mithilfe der FISH-Analyse die Lokalisation der EGFR-Amplikons geklärt werden, gerade im Vergleich zwischen der Kultur, die ohne Zusatz des Wachstumsfaktors EGF kultiviert wurde, und der Kultur, welche einen Zusatz von 10 ng/ml EGF erhalten hatte. Ausgehend von den für Stammzellen beschriebenen notwendigen Eigenschaften wie ihre Fähigkeit zur kontinuierlichen Selbsterneuerung sowie die Möglichkeit, sie aus ihrem undifferenzierten multipotenten Status in einen differenzierten Zustand zu versetzen (*Weiner et al., 2008*), zeichnen sich durch die bisherigen Beobachtungen die Hirntumorstammzellen neben einer ebenfalls vorhandenen stetigen Proliferation vor allem durch eine relative Differenzierungsresistenz aus, wie auch die Befähigung, einen xenotransplantierten Tumor in vivo zu generieren (*Singh et al., 2004; Martens et al., 2006; Zhang et al., 2006a; Gunther et al., 2008*).

Eine kontinuierliche Selbsterneuerung hatten alle mGS-Kulturen aus GB-03 bereits dadurch gezeigt, daß sie sowohl während als auch nach dem Ende des Untersuchungszeitraumes stabil expandiert und somit als Langzeitkultur etabliert werden konnten, unabhängig von der Menge der Zugabe des Wachstumsfaktors EGF. Im Weiteren wurden trotz der herausragenden Bedeutung der Kultur, die ohne Zugabe von EGF gewachsen war und ihre Amplifikation verstärkt hatte, auch die anderen beiden Kulturen, welche mit 5 und 10 ng/ml EGF kultiviert worden waren, im Vergleich untersucht. Die zunächst durchgeführte Proliferationskinetik aller 3 Kulturen zeigte ein interessantes Resultat, hier konnte man bei allen Zellkulturen unabhängig von der Zugabe an EGF eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit beobachten, lediglich GB-03/EGF(5) zeigte ein geringfügig langsames Wachstum, was zu der unter 4.2 gestellten Vermutung passt, daß sich diese Kultur von den beiden mit EGFR-Genamplifikation im Verlauf der Kultivierungsdauer durch zusätzliche Mutationen in ihren Eigenschaften separiert hat. Diese Fähigkeit zur kontinuierlichen Proliferation könnte ein erster Hinweis auf das Vorhandensein von Hirntumorstammzellen sein.

Um das Potential der Differenzierungsfähigkeit festzustellen wurde ein Ansatz gewählt, mit dem neben Zugabe von Serum (FCS) vor allem Retinsäure und cAMP eine Reaktion der Zellen bewirken sollten. Retinsäure ist ein wichtiger Faktor in der Embryogenese, während deren sie die Entwicklung des neuronalen Anteils des Ektoderms steuert, aber auch in vitro wurde ihre Fähigkeit zur Induktion der neuronalen oder astrozytären Differenzierung gezeigt (*Jones-Villeneuve et al., 1982; Jones-Villeneuve et al., 1983; van Inzen et al., 1996; Gilbert et al., 2000; Das, Banik, und Ray et al., 2008*). Hingegen ist cAMP ein entscheidender Faktor bei der oligodendrozytären Differenzierung, die er einerseits induziert, aber auch gleichzeitig die weitere Proliferation der Progenitoren dieser Richtung inhibiert (*Raible und McMorris et al., 1993*). Durch die Analyse verschiedener molekularer Marker sollte dann eine Aussage über Stammzeleigenschaften sowie das noch vorhandene Differenzierungspotential getroffen werden. Hierbei wurden als Marker für Stammzellen das Intermediärfilament Nestin und der Transkriptionsfaktor SOX-2 verwendet, als neuronale Marker das Intermediärfilament NF (Neurofilament) sowie das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP-2, und als Marker für Astrozyten und Oligodendrozyten GFAP (Saures Gliafaser-Protein) sowie GalC (Galaktocerebrosidase C) respektive

(Sato, Tai, und Kim et al., 1996; Eng, Ghirnikar, und Lee et al., 2000; Long et al., 2005; Dell'Albani et al., 2008). Die Differenzierung wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen durchgeführt.

Bezugnehmend auf die Ergebnisse aus 3.5.3 insbesondere der Zusammenfassung kann man festhalten, daß alle 3 mGS-Kulturen von GB-03 durch die Ausprägung der Stammzeleigenschaften kennzeichnenden Marker Nestin und SOX-2 bei mindestens $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ der Zellen einer Population zunächst durch die unverminderte Expression von Nestin unter Differenzierungsbedingungen eine gewisse Resistenz gegenüber einer weitergehenden Ausdifferenzierung zeigten, SOX-2 hingegen folgt diesem Verhalten nicht. MAP-2 und NF wiederum bestätigten diesen Widerstand, da über den Zeitraum von 6 Tagen nach Differenzierungsinduktion keine Erhöhung der Zahl der für diese Marker als positiv gemessenen Zellen zu beobachten war, und somit eine stärkere neuronale Differenzierung als eher unwahrscheinlich betrachtet werden mußte. Relativ einheitlich bei allen drei mGS-Kulturen aus GB-03 stellte sich auch die starke oligodendrozytäre Vordifferenzierung dar, die ebenfalls keinerlei erkennbare Veränderung ihrer Ausprägung während der Differenzierung erfuhr, insofern folglich auch hier keine weitergehende Ausreifung induziert werden konnte. Einzig der Marker GFAP separierte bei diesen Untersuchungen die mGS-Kultur GB-03/EGF(5) von den beiden anderen Kulturen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10), indem zwar bei allen dreien dessen Expression vor Beginn der Differenzierung kaum feststellbar war, jedoch im weiteren Verlauf nach 4 Tagen durch mehr als 50% positiv beurteilter Zellen stark anstieg, nach 6 Tagen hingegen nur bei GB-03/EGF(5) auf diesem Niveau erhalten blieb, und bei den anderen beiden Zellkulturen deutlich abfiel. Indes ist die Beurteilung von GFAP nicht ganz einfach, da er sowohl reife Astrozyten als auch neurale Stammzellen markieren kann (Kimmelberg et al., 2004; Roelofs et al., 2005; Liu et al., 2006), so daß nur bei angenommener letzterer Eigenschaft von einer Differenzierungsresistenz gesprochen werden könnte. Übergreifend ist erneut anzumerken, daß wie die anderen Merkmale zuvor auch das Differenzierungspotential unabhängig von der zugegebenen EGF-Konzentration erkennbar war.

Berücksichtigt man das heutige Verständnis der Neurogenese, bei der sich aus neuronalen Stammzellen zunächst neurale und gliale Progenitoren entwickeln, die in der Folge aus der neuronalen Linie Neuronen bilden und aus der glialen Astrozyten und Oligodendrozyten (Ming und Song et al., 2005; Emsley et al., 2005; Kempermann et al., 2011), läßt dies folgenden Schluß zu: Bei allen 3 mGS-Kulturen von GB-03 sehen wir wahrscheinlich eine Mischpopulation aus neuronalen und oligodendrozytären Progenitorzellen, mit einem Schwerpunkt der oligodendrozytären Richtung. Da insgesamt betrachtet durch die Mehrheit der Ergebnisse nahegelegt wird, daß sowohl GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10) als auch GB-03/EGF(5) allen Differenzierungsversuchen Widerstand entgegengesetzt haben, deutet einiges darauf hin, daß in allen mGS-Kulturen von GB-03 Hirntumorstammzellen vorhanden sind, die eventuell die Grundlage der Zellkultur bilden, und die im Zustand durch Mutationen veränderter neuraler und glialer Progenitoren der Differenzierung widerstanden, und damit den von (Gunther et al., 2008) beschriebenen Tumorstammzellkulturen mit eingeschränktem Stammzell-Phänotyp ähneln könnten. Daneben steht die beobachtete relativ stark ausgeprägte oligodendrozytäre Komponente dieser Zellkulturen im Einklang mit der unter 4.2 aufgestellten Hypothese, es könnte sich hierbei um ein sekundäres Glioblastom handeln, da dieses Merkmal als für die Pathogenese dieses Tumortyps charakteristisch beschrieben worden ist (Homma et al., 2006).

Ein weiteres wesentliches Kriterium für den Nachweis von Hirntumorstammzellen ist ihre Tumorigenität in vivo. Daher wurden von allen 3 mGS-Kulturen des Glioblastoms GB-03 jeweils eine

Xenotransplantation von ca. 1000 Zellen in das Gehirn von athymischen und damit immunsupprimierten Nacktmäusen vorgenommen, um deren Fähigkeit in vivo einen Tumor zu generieren zu überprüfen. Bei den Tieren, die eine intrakranielle Injektion von Zellen aus der mGS-Kultur GB-03/EGF(0) erhalten hatten, konnte dies bereits nach einem Zeitraum von 4 Monaten vermutet werden, da alle Mäuse deutliche klinische Symptome zeigten. Die anschließende histopathologische Untersuchung bestätigte das Ausbilden eines jeweils diffus und hochinfiltrativ wachsenden Tumors, der bereits das gesamte Prosencephalon erfaßt hatte. Die Gehirne der Tiere, die Zellen aus den beiden mGS-Kulturen GB-03/EGF(5) und GB-03/EGF(10) erhalten hatten, und zum selben Zeitpunkt präpariert wurden, ließen demgegenüber keinen Hinweis auf die Tumorinduktion in vivo erkennen. Übereinstimmend mit bisherigen Beobachtungen bei dieser Art der serumfreien Kultur zeigte sich auch hier eine Morphologie des Tumorwachstums, die der von menschlichen Glioblastomen, die ebenfalls diffus das Hirnparenchym infiltrieren, sehr viel näher kommt (*Louis et al., 2007*). Bisherige Xenotransplantationen aus Glioblastom-Zellkulturen, die unter Serum-Bedingungen wuchsen, zeigten kein solch diffuses Wachstum. Daher spricht dieses Resultat zum einen für die Existenz von Hirntumorstammzellen zumindest in GB-03/EGF(0) zum anderen jedoch erneut für einen Unterschied dieser mGS-Kultur zu den beiden anderen GB-03/EGF(5) und GB-03/EGF(10).

Weiteren Aufschluß über die Lokalisation und Verteilung der Amplifikation pro Zelle gab die FISH-Analyse. Anhand der so markierten EGFR-Genkopien konnte deren räumliche Verteilung besser zugeordnet werden, dies erschien sinnvoll, da die Messung des Amplifikationslevels mithilfe der Real-Time-PCR letztendlich nur eine Aussage über die gesamte Menge der Amplikons in einer größeren Zellpopulation geben konnte. Hierbei zeigte sich zum einen bestätigt, daß die Großzahl der Amplikons in punktuell markierten extrachromosomalen Strukturen innerhalb der Kerne vorliegt, da stärker homogen gefärbte chromosomale Banden fehlten (*Vogt et al., 2004*). Darüberhinaus konnte allerdings gezeigt werden, daß der Amplifikationslevel pro Zelle in allen mGS-Kulturen eher vergleichbar war, und daß es bei GB-03/EGF(0) gegenüber GB-03/EGF(10) lediglich eine weitaus größere Zahl an Zellen mit dieser Ausprägung der Amplifikation gab, und welche bei GB-03/EGF(5) kaum noch zu finden waren. Somit scheint der bei der Real-Time-PCR beobachtete Unterschied in der Stärke der Amplifikation nicht in unterschiedlich stark amplifizierten Zellen zu liegen, sondern vielmehr in der Zahl der Zellen, die eine Amplifikation des EGFR-Gens aufzeigen. Dies wäre nur ein weiterer Hinweis darauf, daß sich die beiden Kulturen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10) durchaus in dem vermuteten pathophysiologischen Gleichgewicht ähneln, die Zugabe von EGF jedoch bei GB-03/EGF(10) auch das Überleben anderer nicht oder nur wenig amplifizierter Zellen ermöglicht. Demgegenüber ist diese Beobachtung zumindest nicht widersprüchlich zu der angenommenen durch Mutation sich davon abgrenzenden mGS-Kultur GB-03/EGF(5).

Somit deuten doch mehr oder weniger alle Ergebnisse darauf hin, daß mit der Etablierung der mGS-Kulturen aus GB-03 als Langzeitkulturen, und hier insbesondere durch GB-03/EGF(0) eine Zellkultur gefunden wurde, die aufgrund einer eher seltenen Mutations-Konstellation Hirntumorstammzellen selektiert, welche ihre EGFR-Genamplifikation stabil aufrecht erhalten.

5. Ausblick

Immer mehr Hinweise bestätigen die Vermutung, daß die Entstehung maligner Neoplasien im Hirn wie auch in anderen menschlichen Geweben ein mehrstufiger Prozess ist, welcher klinisch unauffällig mit einer benignen Hyperplasie startet, und in einem invasiven und teils metastasierenden malignen Tumor endet. Fast immer beruht dies auf multifaktorieller Pathogenese durch mannigfaltige genetische Alterationen und nicht zu vernachlässigende epigenetische Mechanismen, wobei wir letztere gerade erst zu verstehen beginnen. Während dieses Prozesses erlangen die Tumorzellen neue Eigenschaften, welche für den malignen Phänotyp notwendig sind. Sie müssen proliferatives Potential bekommen, und sich kontinuierlich teilen, um dies zu erreichen, müssen sie die Kontaktinhibition sowie diverse andere Checkpunkte umgehen, die normalerweise die Apoptose induzieren würden. Darüberhinaus, um ein Wachstum über eine bestimmte Grenze hinaus zu erreichen, muß der Tumor seine Versorgung durch Sauerstoff und Nährstoffe mittels der Produktion neuer Gefäße sicherstellen. Der finale Schritt ist, daß die Tumorzellen ihren primären Entstehungsort verlassen, um an anderen Stellen Metastasen zu bilden, hierzu benötigen sie erneut zusätzliche Fähigkeiten zur Migration und Invasion fremden Gewebes (*Holbro, Civenni, und Hynes et al., 2003*). Und gerade in letzter Zeit deutet vieles darauf hin, daß es trotzdem nur eine kleine Population an Tumorstammzellen ist, die all diese Fähigkeiten vereint. Der EGFR aber auch jedes andere Mitglied der Erb-B-Familie spielt in jedem dieser beschriebenen Prozesse eine Rolle, was sie berechtigterweise zu einem wichtigen Forschungsschwerpunkt macht. Mit der Etablierung der mGS-Kultur GB-03/EGF(0) ist es wahrscheinlich gelungen, eine Hirntumorstammzellen enthaltene Langzeitkultur zu etablieren, welche mit der EGFR-Genamplifikation eines der Merkmale, das bei fast der Hälfte aller Glioblastome vorkommt und somit einen entscheidenden Selektionsvorteil in vivo bietet, auch unter in vitro Bedingungen stabil aufrecht erhält, und somit weitere Untersuchungen ermöglicht. Insbesondere die Feststellung eventueller Mutationsvarianten des EGFR bei allen drei mGS-Kulturen aus GB-03, wie zum Beispiel EGFRvIII wäre im nächsten Schritt sicher von Interesse, aber auch eine genauere Untersuchung der Kulturen bezüglich ihres Genexpressionsprofiles könnte Aufschluß darüber geben, was sie von allen anderen mGS-Kulturen verschiedener Glioblastome, die alle im Verlauf der Untersuchungen ihre Amplifikation reduziert haben, unterscheidet. Dies könnte letztendlich neue Hinweise darauf geben, ob es auch therapeutische Möglichkeiten gibt, die Bedingungen für die Tumorzellen in vivo so zu verändern, daß die durch das EGFR-Signal getriggerte maligne Progression des Glioblastoms in einem ersten Schritt zumindest verzögert werden kann.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde versucht, frisches, aus chirurgischen Resektionen gewonnenes Tumormaterial aus primären Glioblastomen in eine serumfreie Zellkultur zu übernehmen, in der nach stabiler Langzeitexpansion der Kulturen sowohl der Nachweis von Hirntumorstammzellen gelingt, als auch die EGFR-Genamplifikation der Tumorzellen erhalten bleibt, was bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht gelungen war. Dabei wurden die Zellkulturen jeweils mit unterschiedlichen Mengen des Wachstumsfaktors EGF versorgt, sowie auch gänzlich ohne diesen expandiert. Es zeigte sich, daß das Wachstum der Zellen nicht mit der Zugabe von EGF korreliert ist, sondern vielmehr die mGS-Kulturen eines bestimmten Glioblastoms unabhängig von der Wachstumsfaktorzugabe durch ein bestimmtes Wachstumsmuster sowie ein eher beschleunigtes oder verzögertes Wachstum phänotypisiert sind. Insgesamt konnte dies durch eine Dichotomie in 2 Gruppen dargestellt werden, die sich in ihrer Proliferation deutlich unterschieden. Für einen sichtbaren Beginn der Proliferation brauchten die mGS-Kulturen ohne Zugabe von EGF jeweils deutlich mehr Zeit, als alle anderen Zellkulturen. Über den Untersuchungszeitraum veränderte sich darüberhinaus auch die Wachstumsmorphologie, so daß der anfängliche Unterschied zwischen adhärentem, semi-adhärentem und nicht adhärentem Wachstum sich am Ende der Kultivierungszeit zugunsten eines nahezu einheitlich nicht adhärenen Wachstumsmusters gewandelt hatte. Lediglich $\frac{1}{3}$ der anfänglichen Kultivierungsversuche war über den langen Zeitraum erfolgreich, wobei nur zwei mGS-Kulturen aus einem einzigen Glioblastom ihre EGFR-Amplifikation aufrecht erhalten und sogar noch verstärkt hatten, namentlich GB-03/EGF(0) ohne Zusatz des Wachstumsfaktors EGF, hier hatte sich der Wert der Amplifikation sogar vervierfacht und GB-03/EGF(10), welche mit 10 ng/ml EGF kultiviert wurde, und eine Verdopplung des Ausgangswertes aufwies. Dabei ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer Zugabe des Wachstumsfaktors EGF und einem Verlust der EGFR-Genamplifikation ersehen, was eine entsprechend seltene Mutations-Konstellation bei diesen beiden mGS-Kulturen aus GB-03 nahelegt. Methodisch zeigte sich die Analyse der Amplifikation mithilfe der Real-Time-PCR der konventionellen PCR überlegen, mit der auch eine quantitative Analyse der Zahl der Amplikons möglich wurde. Bei dieser Arbeit zeigten sich 23% der untersuchten Glioblastome als amplifiziert, geringfügig weniger, als in der Literatur beschrieben wird. Die nähere Untersuchung der mGS-Kulturen aus GB-03 bestätigte dann sowohl durch ihre kontinuierliche Proliferation als auch ihre relative Differenzierungsresistenz bei allen dieser drei Zellkulturen die vermutete Anwesenheit von Hirntumorstammzellen, wobei GB-03/EGF(5) sich in allen untersuchten Merkmalen von den beiden anderen Kulturen GB-03/EGF(0) und GB-03/EGF(10) ein wenig unterschied, am deutlichsten jedoch bei der Fähigkeit, einen Tumor in vivo zu generieren. In dem gewählten Mausmodell konnte nur GB-03/EGF(0) als tumorigen beurteilt werden, indem sie in allen Tieren einen das gesamte Hirngewebe diffus infiltrierenden Tumor ausbildete, ähnlich der Morphologie beim menschlichen Glioblastom. Eine recht starke bereits vor dem Differenzierungsversuch ausgeprägte oligodendrozytäre Vordifferenzierung könnte dabei ein Hinweis auf die Pathogenese dieses Tumors als sekundäres Glioblastom sein. Durch eine FISH-Analyse zeigte sich, daß die vorhandene EGFR-Genamplifikation einzelner Zellen als eher gleichmäßig zu beurteilen ist, und daß die quantitativen Unterschiede aus der Real-Time PCR-Messung wahrscheinlich eher aufgrund einer durch EGF-Zugabe mehr oder minder starken Population relativ gleichmäßig amplifizierter Zellen zustande kommt. Damit wurde erfreulicherweise das Ziel dieser Arbeit erreicht, und die nun vorhandene Langzeitkultur GB-03/EGF(0) eröffnet hoffentlich viele neue Möglichkeiten, wichtige Erkenntnisse über die Pathophysiologie des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors zu erlangen, dessen integriertes Signal eine solch überragende Bedeutung in der inter- und intrazellulären Kommunikation zu haben scheint.

7. Literatur

Reference List

1. **Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. / (2008) /** Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells / *Nat. Cell Biol.* / 10 / 619-624
2. **Alexander, A. / (1998) /** Endocytosis and intracellular sorting of receptor tyrosine kinases / *Front Biosci.* / 3 / d729-d738
3. **Anderson, R. G. / (1998) /** The caveolae membrane system / *Annu. Rev. Biochem.* / 67 / 199-225
4. **Arjona, D., Bello, M. J., Alonso, M. E., Aminoso, C., Isla, A., De Campos, J. M., Sarasa, J. L., Gutierrez, M., Villalobo, A., and Rey, J. A. / (2005) /** Molecular analysis of the EGFR gene in astrocytic gliomas: mRNA expression, quantitative-PCR analysis of non-homogeneous gene amplification and DNA sequence alterations / *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* / 31 / 384-394
5. **Arjona, D., Bello, M. J., and Rey, J. A. / (2006) /** EGFR intragenic loss and gene amplification in astrocytic gliomas / *Cancer Genet. Cytogenet.* / 164 / 39-43
6. **Arjona, D., Rey, J. A., and Taylor, S. M. / (2006) /** Early genetic changes involved in low-grade astrocytic tumor development / *Curr. Mol. Med.* / 6 / 645-650
7. **Barnes, D. W. / (1982) /** Epidermal growth factor inhibits growth of A431 human epidermoid carcinoma in serum-free cell culture / *J. Cell Biol.* / 93 / 1-4
8. **Batchelor, T. T., Betensky, R. A., Esposito, J. M., Pham, L. D., Dorfman, M. V., Piscatelli, N., Jhung, S., Rhee, D., and Louis, D. N. / (2004) /** Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma / *Clin. Cancer Res.* / 10 / 228-233
9. **Batzer, A. G., Rotin, D., Urena, J. M., Skolnik, E. Y., and Schlessinger, J. / (1994) /** Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor / *Mol. Cell Biol.* / 14 / 5192-5201
10. **Baulida, J., Kraus, M. H., Alimandi, M., Di Fiore, P. P., and Carpenter, G. / (1996) /** All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired / *J. Biol. Chem.* / 271 / 5251-5257
11. **Bergsmedh, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M. J., Spetz, A. L., and Holmgren, L. / (2001) /** Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies / *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* / 98 / 6407-6411
12. **Berra, E., Pages, G., and Pouyssegur, J. / (2000) /** MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression / *Cancer Metastasis Rev.* / 19 / 139-145
13. **Besson, A. and Yong, V. W. / (2001) /** Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas / *J. Neurooncol.* / 51 / 245-264

14. **Biernat, W., Huang, H., Yokoo, H., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (2004) / Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas / *Brain Pathol.* / 14 / 131-136
15. **Biernat, W., Kleihues, P., Yonekawa, Y., and Ohgaki, H.** / (1997a) / Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 56 / 180-185
16. **Biernat, W., Tohma, Y., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (1997b) / Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas / *Acta Neuropathol.* / 94 / 303-309
17. **Bigner, S. H., Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Mark, J., Friedman, H. S., and Bigner, D. D.** / (1990) / Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts / *Cancer Res.* / 50 / 8017-8022
18. **Bigner, S. H., Mark, J., and Bigner, D. D.** / (1990) / Cytogenetics of human brain tumors / *Cancer Genet.Cytogenet.* / 47 / 141-154
19. **Bigner, S. H., Wong, A. J., Mark, J., Muhlbaier, L. H., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Bigner, D. D.** / (1987) / Relationship between gene amplification and chromosomal deviations in malignant human gliomas / *Cancer Genet.Cytogenet.* / 29 / 165-170
20. **Bishop, J. M.** / (1990) / Nobel Lecture. Retroviruses and oncogenes II / *Biosci.Rep.* / 10 / 473-491
21. **Blobel, C. P.** / (2005) / ADAMs: key components in EGFR signalling and development / *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* / 6 / 32-43
22. **Bogler, O., Huang, H. J., Kleihues, P., and Cavenee, W. K.** / (1995) / The p53 gene and its role in human brain tumors / *Glia* / 15 / 308-327
23. **Bouvier-Labit, C., Chinot, O., Ochi, C., Gambarelli, D., Dufour, H., and Figarella-Branger, D.** / (1998) / Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas / *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* / 24 / 381-388
24. **Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M., and Leahy, D. J.** / (2005) / The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand / *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* / 102 / 15024-15029
25. **Brazil, D. P., Park, J., and Hemmings, B. A.** / (2002) / PKB binding proteins. Getting in on the Akt / *Cell* / 111 / 293-303
26. **Bublil, E. M. and Yarden, Y.** / (2007) / The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics / *Curr.Opin.Cell Biol.* / 19 / 124-134
27. **Burke, P., Schooler, K., and Wiley, H. S.** / (2001) / Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking / *Mol.Biol.Cell* / 12 / 1897-1910
28. **Burns, K. L., Ueki, K., Jhung, S. L., Koh, J., and Louis, D. N.** / (1998) / Molecular genetic correlates of p16, cdk4, and pRb immunohistochemistry in glioblastomas / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 57 / 122-130

29. **Cantley, L. C.** / (2002) / The phosphoinositide 3-kinase pathway / *Science* / 296 / 1655-1657
30. **Capra, M., Nuciforo, P. G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., Boldorini, R., Pallotti, F., Viale, G., Gishizky, M. L., Draetta, G. F., and Di Fiore, P. P.** / (2006) / Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers / *Cancer Res.* / 66 / 8147-8154
31. **Carpenter, G.** / (2003) / Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases / *Curr.Opin.Cell Biol.* / 15 / 143-148
32. **Carpenter, G.** / (2000) / The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling / *Bioessays* / 22 / 697-707
33. **Carpenter, G. and Cohen, S.** / (1979) / Epidermal growth factor / *Annu.Rev.Biochem.* / 48 / 193-216
34. **Carpenter, G., King, L., Jr., and Cohen, S.** / (1978) / Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro / *Nature* / 276 / 409-410
35. **Carraway, K. L., III and Cantley, L. C.** / (1994) / A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling / *Cell* / 78 / 5-8
36. **Castagnino, P., Biesova, Z., Wong, W. T., Fazioli, F., Gill, G. N., and Di Fiore, P. P.** / (1995) / Direct binding of eps8 to the juxtamembrane domain of EGFR is phosphotyrosine- and SH2-independent / *Oncogene* / 10 / 723-729
37. **Chaffanet, M., Chauvin, C., Laine, M., Berger, F., Chedin, M., Rost, N., Nissou, M. F., and Benabid, A. L.** / (1992) / EGF receptor amplification and expression in human brain tumours / *Eur.J.Cancer* / 28 / 11-17
38. **Chaichana, K., Zamora-Berridi, G., Camara-Quintana, J., and Quinones-Hinojosa, A.** / (2006) / Neurosphere assays: growth factors and hormone differences in tumor and nontumor studies / *Stem Cells* / 24 / 2851-2857
39. **Chattopadhyay, A., Vecchi, M., Ji, Q., Mernaugh, R., and Carpenter, G.** / (1999) / The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor / *J.Biol.Chem.* / 274 / 26091-26097
40. **Chen, W. S., Lazar, C. S., Lund, K. A., Welsh, J. B., Chang, C. P., Walton, G. M., Der, C. J., Wiley, H. S., Gill, G. N., and Rosenfeld, M. G.** / (1989) / Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation / *Cell* / 59 / 33-43
41. **Cho, H. S. and Leahy, D. J.** / (2002) / Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether / *Science* / 297 / 1330-1333
42. **Choe, G., Horvath, S., Cloughesy, T. F., Crosby, K., Seligson, D., Palotie, A., Inge, L., Smith, B. L., Sawyers, C. L., and Mischel, P. S.** / (2003) / Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo / *Cancer Res.* / 63 / 2742-2746
43. **Ciardiello, F. and Tortora, G.** / (2001) / A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor / *Clin.Cancer Res.* / 7 / 2958-2970

44. **Cochet, C., Kashles, O., Chambaz, E. M., Borrello, I., King, C. R., and Schlessinger, J.** / (1988) / Demonstration of epidermal growth factor-induced receptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross-linking agent / *J.Biol.Chem.* / 263 / 3290-3295
45. **Cohen, S.** / (1986) / Nobel lecture. Epidermal growth factor / *Biosci.Rep.* / 6 / 1017-1028
46. **Collins, V. P.** / (1995) / Gene amplification in human gliomas / *Glia* / 15 / 289-296
47. **Corfas, G., Roy, K., and Buxbaum, J. D.** / (2004) / Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia / *Nat.Neurosci.* / 7 / 575-580
48. **Couet, J., Sargiacomo, M., and Lisanti, M. P.** / (1997) / Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities / *J.Biol.Chem.* / 272 / 30429-30438
49. **Dahia, P. L.** / (2000) / PTEN, a unique tumor suppressor gene / *Endocr.Relat Cancer* / 7 / 115-129
50. **Darnell, J. E., Jr.** / (1997) / STATs and gene regulation / *Science* / 277 / 1630-1635
51. **Das, A., Banik, N. L., and Ray, S. K.** / (2008) / Retinoids induced astrocytic differentiation with down regulation of telomerase activity and enhanced sensitivity to taxol for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells / *J.Neurooncol.* / 87 / 9-22
52. **Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E.** / (1999) / Cellular survival: a play in three Acts / *Genes Dev.* / 13 / 2905-2927
53. **David, M., Wong, L., Flavell, R., Thompson, S. A., Wells, A., Larner, A. C., and Johnson, G. R.** / (1996) / STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1 / *J.Biol.Chem.* / 271 / 9185-9188
54. **Davis, F. G., McCarthy, B. J., and Berger, M. S.** / (1999) / Centralized databases available for describing primary brain tumor incidence, survival, and treatment: Central Brain Tumor Registry of the United States; Surveillance, Epidemiology, and End Results; and National Cancer Data Base / *Neuro.Oncol.* / 1 / 205-211
55. **Davis, R. J.** / (1988) / Independent mechanisms account for the regulation by protein kinase C of the epidermal growth factor receptor affinity and tyrosine-protein kinase activity / *J.Biol.Chem.* / 263 / 9462-9469
56. **Dawson, J. P., Berger, M. B., Lin, C. C., Schlessinger, J., Lemmon, M. A., and Ferguson, K. M.** / (2005) / Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface / *Mol.Cell Biol.* / 25 / 7734-7742
57. **Dell'Albani, P.** / (2008) / Stem cell markers in gliomas / *Neurochem.Res.* / 33 / 2407-2415
58. **den Hartigh, J. C., van Bergen en Henegouwen PM, Verkleij, A. J., and Boonstra, J.** / (1992) / The EGF receptor is an actin-binding protein / *J.Cell Biol.* / 119 / 349-355
59. **Derynck, R., Roberts, A. B., Winkler, M. E., Chen, E. Y., and Goeddel, D. V.** / (1984) / Human transforming growth factor-alpha: precursor structure and expression in *E. coli* / *Cell* / 38 / 287-297

60. **Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Waterfield, M. D. / (1984) /** Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences / *Nature* / 307 / 521-527
61. **Duhem-Tonnelle, V., Bieche, I., Vacher, S., Loyens, A., Maurage, C. A., Collier, F., Baroncini, M., Blond, S., Prevot, V., and Sharif, A. / (2010) /** Differential distribution of erbB receptors in human glioblastoma multiforme: expression of erbB3 in CD133-positive putative cancer stem cells / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 69 / 606-622
62. **Ekstrand, A. J., James, C. D., Cavenee, W. K., Seliger, B., Pettersson, R. F., and Collins, V. P. / (1991) /** Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo / *Cancer Res.* / 51 / 2164-2172
63. **Ekstrand, A. J., Longo, N., Hamid, M. L., Olson, J. J., Liu, L., Collins, V. P., and James, C. D. / (1994) /** Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification / *Oncogene* / 9 / 2313-2320
64. **Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., and Collins, V. P. / (1992) /** Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 89 / 4309-4313
65. **el-Azouzi, M., Chung, R. Y., Farmer, G. E., Martuza, R. L., Black, P. M., Rouleau, G. A., Hettlich, C., Hedley-Whyte, E. T., Zervas, N. T., Panagopoulos, K., and . / (1989) /** Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of human astrocytomas / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 86 / 7186-7190
66. **El-Obeid, A., Bongcam-Rudloff, E., Sorby, M., Ostman, A., Nister, M., and Westermarck, B. / (1997) /** Cell scattering and migration induced by autocrine transforming growth factor alpha in human glioma cells in vitro / *Cancer Res.* / 57 / 5598-5604
67. **Elleman, T. C., Domagala, T., McKern, N. M., Nerrie, M., Lonnqvist, B., Adams, T. E., Lewis, J., Lovrecz, G. O., Hoyne, P. A., Richards, K. M., Howlett, G. J., Rothacker, J., Jorissen, R. N., Lou, M., Garrett, T. P., Burgess, A. W., Nice, E. C., and Ward, C. W. / (2001) /** Identification of a determinant of epidermal growth factor receptor ligand-binding specificity using a truncated, high-affinity form of the ectodomain / *Biochemistry* / 40 / 8930-8939
68. **Emsley, J. G., Mitchell, B. D., Kempermann, G., and Macklis, J. D. / (2005) /** Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells / *Prog.Neurobiol.* / 75 / 321-341
69. **Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., and Lee, Y. L. / (2000) /** Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000) / *Neurochem.Res.* / 25 / 1439-1451
70. **Ennis, B. W., Lippman, M. E., and Dickson, R. B. / (1991) /** The EGF receptor system as a target for antitumor therapy / *Cancer Invest* / 9 / 553-562
71. **Esper, R. M., Pankonin, M. S., and Loeb, J. A. / (2006) /** Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease / *Brain Res.Rev.* / 51 / 161-175

72. **Esteller, M. and Herman, J. G.** / (2004) / Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer / *Oncogene* / 23 / 1-8
73. **Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., and Guha, A.** / (1999) / Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens / *Neurosurgery* / 45 / 1442-1453
74. **Feldkamp, M. M., Lau, N., and Guha, A.** / (1997) / Signal transduction pathways and their relevance in human astrocytomas / *J.Neurooncol.* / 35 / 223-248
75. **Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A.** / (2003) / EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization / *Mol.Cell* / 11 / 507-517
76. **Fernandes, H., Cohen, S., and Bishayee, S.** / (2001) / Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells / *J.Biol.Chem.* / 276 / 5375-5383
77. **Ferrara, N. and Gerber, H. P.** / (2001) / The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis / *Acta Haematol.* / 106 / 148-156
78. **Filmus, J., Pollak, M. N., Cairncross, J. G., and Buick, R. N.** / (1985) / Amplified, overexpressed and rearranged epidermal growth factor receptor gene in a human astrocytoma cell line / *Biochem.Biophys.Res.Comm.* / 131 / 207-215
79. **Fischer, U., Wullich, B., Sattler, H. P., Gottert, E., Zang, K. D., and Meese, E.** / (1994) / Coamplification on chromosomes 7p12-13 and 9q12-13 identified by reverse chromosome painting in a glioblastoma multiforme / *Hum.Genet.* / 93 / 331-334
80. **Frederick, L., Eley, G., Wang, X. Y., and James, C. D.** / (2000a) / Analysis of genomic rearrangements associated with EGFRvIII expression suggests involvement of Alu repeat elements / *Neuro.Oncol.* / 2 / 159-163
81. **Frederick, L., Wang, X. Y., Eley, G., and James, C. D.** / (2000b) / Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas / *Cancer Res.* / 60 / 1383-1387
82. **French, A. R., Sudlow, G. P., Wiley, H. S., and Lauffenburger, D. A.** / (1994) / Postendocytic trafficking of epidermal growth factor-receptor complexes is mediated through saturable and specific endosomal interactions / *J.Biol.Chem.* / 269 / 15749-15755
83. **Fujisawa, H., Reis, R. M., Nakamura, M., Colella, S., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (2000) / Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas / *Lab Invest* / 80 / 65-72
84. **Fuller, G. N. and Bigner, S. H.** / (1992) / Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system / *Mutat.Res.* / 276 / 299-306
85. **Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., Hahn, W. C., Ligon, K. L., Louis, D. N., Brennan, C., Chin, L., DePinho, R. A., and Cavenee, W. K.** /

- (2007) / Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment / *Genes Dev.* / 21 / 2683-2710
86. **Furuta, M., Weil, R. J., Vortmeyer, A. O., Huang, S., Lei, J., Huang, T. N., Lee, Y. S., Bhowmick, D. A., Lubensky, I. A., Oldfield, E. H., and Zhuang, Z.** / (2004) / Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme / *Oncogene* / 23 / 6806-6814
 87. **Gan, H. K., Kaye, A. H., and Luwor, R. B.** / (2009) / The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme / *J.Clin.Neurosci.* / 16 / 748-754
 88. **Garcia, de Palazzo, I, Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M.** / (1993) / Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas / *Cancer Res.* / 53 / 3217-3220
 89. **Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W.** / (2003) / The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors / *Mol.Cell* / 11 / 495-505
 90. **Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W.** / (2002) / Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha / *Cell* / 110 / 763-773
 91. **Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Frenkel, M. J., Bentley, J. D., Lovrecz, G. O., Elleman, T. C., Cosgrove, L. J., and Ward, C. W.** / (1998) / Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor / *Nature* / 394 / 395-399
 92. **Ge, H., Gong, X., and Tang, C. K.** / (2002) / Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis / *Int.J.Cancer* / 98 / 357-361
 93. **Gilbert, S. F.** / (2000) / Paradigm shifts in neural induction / *Rev.Hist.Sci.Paris* / 53 / 555-579
 94. **Gilbertson, R. J. and Rich, J. N.** / (2007) / Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche / *Nat.Rev.Cancer* / 7 / 733-736
 95. **Giri, D. K., li-Seyed, M., Li, L. Y., Lee, D. F., Ling, P., Bartholomeusz, G., Wang, S. C., and Hung, M. C.** / (2005) / Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor / *Mol.Cell Biol.* / 25 / 11005-11018
 96. **Godard, S., Getz, G., Delorenzi, M., Farmer, P., Kobayashi, H., Desbaillets, I., Nozaki, M., Diserens, A. C., Hamou, M. F., Dietrich, P. Y., Regli, L., Janzer, R. C., Bucher, P., Stupp, R., de, Tribolet N., Domany, E., and Hegi, M. E.** / (2003) / Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes / *Cancer Res.* / 63 / 6613-6625
 97. **Goldenberg, M. M.** / (1999) / Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer / *Clin.Ther.* / 21 / 309-318

98. **Gonzalez-Gomez, P., Bello, M. J., Arjona, D., Lomas, J., Alonso, M. E., De Campos, J. M., Vaquero, J., Isla, A., Gutierrez, M., and Rey, J. A. / (2003) / Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas / *Int.J.Oncol.* / 22 / 601-608**
99. **Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., and Hynes, N. E. / (1997) / ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling / *EMBO J.* / 16 / 1647-1655**
100. **Gray, A., Dull, T. J., and Ullrich, A. / (1983) / Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor / *Nature* / 303 / 722-725**
101. **Gulli, L. F., Palmer, K. C., Chen, Y. Q., and Reddy, K. B. / (1996) / Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity / *Cell Growth Differ.* / 7 / 173-178**
102. **Gunther, H. S., Schmidt, N. O., Phillips, H. S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., Modrusan, Z., Meissner, H., Westphal, M., and Lamszus, K. / (2008) / Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria / *Oncogene* / 27 / 2897-2909**
103. **Hackel, P. O., Zwick, E., Prenzel, N., and Ullrich, A. / (1999) / Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways / *Curr.Opin.Cell Biol.* / 11 / 184-189**
104. **Hahn, C. G., Wang, H. Y., Cho, D. S., Talbot, K., Gur, R. E., Berrettini, W. H., Bakshi, K., Kamins, J., Borgmann-Winter, K. E., Siegel, S. J., Gallop, R. J., and Arnold, S. E. / (2006) / Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia / *Nat.Med.* / 12 / 824-828**
105. **Hall, A. / (1994) / A biochemical function for ras--at last / *Science* / 264 / 1413-1414**
106. **Hallberg, B., Rayter, S. I., and Downward, J. / (1994) / Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation / *J.Biol.Chem.* / 269 / 3913-3916**
107. **Harari, P. M. and Huang, S. M. / (2000) / Modulation of molecular targets to enhance radiation / *Clin.Cancer Res.* / 6 / 323-325**
108. **Harris, R. C., Chung, E., and Coffey, R. J. / (2003) / EGF receptor ligands / *Exp.Cell Res.* / 284 / 2-13**
109. **Hartwell, L. H. / (2002) / Nobel Lecture. Yeast and cancer / *Biosci.Rep.* / 22 / 373-394**
110. **Haugh, J. M. and Meyer, T. / (2002) / Active EGF receptors have limited access to PtdIns(4,5)P(2) in endosomes: implications for phospholipase C and PI 3-kinase signaling / *J.Cell Sci.* / 115 / 303-310**
111. **He, C., Hobert, M., Friend, L., and Carlin, C. / (2002) / The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core / *J.Biol.Chem.* / 277 / 38284-38293**

112. **He, J., Olson, J. J., and James, C. D.** / (1995) / Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines / *Cancer Res.* / 55 / 4833-4836
113. **Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de, Tribolet N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., and Stupp, R.** / (2005) / MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma / *N.Engl.J.Med.* / 352 / 997-1003
114. **Hegi, M. E., zur, Hausen A., Ruedi, D., Malin, G., and Kleihues, P.** / (1997) / Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16INK4a gene is associated with amplification of the EGF receptor gene in glioblastomas / *Int.J.Cancer* / 73 / 57-63
115. **Heimberger, A. B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., and Aldape, K.** / (2005) / Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients / *Clin.Cancer Res.* / 11 / 1462-1466
116. **Hellyer, N. J., Cheng, K., and Koland, J. G.** / (1998) / ErbB3 (HER3) interaction with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase / *Biochem.J.* / 333 (Pt 3) / 757-763
117. **Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D. H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H. I.** / (2003) / Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors / *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* / 100 / 15178-15183
118. **Herbst, R. S.** / (2004) / Review of epidermal growth factor receptor biology / *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* / 59 / 21-26
119. **Higashiyama, S., Lau, K., Besner, G. E., Abraham, J. A., and Klagsbrun, M.** / (1992) / Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein / *J.Biol.Chem.* / 267 / 6205-6212
120. **Hofer, F., Berdeaux, R., and Martin, G. S.** / (1998) / Ras-independent activation of Ral by a Ca(2+)-dependent pathway / *Curr.Biol.* / 8 / 839-842
121. **Holbro, T., Civenni, G., and Hynes, N. E.** / (2003) / The ErbB receptors and their role in cancer progression / *Exp.Cell Res.* / 284 / 99-110
122. **Homma, T., Fukushima, T., Vaccarella, S., Yonekawa, Y., Di Patre, P. L., Franceschi, S., and Ohgaki, H.** / (2006) / Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 65 / 846-854
123. **Honegger, A. M., Kris, R. M., Ullrich, A., and Schlessinger, J.** / (1989) / Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 86 / 925-929
124. **Honegger, A. M., Schmidt, A., Ullrich, A., and Schlessinger, J.** / (1990) / Evidence for epidermal growth factor (EGF)-induced intermolecular autophosphorylation of the EGF receptors in living cells / *Mol.Cell Biol.* / 10 / 4035-4044
125. **Houle, M. G. and Bourgoin, S.** / (1999) / Regulation of phospholipase D by phosphorylation-dependent mechanisms / *Biochim.Biophys.Acta* / 1439 / 135-149

126. **Hu, B., Guo, P., Fang, Q., Tao, H. Q., Wang, D., Nagane, M., Huang, H. J., Gunji, Y., Nishikawa, R., Alitalo, K., Cavenee, W. K., and Cheng, S. Y.** / (2003) / Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2 / *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* / 100 / 8904-8909
127. **Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavenee, W. K.** / (1997) / The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling / *J.Biol.Chem.* / 272 / 2927-2935
128. **Huang, P. H., Cavenee, W. K., Furnari, F. B., and White, F. M.** / (2007a) / Uncovering therapeutic targets for glioblastoma: a systems biology approach / *Cell Cycle* / 6 / 2750-2754
129. **Huang, P. H., Mukasa, A., Bonavia, R., Flynn, R. A., Brewer, Z. E., Cavenee, W. K., Furnari, F. B., and White, F. M.** / (2007b) / Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma / *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* / 104 / 12867-12872
130. **Huang, S. S., Koh, H. A., Konish, Y., Bullock, L. D., and Huang, J. S.** / (1990) / Differential processing and turnover of the oncogenically activated neu/erb B2 gene product and its normal cellular counterpart / *J.Biol.Chem.* / 265 / 3340-3346
131. **Hubbard, S. R.** / (1997) / Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog / *EMBO J.* / 16 / 5572-5581
132. **Hubbard, S. R. and Miller, W. T.** / (2007) / Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling / *Curr.Opin.Cell Biol.* / 19 / 117-123
133. **Hughes, P. E., Renshaw, M. W., Pfaff, M., Forsyth, J., Keivens, V. M., Schwartz, M. A., and Ginsberg, M. H.** / (1997) / Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway / *Cell* / 88 / 521-530
134. **Humphrey, P. A., Gangarosa, L. M., Wong, A. J., Archer, G. E., Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R., Laerum, O. D., Friedman, H. S., and Bigner, D. D.** / (1991) / Deletion-mutant epidermal growth factor receptor in human gliomas: effects of type II mutation on receptor function / *Biochem.Biophys.Res.Commun.* / 178 / 1413-1420
135. **Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Friedman, H. S., Werner, M. H., Bigner, D. D., and Bigner, S. H.** / (1988) / Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts / *Cancer Res.* / 48 / 2231-2238
136. **Hunt, T.** / (2002) / Nobel Lecture. Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions / *Biosci.Rep.* / 22 / 465-486
137. **Hurt, M. R., Moossy, J., Donovan-Peluso, M., and Locker, J.** / (1992) / Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 51 / 84-90
138. **Ichimura, K., Bolin, M. B., Goike, H. M., Schmidt, E. E., Moshref, A., and Collins, V. P.** / (2000) / Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities / *Cancer Res.* / 60 / 417-424

139. **Ichimura, K., Schmidt, E. E., Goike, H. M., and Collins, V. P.** / (1996) / Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene / *Oncogene* / 13 / 1065-1072
140. **Ichimura, K., Schmidt, E. E., Miyakawa, A., Goike, H. M., and Collins, V. P.** / (1998) / Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades / *Genes Chromosomes.Cancer* / 22 / 9-15
141. **Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D., and Steindler, D. A.** / (2002) / Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro / *Glia* / 39 / 193-206
142. **Issa, J. P.** / (2004) / CpG island methylator phenotype in cancer / *Nat.Rev.Cancer* / 4 / 988-993
143. **Jeong, S. J., Pise-Masison, C. A., Radonovich, M. F., Park, H. U., and Brady, J. N.** / (2005) / Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells / *Oncogene* / 24 / 6719-6728
144. **Johns, T. G., Perera, R. M., Vernes, S. C., Vitali, A. A., Cao, D. X., Cavenee, W. K., Scott, A. M., and Furnari, F. B.** / (2007) / The efficacy of epidermal growth factor receptor-specific antibodies against glioma xenografts is influenced by receptor levels, activation status, and heterodimerization / *Clin.Cancer Res.* / 13 / 1911-1925
145. **Johnson, G. L. and Vaillancourt, R. R.** / (1994) / Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation / *Curr.Opin.Cell Biol.* / 6 / 230-238
146. **Jones, P. A. and Baylin, S. B.** / (2002) / The fundamental role of epigenetic events in cancer / *Nat.Rev.Genet.* / 3 / 415-428
147. **Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F., and Hemmings, B. A.** / (1991) / Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily / *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* / 88 / 4171-4175
148. **Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A., and Kalnins, V. I.** / (1982) / Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells / *J.Cell Biol.* / 94 / 253-262
149. **Jones-Villeneuve, E. M., Rudnicki, M. A., Harris, J. F., and McBurney, M. W.** / (1983) / Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells / *Mol.Cell Biol.* / 3 / 2271-2279
150. **Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W., and Burgess, A. W.** / (2003) / Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling / *Exp.Cell Res.* / 284 / 31-53
151. **Kamat, A. and Carpenter, G.** / (1997) / Phospholipase C-gamma1: regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction / *Cytokine Growth Factor Rev.* / 8 / 109-117
152. **Kamijo, T., Weber, J. D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M. F., and Sherr, C. J.** / (1998) / Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2 / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 95 / 8292-8297

153. **Karunakaran, D., Tzahar, E., Beerli, R. R., Chen, X., Graus-Porta, D., Ratzkin, B. J., Seger, R., Hynes, N. E., and Yarden, Y.** / (1996) / ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer / *EMBO J.* / 15 / 254-264
154. **Kaur, B., Tan, C., Brat, D. J., Post, D. E., and Van Meir, E. G.** / (2004) / Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas / *J.Neurooncol.* / 70 / 229-243
155. **Kawamoto, T., Sato, J. D., Le, A., Polikoff, J., Sato, G. H., and Mendelsohn, J.** / (1983) / Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody / *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* / 80 / 1337-1341
156. **Kempermann, G.** / (2011) / "Adult Neurogenesis 2" / 2nd ed. / Oxford University Press / New York
157. **Kil, S. J. and Carlin, C.** / (2000) / EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments / *J.Cell Physiol* / 185 / 47-60
158. **Kim, H. H., Vijapurkar, U., Hellyer, N. J., Bravo, D., and Koland, J. G.** / (1998) / Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein / *Biochem.J.* / 334 (Pt 1) / 189-195
159. **Kimelberg, H. K.** / (2004) / The problem of astrocyte identity / *Neurochem.Int.* / 45 / 191-202
160. **Kleihues, P., Burger, P. C., and Scheithauer, B. W.** / (1993) / "Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System" / 1st ed. / Springer Verlag / Berlin, Heidelberg, New York
161. **Kleihues, P. and Cavenee, W. K.** / (2000) / "Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System" / 2nd ed. / International Agency for Research on Cancer / Lyon
162. **Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., and Cavenee, W. K.** / (2002) / The WHO classification of tumors of the nervous system / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 61 / 215-225
163. **Kleihues, P., Soylemezoglu, F., Schauble, B., Scheithauer, B. W., and Burger, P. C.** / (1995) / Histopathology, classification, and grading of gliomas / *Glia* / 15 / 211-221
164. **Kloth, M. T., Laughlin, K. K., Biscardi, J. S., Boerner, J. L., Parsons, S. J., and Silva, C. M.** / (2003) / STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor / *J.Biol.Chem.* / 278 / 1671-1679
165. **Knobbe, C. B., Merlo, A., and Reifenberger, G.** / (2002) / Pten signaling in gliomas / *Neuro.Oncol.* / 4 / 196-211
166. **Kraus, J. A., Felsberg, J., Tonn, J. C., Reifenberger, G., and Pietsch, T.** / (2002) / Molecular genetic analysis of the TP53, PTEN, CDKN2A, EGFR, CDK4 and MDM2 tumour-associated genes in supratentorial primitive neuroectodermal tumours and glioblastomas of childhood / *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* / 28 / 325-333
167. **Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C., and Aaronson, S. A.** / (1989) / Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor

receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 86 / 9193-9197

168. **KREBS, E. G., GRAVES, D. J., and Fischer, E. H.** / (1959) / Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase / *J.Biol.Chem.* / 234 / 2867-2873
169. **Krek, W.** / (2000) / VHL takes HIF's breath away / *Nat.Cell Biol.* / 2 / E121-E123
170. **Kristof, A. S., Marks-Konczalik, J., Billings, E., and Moss, J.** / (2003) / Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin / *J.Biol.Chem.* / 278 / 33637-33644
171. **Kuan, C. T., Wikstrand, C. J., and Bigner, D. D.** / (2001) / EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy / *Endocr.Relat Cancer* / 8 / 83-96
172. **Kumar, C. C.** / (1998) / Signaling by integrin receptors / *Oncogene* / 17 / 1365-1373
173. **Lal, A., Glazer, C. A., Martinson, H. M., Friedman, H. S., Archer, G. E., Sampson, J. H., and Riggins, G. J.** / (2002) / Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion / *Cancer Res.* / 62 / 3335-3339
174. **Lamszus, K. and Gunther, H. S.** / (2010) / Glioma stem cells as a target for treatment / *Target Oncol.* / 5 / 211-215
175. **Lane, D. P. and Crawford, L. V.** / (1979) / T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells / *Nature* / 278 / 261-263
176. **Lang, F. F., Miller, D. C., Koslow, M., and Newcomb, E. W.** / (1994) / Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors / *J.Neurosurg.* / 81 / 427-436
177. **Langlois, W. J., Sasaoka, T., Saltiel, A. R., and Olefsky, J. M.** / (1995) / Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation / *J.Biol.Chem.* / 270 / 25320-25323
178. **Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., Pastorino, S., Purow, B. W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J. K., and Fine, H. A.** / (2006) / Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines / *Cancer Cell* / 9 / 391-403
179. **Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., and Kim, K. W.** / (2004) / Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions / *Exp.Mol.Med.* / 36 / 1-12
180. **Leenstra, S., Bijlsma, E. K., Troost, D., Oosting, J., Westerveld, A., Bosch, D. A., and Hulsebos, T. J.** / (1994) / Allele loss on chromosomes 10 and 17p and epidermal growth factor receptor gene amplification in human malignant astrocytoma related to prognosis / *Br.J.Cancer* / 70 / 684-689
181. **Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., and Parsons, R.** / (1997) / PTEN, a putative protein tyrosine

phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer / *Science* / 275 / 1943-1947

182. **Libermann, T. A., Nusbaum, H. R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M. D., Ullrich, A., and Schlessinger, J. / (1985) /** Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin / *Nature* / 313 / 144-147
183. **Lin, C. R., Chen, W. S., Lazar, C. S., Carpenter, C. D., Gill, G. N., Evans, R. M., and Rosenfeld, M. G. / (1986) /** Protein kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms / *Cell* / 44 / 839-848
184. **Linggi, B. and Carpenter, G. / (2006) /** ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology / *Trends Cell Biol.* / 16 / 649-656
185. **Liu, X., Bolteus, A. J., Balkin, D. M., Henschel, O., and Bordey, A. / (2006) /** GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes / *Glia* / 54 / 394-410
186. **Lo, H. W. and Hung, M. C. / (2006) /** Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival / *Br.J.Cancer* / 94 / 184-188
187. **Lo, H. W., li-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S. C., and Hung, M. C. / (2006) /** Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1 / *J.Cell Biochem.* / 98 / 1570-1583
188. **Lombardo, C. R., Consler, T. G., and Kassel, D. B. / (1995) /** In vitro phosphorylation of the epidermal growth factor receptor autophosphorylation domain by c-src: identification of phosphorylation sites and c-src SH2 domain binding sites / *Biochemistry* / 34 / 16456-16466
189. **Long, X., Olszewski, M., Huang, W., and Kletzel, M. / (2005) /** Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells / *Stem Cells Dev.* / 14 / 65-69
190. **Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., and Cavenee, W. K. / (2007) /** "World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System." / *International Agency for Research on Cancer / Lyon*
191. **Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., and Schlessinger, J. / (1992) /** The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling / *Cell* / 70 / 431-442
192. **Maehama, T. and Dixon, J. E. / (1998) /** The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate / *J.Biol.Chem.* / 273 / 13375-13378
193. **Maher, E. A., Furnari, F. B., Bachoo, R. M., Rowitch, D. H., Louis, D. N., Cavenee, W. K., and DePinho, R. A. / (2001) /** Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter / *Genes Dev.* / 15 / 1311-1333

194. **Maity, A., Pore, N., Lee, J., Solomon, D., and O'Rourke, D. M.** / (2000) / Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia / *Cancer Res.* / 60 / 5879-5886
195. **Malden, L. T., Novak, U., Kaye, A. H., and Burgess, A. W.** / (1988) / Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme / *Cancer Res.* / 48 / 2711-2714
196. **Manning, G.** / (2005) / Genomic overview of protein kinases / *WormBook.* / 1-19
197. **Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S.** / (2002) / The protein kinase complement of the human genome / *Science* / 298 / 1912-1934
198. **Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M. F., and Marshall, C. J.** / (1998) / Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C / *Science* / 280 / 109-112
199. **Martens, T., Laabs, Y., Gunther, H. S., Kemming, D., Zhu, Z., Witte, L., Hagel, C., Westphal, M., and Lamszus, K.** / (2008) / Inhibition of glioblastoma growth in a highly invasive nude mouse model can be achieved by targeting epidermal growth factor receptor but not vascular endothelial growth factor receptor-2 / *Clin.Cancer Res.* / 14 / 5447-5458
200. **Martens, T., Schmidt, N. O., Eckerich, C., Fillbrandt, R., Merchant, M., Schwall, R., Westphal, M., and Lamszus, K.** / (2006) / A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo / *Clin.Cancer Res.* / 12 / 6144-6152
201. **Martin-Nieto, J. and Villalobo, A.** / (1998) / The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site / *Biochemistry* / 37 / 227-236
202. **Massague, J.** / (1990) / Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors / *J.Biol.Chem.* / 265 / 21393-21396
203. **Massague, J. and Pandiella, A.** / (1993) / Membrane-anchored growth factors / *Annu.Rev.Biochem.* / 62 / 515-541
204. **Maxwell, M., Naber, S. P., Wolfe, H. J., Galanopoulos, T., Hedley-Whyte, E. T., Black, P. M., and Antoniades, H. N.** / (1990) / Coexpression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes by primary human astrocytomas may contribute to their development and maintenance / *J.Clin.Invest* / 86 / 131-140
205. **Menard, S., Fortis, S., Castiglioni, F., Agresti, R., and Balsari, A.** / (2001) / HER2 as a prognostic factor in breast cancer / *Oncology* / 61 Suppl 2 / 67-72
206. **Miaczynska, M., Pelkmans, L., and Zerial, M.** / (2004) / Not just a sink: endosomes in control of signal transduction / *Curr.Opin.Cell Biol.* / 16 / 400-406
207. **Mineo, C., Gill, G. N., and Anderson, R. G.** / (1999) / Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae / *J.Biol.Chem.* / 274 / 30636-30643
208. **Ming, G. L. and Song, H.** / (2005) / Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system / *Annu.Rev.Neurosci.* / 28 / 223-250

209. **Mishima, K., Higashiyama, S., Asai, A., Yamaoka, K., Nagashima, Y., Taniguchi, N., Kitanaka, C., Kirino, T., and Kuchino, Y.** / (1998) / Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates mitogenic signaling and is highly expressed in human malignant gliomas / *Acta Neuropathol.* / 96 / 322-328
210. **Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., and Reed, J. C.** / (1994) / Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene / *Cancer Res.* / 54 / 3131-3135
211. **Miyashita, T. and Reed, J. C.** / (1995) / Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene / *Cell* / 80 / 293-299
212. **Mohammadi, M., Olsen, S. K., and Ibrahimi, O. A.** / (2005) / Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation / *Cytokine Growth Factor Rev.* / 16 / 107-137
213. **Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J.** / (1992) / The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation / *Cell* / 69 / 1237-1245
214. **Morgan, D. O.** / (2007) / "The Cell Cycle: Principles of Control" / 1st ed. / New Science Press / London
215. **Moriki, T., Maruyama, H., and Maruyama, I. N.** / (2001) / Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain / *J.Mol.Biol.* / 311 / 1011-1026
216. **Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J.** / (1995) / Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors / *Cancer Res.* / 55 / 5536-5539
217. **Muleris, M., Almeida, A., Dutrillaux, A. M., Pruchon, E., Vega, F., Delattre, J. Y., Poisson, M., Malfoy, B., and Dutrillaux, B.** / (1994) / Oncogene amplification in human gliomas: a molecular cytogenetic analysis / *Oncogene* / 9 / 2717-2722
218. **Muller, S., Kunkel, P., Lamszus, K., Ulbricht, U., Lorente, G. A., Nelson, A. M., von, Schack D., Chin, D. J., Lohr, S. C., Westphal, M., and Melcher, T.** / (2003) / A role for receptor tyrosine phosphatase zeta in glioma cell migration / *Oncogene* / 22 / 6661-6668
219. **Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** / (1987) / Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction / *Methods Enzymol.* / 155 / 335-350
220. **Murphree, A. L. and Benedict, W. F.** / (1984) / Retinoblastoma: clues to human oncogenesis / *Science* / 223 / 1028-1033
221. **Nafe, R., Glienke, W., Burgemeister, R., Gangnus, R., Haar, B., Pries, A., and Schlote, W.** / (2004) / Regional heterogeneity of EGFR gene amplification and nuclear morphology in glioblastomas. An investigation using laser microdissection and pressure catapulting / *Anal.Quant.Cytol.Histol.* / 26 / 65-76
222. **Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J.** / (1996) / A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity

on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis / *Cancer Res.* / 56 / 5079-5086

223. **Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., and Huang, H. J.** / (1998) / Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 95 / 5724-5729
224. **Nakamura, M., Ishida, E., Shimada, K., Kishi, M., Nakase, H., Sakaki, T., and Konishi, N.** / (2005) / Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas / *Lab Invest* / 85 / 165-175
225. **Nakamura, M., Watanabe, T., Klangby, U., Asker, C., Wiman, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (2001a) / p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas / *Brain Pathol.* / 11 / 159-168
226. **Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (2001b) / Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene / *Carcinogenesis* / 22 / 1715-1719
227. **Nakamura, M., Yang, F., Fujisawa, H., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (2000) / Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 59 / 539-543
228. **Nakamura, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (2001c) / Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas / *Lab Invest* / 81 / 77-82
229. **Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H. J., Furnari, F. B., and Cavenee, W. K.** / (2002) / Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas / *Cancer Res.* / 62 / 6764-6769
230. **National Center for Biotechnology Information / U.S.National Library of Medicine** / (2001) / Homo sapiens epidermal growth factor receptor (EGFR) gene cc (2001) /
231. **Neubauer, A., Neubauer, B., He, M., Effert, P., Iglehart, D., Frye, R. A., and Liu, E.** / (1992) / Analysis of gene amplification in archival tissue by differential polymerase chain reaction / *Oncogene* / 7 / 1019-1025
232. **Nevins, J. R.** / (2001) / The Rb/E2F pathway and cancer / *Hum.Mol.Genet.* / 10 / 699-703
233. **Ni, C. Y., Murphy, M. P., Golde, T. E., and Carpenter, G.** / (2001) / gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase / *Science* / 294 / 2179-2181
234. **Nicholas, M. K., Lukas, R. V., Jafri, N. F., Faoro, L., and Salgia, R.** / (2006) / Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas / *Clin.Cancer Res.* / 12 / 7261-7270
235. **Nicholson, K. M. and Anderson, N. G.** / (2002) / The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy / *Cell Signal.* / 14 / 381-395

236. **Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. / (1994) / A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 91 / 7727-7731**
237. **Nister, M., Libermann, T. A., Betsholtz, C., Pettersson, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C. H., Schlessinger, J., and Westermark, B. / (1988) / Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and transforming growth factor- α and their receptors in human malignant glioma cell lines / *Cancer Res.* / 48 / 3910-3918**
238. **Nozaki, M., Tada, M., Kobayashi, H., Zhang, C. L., Sawamura, Y., Abe, H., Ishii, N., and Van Meir, E. G. / (1999) / Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression / *Neuro.Oncol.* / 1 / 124-137**
239. **Nurse, P. M. / (2002) / Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control / *Biosci.Rep.* / 22 / 487-499**
240. **Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., and Kitano, H. / (2005) / A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling / *Mol.Syst.Biol.* / 1 / 2005-**
241. **Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. / (2002) / Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains / *Cell* / 110 / 775-787**
242. **Ohgaki, H. / (2005) / Genetic pathways to glioblastomas / *Neuropathology.* / 25 / 1-7**
243. **Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M. G., Lutolf, U. M., and Kleihues, P. / (2004) / Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study / *Cancer Res.* / 64 / 6892-6899**
244. **Ohgaki, H. and Kleihues, P. / (2007) / Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma / *Am.J.Pathol.* / 170 / 1445-1453**
245. **Ohgaki, H. and Kleihues, P. / (2005) / Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 64 / 479-489**
246. **Okada, Y., Hurwitz, E. E., Esposito, J. M., Brower, M. A., Nutt, C. L., and Louis, D. N. / (2003) / Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas / *Cancer Res.* / 63 / 413-416**
247. **Okamoto, I., Kenyon, L. C., Emlet, D. R., Mori, T., Sasaki, J., Hirosako, S., Ichikawa, Y., Kishi, H., Godwin, A. K., Yoshioka, M., Suga, M., Matsumoto, M., and Wong, A. J. / (2003) / Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer / *Cancer Sci.* / 94 / 50-56**
248. **Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. / (2000) / The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer / *EMBO J.* / 19 / 3159-3167**

249. **Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., and Vogelstein, B.** / (1992) / Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas / *Nature* / 358 / 80-83
250. **Pandita, A., Aldape, K. D., Zadeh, G., Guha, A., and James, C. D.** / (2004) / Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR / *Genes Chromosomes.Cancer* / 39 / 29-36
251. **Pardridge, W. M.** / (2002) / Drug and gene delivery to the brain: the vascular route / *Neuron* / 36 / 555-558
252. **Park, O. K., Schaefer, T. S., and Nathans, D.** / (1996) / In vitro activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase / *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* / 93 / 13704-13708
253. **Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P.** / (2005) / Global cancer statistics, 2002 / *CA Cancer J.Clin.* / 55 / 74-108
254. **Pawson, T.** / (1995) / Protein modules and signalling networks / *Nature* / 373 / 573-580
255. **Payer, B. and Lee, J. T.** / (2008) / X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance / *Annu.Rev.Genet.* / 42 / 733-772
256. **Peiffer, J. and Kleihues, P.** / (1999) / Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research / *Brain Pathol.* / 9 / 241-245
257. **Peles, E. and Yarden, Y.** / (1993) / Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors / *Bioessays* / 15 / 815-824
258. **Picksley, S. M. and Lane, D. P.** / (1993) / The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? / *Bioessays* / 15 / 689-690
259. **Pietras, R. J., Poen, J. C., Gallardo, D., Wongvipat, P. N., Lee, H. J., and Slamon, D. J.** / (1999) / Monoclonal antibody to HER-2/neureceptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene / *Cancer Res.* / 59 / 1347-1355
260. **Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G., and Shoyab, M.** / (1993) / Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 90 / 1746-1750
261. **Porter, A. C. and Vaillancourt, R. R.** / (1998) / Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis / *Oncogene* / 17 / 1343-1352
262. **Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A.** / (1999) / EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF / *Nature* / 402 / 884-888
263. **Preusser, M., Haberler, C., and Hainfellner, J. A.** / (2006) / Malignant glioma: neuropathology and neurobiology / *Wien.Med.Wochenschr.* / 156 / 332-337
264. **Prigent, S. A., Nagane, M., Lin, H., Huvar, I., Boss, G. R., Feramisco, J. R., Cavenee, W. K., and Huang, H. S.** / (1996) / Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells

expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway / *J.Biol.Chem.* / 271 / 25639-25645

265. **Raible, D. W. and McMorris, F. A.** / (1993) / Oligodendrocyte differentiation and progenitor cell proliferation are independently regulated by cyclic AMP / *J.Neurosci.Res.* / 34 / 287-294
266. **Ramnarain, D. B., Park, S., Lee, D. Y., Hatanpaa, K. J., Scoggin, S. O., Otu, H., Libermann, T. A., Raisanen, J. M., Ashfaq, R., Wong, E. T., Wu, J., Elliott, R., and Habib, A. A.** / (2006) / Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells / *Cancer Res.* / 66 / 867-874
267. **Rao, J. S.** / (2003) / Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases / *Nat.Rev.Cancer* / 3 / 489-501
268. **Rasheed, B. K., McLendon, R. E., Friedman, H. S., Friedman, A. H., Fuchs, H. E., Bigner, D. D., and Bigner, S. H.** / (1995) / Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25 / *Oncogene* / 10 / 2243-2246
269. **Rasheed, B. K., Wiltshire, R. N., Bigner, S. H., and Bigner, D. D.** / (1999) / Molecular pathogenesis of malignant gliomas / *Curr.Opin.Oncol.* / 11 / 162-167
270. **Reifenberger, G., Ichimura, K., Reifenberger, J., Elkahloun, A. G., Meltzer, P. S., and Collins, V. P.** / (1996) / Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets / *Cancer Res.* / 56 / 5141-5145
271. **Reifenberger, G., Liu, L., Ichimura, K., Schmidt, E. E., and Collins, V. P.** / (1993) / Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations / *Cancer Res.* / 53 / 2736-2739
272. **Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K., Meltzer, P. S., and Collins, V. P.** / (1994) / Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2 / *Cancer Res.* / 54 / 4299-4303
273. **Reiter, J. L. and Maihle, N. J.** / (1996) / A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor / *Nucleic Acids Res.* / 24 / 4050-4056
274. **Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L.** / (2001) / Stem cells, cancer, and cancer stem cells / *Nature* / 414 / 105-111
275. **Rich, J. N. and Bigner, D. D.** / (2004) / Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma / *Nat.Rev.Drug Discov.* / 3 / 430-446
276. **Rich, J. N., Reardon, D. A., Peery, T., Dowell, J. M., Quinn, J. A., Penne, K. L., Wikstrand, C. J., Van Duyn, L. B., Dancey, J. E., McLendon, R. E., Kao, J. C., Stenzel, T. T., Rasheed, B. K., Tourt-Uhlig, S. E., Herndon, J. E., Vredenburgh, J. J., Sampson, J. H., Friedman, A. H., Bigner, D. D., and Friedman, H. S.** / (2004) / Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma / *J.Clin.Oncol.* / 22 / 133-142

277. **Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R.** / (2003) / Cell migration: integrating signals from front to back / *Science* / 302 / 1704-1709
278. **Riedl, S. J. and Salvesen, G. S.** / (2007) / The apoptosome: signalling platform of cell death / *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* / 8 / 405-413
279. **Riese, D. J. and Stern, D. F.** / (1998) / Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network / *Bioessays* / 20 / 41-48
280. **Rigby, A. C., Grant, C. W., and Shaw, G. S.** / (1998) / Solution and solid state conformation of the human EGF receptor transmembrane region / *Biochim.Biophys.Acta* / 1371 / 241-253
281. **Riva, P., Franceschi, G., Frattarelli, M., Lazzari, S., Riva, N., Giuliani, G., Casi, M., Sarti, G., Guiducci, G., Giorgetti, G., Gentile, R., Santimaria, M., Jermann, E., and Maeke, H. R.** / (1999) / Loco-regional radioimmunotherapy of high-grade malignant gliomas using specific monoclonal antibodies labeled with ⁹⁰Y: a phase I study / *Clin.Cancer Res.* / 5 / 3275s-3280s
282. **Robinson, C. J. and Stringer, S. E.** / (2001) / The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors / *J.Cell Sci.* / 114 / 853-865
283. **Robinson, D. R., Wu, Y. M., and Lin, S. F.** / (2000) / The protein tyrosine kinase family of the human genome / *Oncogene* / 19 / 5548-5557
284. **Roelofs, R. F., Fischer, D. F., Houtman, S. H., Sluijs, J. A., Van, Haren W., Van Leeuwen, F. W., and Hol, E. M.** / (2005) / Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton / *Glia* / 52 / 289-300
285. **Sako, Y., Minoghchi, S., and Yanagida, T.** / (2000) / Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells / *Nat.Cell Biol.* / 2 / 168-172
286. **Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N.** / (1995) / Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies / *Crit Rev.Oncol.Hematol.* / 19 / 183-232
287. **Sampson, J. H., Archer, G. E., Mitchell, D. A., Heimberger, A. B., and Bigner, D. D.** / (2008) / Tumor-specific immunotherapy targeting the EGFRvIII mutation in patients with malignant glioma / *Semin.Immunol.* / 20 / 267-275
288. **Sanson, M., Thillet, J., and Hoang-Xuan, K.** / (2004) / Molecular changes in gliomas / *Curr.Opin.Oncol.* / 16 / 607-613
289. **Sasaoka, T., Langlois, W. J., Leitner, J. W., Draznin, B., and Olefsky, J. M.** / (1994) / The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras / *J.Biol.Chem.* / 269 / 32621-32625
290. **Satoh, J. I., Tai, T., and Kim, S. U.** / (1996) / Differential expression of gangliosides and galactolipids in fetal human oligodendrocytes and astrocytes in culture / *Brain Res.Dev.Brain Res.* / 93 / 172-181

291. **Sauter, G., Maeda, T., Waldman, F. M., Davis, R. L., and Feuerstein, B. G.** / (1996) / Patterns of epidermal growth factor receptor amplification in malignant gliomas / *Am.J.Pathol.* / 148 / 1047-1053
292. **Schechter, A. L., Stern, D. F., Vaidyanathan, L., Decker, S. J., Drebin, J. A., Greene, M. I., and Weinberg, R. A.** / (1984) / The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen / *Nature* / 312 / 513-516
293. **Scherer, H. J.** / (1940) / Cerebral astrocytomas and their derivatives / *Am.J.Cancer* / 159-198
294. **Schlegel, U., Moots, P. L., Rosenblum, M. K., Thaler, H. T., and Furneaux, H. M.** / (1990) / Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas / *Oncogene* / 5 / 1839-1842
295. **Schlegel, U., Weller, M., and Westphal, M.** / (2003) / "Neuroonkologie" / 2nd ed. / Thieme / Stuttgart, New York
296. **Schlessinger, J. and Ullrich, A.** / (1992) / Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases / *Neuron* / 9 / 383-391
297. **Schmidt, E. E., Ichimura, K., Reifenberger, G., and Collins, V. P.** / (1994) / CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas / *Cancer Res.* / 54 / 6321-6324
298. **Schmittling, R. J., Archer, G. E., Mitchell, D. A., Heimberger, A., Pegram, C., Herndon, J. E., Friedman, H. S., Bigner, D. D., and Sampson, J. H.** / (2008) / Detection of humoral response in patients with glioblastoma receiving EGFRvIII-KLH vaccines / *J.Immunol.Methods* / 339 / 74-81
299. **Schreiber, A. B., Winkler, M. E., and Derynck, R.** / (1986) / Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor / *Science* / 232 / 1250-1253
300. **Schulze, W. X., Deng, L., and Mann, M.** / (2005) / Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family / *Mol.Syst.Biol.* / 1 / 2005-
301. **Schwechheimer, K., Huang, S., and Cavenee, W. K.** / (1995) / EGFR gene amplification--rearrangement in human glioblastomas / *Int.J.Cancer* / 62 / 145-148
302. **Sehgal, A.** / (1998) / Molecular changes during the genesis of human gliomas / *Semin.Surg.Oncol.* / 14 / 3-12
303. **Sherr, C. J.** / (2004) / Principles of tumor suppression / *Cell* / 116 / 235-246
304. **Sherr, C. J. and Roberts, J. M.** / (1999) / CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression / *Genes Dev.* / 13 / 1501-1512
305. **Shilo, B. Z.** / (2005) / Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time / *Development* / 132 / 4017-4027
306. **Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J., Oka, K., Ishimaru, Y., and Ushio, Y.** / (2003) / Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme / *Cancer Res.* / 63 / 6962-6970

307. **Shoelson, S. E., Sivaraja, M., Williams, K. P., Hu, P., Schlessinger, J., and Weiss, M. A.** / (1993) / Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the PI 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation / *EMBO J.* / 12 / 795-802
308. **Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G., and Todaro, G. J.** / (1988) / Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 85 / 6528-6532
309. **Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B.** / (2003) / Identification of a cancer stem cell in human brain tumors / *Cancer Res.* / 63 / 5821-5828
310. **Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B.** / (2004) / Identification of human brain tumour initiating cells / *Nature* / 432 / 396-401
311. **Slaaby, R., Jensen, T., Hansen, H. S., Frohman, M. A., and Seedorf, K.** / (1998) / PLD2 complexes with the EGF receptor and undergoes tyrosine phosphorylation at a single site upon agonist stimulation / *J.Biol.Chem.* / 273 / 33722-33727
312. **Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and .** / (1989) / Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer / *Science* / 244 / 707-712
313. **Slieker, L. J., Martensen, T. M., and Lane, M. D.** / (1986) / Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. Glycosylation-dependent acquisition of ligand binding activity occurs post-translationally in the endoplasmic reticulum / *J.Biol.Chem.* / 261 / 15233-15241
314. **Sliwkowski, M. X., Schaefer, G., Akita, R. W., Lofgren, J. A., Fitzpatrick, V. D., Nuijens, A., Fendly, B. M., Cerione, R. A., Vandlen, R. L., and Carraway, K. L., III** / (1994) / Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin / *J.Biol.Chem.* / 269 / 14661-14665
315. **Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T., and Lisanti, M. P.** / (1999) / Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction / *Mol.Cell Biol.* / 19 / 7289-7304
316. **Smith, T. G., Robbins, P. A., and Ratcliffe, P. J.** / (2008) / The human side of hypoxia-inducible factor / *Br.J.Haematol.* / 141 / 325-334
317. **Sorkin, A. and Von, Zastrow M.** / (2002) / Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds / *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* / 3 / 600-614
318. **Sorkina, T., Bild, A., Tebar, F., and Sorkin, A.** / (1999) / Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing activated epidermal growth factor receptors / *J.Cell Sci.* / 112 (Pt 3) / 317-327
319. **Sridhar, S. S., Seymour, L., and Shepherd, F. A.** / (2003) / Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer / *Lancet Oncol.* / 4 / 397-406

320. **Stamos, J., Sliwkowski, M. X., and Eigenbrot, C.** / (2002) / Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor / *J.Biol.Chem.* / 277 / 46265-46272
321. **Staneczak, W. and Janisch, W.** / (1994) / [Epidemiology of primary tumors of the central nervous system in children and adolescents. A population-based study] / *Pathologie* / 15 / 207-215
322. **Steck, P. A., Lee, P., Hung, M. C., and Yung, W. K.** / (1988) / Expression of an altered epidermal growth factor receptor by human glioblastoma cells / *Cancer Res.* / 48 / 5433-5439
323. **Stott, F. J., Bates, S., James, M. C., McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K. H., and Peters, G.** / (1998) / The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2 / *EMBO J.* / 17 / 5001-5014
324. **Stover, D. R., Becker, M., Liebetanz, J., and Lydon, N. B.** / (1995) / Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha / *J.Biol.Chem.* / 270 / 15591-15597
325. **Strachan, L., Murison, J. G., Prestidge, R. L., Sleeman, M. A., Watson, J. D., and Kumble, K. D.** / (2001) / Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily / *J.Biol.Chem.* / 276 / 18265-18271
326. **Stupp, R. and Regg, C.** / (2003) / New drugs and combinations for malignant glioma / *Forum (Genova.)* / 13 / 61-75
327. **Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P.** / (1990) / Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas / *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* / 87 / 8602-8606
328. **Surawicz, T. S., McCarthy, B. J., Kupelian, V., Jukich, P. J., Bruner, J. M., and Davis, F. G.** / (1999) / Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994 / *Neuro.Oncol.* / 1 / 14-25
329. **Sure, U., Ruedi, D., Tachibana, O., Yonekawa, Y., Ohgaki, H., Kleihues, P., and Hegi, M. E.** / (1997) / Determination of p53 mutations, EGFR overexpression, and loss of p16 expression in pediatric glioblastomas / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 56 / 782-789
330. **Tang, P., Steck, P. A., and Yung, W. K.** / (1997) / The autocrine loop of TGF-alpha/EGFR and brain tumors / *J.Neurooncol.* / 35 / 303-314
331. **Tapinos, N., Ohnishi, M., and Rambukkana, A.** / (2006) / ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli / *Nat.Med.* / 12 / 961-966
332. **Thompson, D. M. and Gill, G. N.** / (1985) / The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy / *Cancer Surv.* / 4 / 767-788
333. **Tice, D. A., Biscardi, J. S., Nickles, A. L., and Parsons, S. J.** / (1999) / Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor / *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* / 96 / 1415-1420

334. **Tohma, Y., Gratas, C., Biernat, W., Peraud, A., Fukuda, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (1998) / PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 57 / 684-689
335. **Torrisi, M. R., Lotti, L. V., Belleudi, F., Gradini, R., Salcini, A. E., Confalonieri, S., Pelicci, P. G., and Di Fiore, P. P.** / (1999) / Eps15 is recruited to the plasma membrane upon epidermal growth factor receptor activation and localizes to components of the endocytic pathway during receptor internalization / *Mol.Biol.Cell* / 10 / 417-434
336. **Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Takayama, Y., Isobe, T., Okuyama, T., and Hanada, K.** / (1995) / Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes / *J.Biol.Chem.* / 270 / 7495-7500
337. **Tso, C. L., Freije, W. A., Day, A., Chen, Z., Merriman, B., Perlina, A., Lee, Y., Dia, E. Q., Yoshimoto, K., Mischel, P. S., Liau, L. M., Cloughesy, T. F., and Nelson, S. F.** / (2006) / Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups / *Cancer Res.* / 66 / 159-167
338. **Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J., and Yarden, Y.** / (1996) / A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor / *Mol.Cell Biol.* / 16 / 5276-5287
339. **Ulbricht, U., Brockmann, M. A., Aigner, A., Eckerich, C., Muller, S., Fillbrandt, R., Westphal, M., and Lamszus, K.** / (2003) / Expression and function of the receptor protein tyrosine phosphatase zeta and its ligand pleiotrophin in human astrocytomas / *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* / 62 / 1265-1275
340. **Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and .** / (1984) / Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells / *Nature* / 309 / 418-425
341. **Ullrich, A. and Schlessinger, J.** / (1990) / Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity / *Cell* / 61 / 203-212
342. **van Inzen, W. G., Peppelenbosch, M. P., van den Brand, M. W., Tertoolen, L. G., and de Laat, S. W.** / (1996) / Neuronal differentiation of embryonic stem cells / *Biochim.Biophys.Acta* / 1312 / 21-26
343. **Vogt, N., Lefevre, S. H., Apiou, F., Dutrillaux, A. M., Cor, A., Leuraud, P., Poupon, M. F., Dutrillaux, B., Debatisse, M., and Malfoy, B.** / (2004) / Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 101 / 11368-11373
344. **Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S.** / (1997) / Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials / *Ann.Oncol.* / 8 / 1197-1206
345. **von Deimling, A., Louis, D. N., von, Ammon K., Petersen, I., Hoell, T., Chung, R. Y., Martuza, R. L., Schoenfeld, D. A., Yasargil, M. G., Wiestler, O. D., and .** / (1992) / Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme / *J.Neurosurg.* / 77 / 295-301

346. **von, Deimling A., Louis, D. N., and Wiestler, O. D.** / (1995b) / Molecular pathways in the formation of gliomas / *Glia* / 15 / 328-338
347. **von, Deimling A., Louis, D. N., and Wiestler, O. D.** / (1995a) / Molecular pathways in the formation of gliomas / *Glia* / 15 / 328-338
348. **Wang, H., Wang, H., Shen, W., Huang, H., Hu, L., Ramdas, L., Zhou, Y. H., Liao, W. S., Fuller, G. N., and Zhang, W.** / (2003a) / Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes / *Cancer Res.* / 63 / 4315-4321
349. **Wang, X., Huong, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N., and Huang, E. S.** / (2003b) / Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus / *Nature* / 424 / 456-461
350. **Wang, X. Y., Smith, D. I., Frederick, L., and James, C. D.** / (1998) / Analysis of EGF receptor amplicons reveals amplification of multiple expressed sequences / *Oncogene* / 16 / 191-195
351. **Watanabe, K., Sato, K., Biernat, W., Tachibana, O., von, Ammon K., Ogata, N., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (1997) / Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies / *Clin.Cancer Res.* / 3 / 523-530
352. **Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H.** / (1996) / Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas / *Brain Pathol.* / 6 / 217-223
353. **Weiner, L. P.** / (2008) / Definitions and criteria for stem cells / *Methods Mol.Biol.* / 438 / 3-8
354. **Wells, A.** / (2000) / Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility / *Adv.Cancer Res.* / 78 / 31-101
355. **Wells, A., Welsh, J. B., Lazar, C. S., Wiley, H. S., Gill, G. N., and Rosenfeld, M. G.** / (1990) / Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor / *Science* / 247 / 962-964
356. **Westphal, M. and Lamszus, K.** / (2009) / Other experimental therapies for glioma / *Recent Results Cancer Res.* / 171 / 155-164
357. **Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., and .** / (1995) / Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas / *Cancer Res.* / 55 / 3140-3148
358. **Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., and Bigner, D. D.** / (1997) / Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII / *Cancer Res.* / 57 / 4130-4140
359. **Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D.** / (1998) / The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target / *J.Neurovirol.* / 4 / 148-158

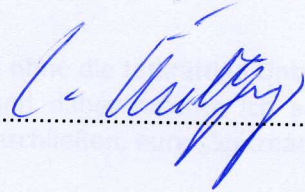
360. **Wiley, H. S.** / (2003) / Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling / *Exp.Cell Res.* / 284 / 78-88
361. **Wong, A. J., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Kinzler, K. W., Hamilton, S. R., and Vogelstein, B.** / (1987) / Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 84 / 6899-6903
362. **Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B.** / (1992) / Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas / *Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A* / 89 / 2965-2969
363. **Wong, R. W. and Guillaud, L.** / (2004) / The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS / *Cytokine Growth Factor Rev.* / 15 / 147-156
364. **Worm, K., Dabbagh, P., and Schwechheimer, K.** / (1999) / Reverse transcriptase polymerase chain reaction as a reliable method to detect epidermal growth factor receptor exon 2-7 gene deletion in human glioblastomas / *Hum.Pathol.* / 30 / 222-227
365. **Wullich, B., Sattler, H. P., Fischer, U., and Meese, E.** / (1994) / Two independent amplification events on chromosome 7 in glioma: amplification of the epidermal growth factor receptor gene and amplification of the oncogene MET / *Anticancer Res.* / 14 / 577-579
366. **Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N.** / (2006) / TOR signaling in growth and metabolism / *Cell* / 124 / 471-484
367. **Xia, L., Wang, L., Chung, A. S., Ivanov, S. S., Ling, M. Y., Dragoi, A. M., Platt, A., Gilmer, T. M., Fu, X. Y., and Chin, Y. E.** / (2002) / Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation / *J.Biol.Chem.* / 277 / 30716-30723
368. **Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Tamemoto, H., Sekine, N., Wada, M., Honjo, M., Takahashi, M., Takahashi, T., Hirai, H., Tushima, T., Akanuma, Y., Fujita, T., Komuro, I., Yazaki, Y., and Kadowaki, T.** / (1997) / Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone / *Nature* / 390 / 91-96
369. **Yamazaki, H., Fukui, Y., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Kawamoto, T., Taniguchi, S., and Shibuya, M.** / (1988) / Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors / *Mol.Cell Biol.* / 8 / 1816-1820
370. **Yamazaki, H., Ohba, Y., Tamaoki, N., and Shibuya, M.** / (1990) / A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors / *Jpn.J.Cancer Res.* / 81 / 773-779
371. **Yang, W., Barth, R. F., Wu, G., Kawabata, S., Sferra, T. J., Bandyopadhyaya, A. K., Tjarks, W., Ferketich, A. K., Moeschberger, M. L., Binns, P. J., Riley, K. J., Coderre, J. A., Ciesielski, M. J., Fenstermaker, R. A., and Wikstrand, C. J.** / (2006) / Molecular targeting and treatment of EGFRvIII-positive gliomas using boronated monoclonal antibody L8A4 / *Clin.Cancer Res.* / 12 / 3792-3802

372. **Yarden, Y.** / (2001) / The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities / *Eur.J.Cancer* / 37 Suppl 4 / S3-S8
373. **Yarden, Y. and Schlessinger, J.** / (1987) / Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation / *Biochemistry* / 26 / 1434-1442
374. **Yung, W. K., Zhang, X., Steck, P. A., and Hung, M. C.** / (1990) / Differential amplification of the TGF-alpha gene in human gliomas / *Cancer Commun.* / 2 / 201-205
375. **Zauberman, A., Flusberg, D., Haupt, Y., Barak, Y., and Oren, M.** / (1995) / A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene / *Nucleic Acids Res.* / 23 / 2584-2592
376. **Zawrocki, A. and Biernat, W.** / (2005) / Epidermal growth factor receptor in glioblastoma / *Folia Neuropathol.* / 43 / 123-132
377. **Zhang, Q. B., Ji, X. Y., Huang, Q., Dong, J., Zhu, Y. D., and Lan, Q.** / (2006a) / Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells / *Cell Res.* / 16 / 909-915
378. **Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., and Kuriyan, J.** / (2006b) / An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor / *Cell* / 125 / 1137-1149
379. **Zhang, Y., Zhang, Y. F., Bryant, J., Charles, A., Boado, R. J., and Pardridge, W. M.** / (2004) / Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer / *Clin.Cancer Res.* / 10 / 3667-3677
380. **Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr.** / (1994) / Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 / *Science* / 264 / 95-98
381. **Zülch, K. J.** / (1979) / "Histological typing of tumors of the central nervous system." / *World Health Organization / Geneva*
382. **Zwick, E., Hackel, P. O., Prenzel, N., and Ullrich, A.** / (1999) / The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems / *Trends Pharmacol.Sci.* / 20 / 408-412

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:



Danksagung

Nonum prematur in annum

(Q. Horatius Flaccus „Horaz“, 65 – 8 v. Chr.)

Nun ist diese Arbeit endlich vollendet.

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle der treuen und bis zum Schluß zuverlässigen Unterstützung von Frau Prof. Dr. med. Katrin Lamszus und Herrn Dr. rer. nat. Hauke S. Günther, die trotz der zeitweise sehr langen Intervalle ohne größere Fortschritte mir immer wenn es notwendig war, mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch Herrn Prof. Dr. med. Manfred Westphal möchte ich mehr als danken, nicht nur daß er mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat, sondern auch für die unglaublich schnelle Reaktion auf den Hirntumor meines Bruders und der damit verbundenen Operation, die Peter ein neues Leben schenkte.

Wie so viele andere wissenschaftlichen Arbeiten wäre auch diese ohne die tatkräftige Unterstützung unserer Technischen Assistentinnen nicht möglich gewesen, und daher möchte ich auch euch, Regina, Svenja, Dorothea und Hildegard in meine Danksagung einschließen, eure „Spitznamen“ habt ihr ja schon in meiner Diplomarbeit bekommen.

Mittlerweile habe ich zwei großartige Söhne, die auch ein wenig zurückstecken mussten, ganz besonders hat mir jedoch meine liebende Ehefrau Cathleen geholfen, indem sie mir gerade beim Schreiben des größten Teils dieser Arbeit in den letzten Monaten den Rücken frei gehalten hat, damit ich viele Stunden ungestört arbeiten konnte. Daß dies bei einer kompletten Familie nicht immer leicht ist, versteht sich wohl von selbst, und deshalb ein riesiges Dankeschön für deine wertvolle Unterstützung.

Gerade 90 Jahre alt geworden möchte ich auch meine liebe Großmutter erwähnen, die seit Monaten sehnsüchtig darauf wartet, Ihren Enkel endlich „Doktor“ nennen zu dürfen, und die sich über diese Arbeit sicher ganz besonders freut, und mir durch jahrelange Unterstützung all meine naturwissenschaftlichen Tätigkeiten überhaupt erst ermöglicht hat.

Und meinem lieben Vater, den ich absichtlich über den Fortschritt dieser Promotion ein wenig im Dunkeln habe schweben lassen, nicht etwa weil ich des öfteren zu hören gekriegt habe, „Junge nun schreib‘ doch endlich deine Doktorarbeit, du hast doch alle Zeit der Welt !“, sondern vielmehr um vielleicht ein wenig an den Überraschungseffekt des Abiturs von damals anknüpfen zu können, sei an dieser Stelle gedankt. Gerade in den letzten Monaten hat er mir viel Arbeit bei der Firma Bornemann abgenommen, und sich sicher auch seine Gedanken gemacht, warum ich mich ein wenig zurück gezogen habe.

Papier vergeht, Freundschaften nicht. Daher möchte ich gerade die Freunde, die mir in den letzten Jahrzehnten treu geblieben sind hier mit erwähnen, Thomas, Sebastian und Marcus, zwar habt ihr mir bei dieser Dissertation nicht wirklich geholfen, aber das Wissen um unsere Freundschaft allein ist es wert, eure Namen hier zu nennen.

In diesem Sinne: „Keep Racing!“

Kurz-Lebenslauf

Name: Clemens Wülfing
 Geboren: 17.Juni 1972 in Bielefeld
 Wohnhaft: Alte Hege 6 in 21521 Aumühle
 Telefon: 0173 – 66 969 66
 eMail: clemens@wuelfing.com
 Familienstand: verheiratet, 2 Kinder



<u>Qualifikationen</u>	
1995:	Abitur, Private Schulen Krüger / Lotte-Wersen
1995 – 1997:	Studium der Wirtschaftswissenschaften mit Schwerpunkt Informationstechnologie / European Business School / Oestrich-Winkel
1997 – 2004:	Studium der Humanmedizin / Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (Ärztliche Approbation 2004)
1997 – 2007:	Studium der Biologie / Johannes-Gutenberg-Universität Mainz / Universität Hamburg (Diplom in Biologie 2007)
2003:	Praktikum am Max-Planck-Institut für Hirnforschung / Neurophysiologie / Prof. Singer Dr. Neuenschwander <u>Projekt:</u> - „Dynamics of neuronal populations in visual perception“ Frankfurt am Main
2005 – 2010:	Forschungstätigkeit im Rahmen der biologischen Diplomarbeit sowie der medizinischen Promotion/ Hans Dietrich-Hermann Labor für Hirntumorbologie der Neurochirurgischen Klinik / Prof. Lamszus – Prof. Westphal <u>Projekte:</u> - „Vergleichende Charakterisierung klonaler Hirntumorstammzellkulturen aus dem humanen Glioblastoma multiforme“ - „Charakterisierung und Aufrechterhaltung der Amplifikation des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gens in Zellkulturen aus dem humanen Glioblastoma Multiforme unter modifizierten Stammzell-Bedingungen“ Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
2011:	Medizinische Promotion
1996 – 2011:	Geschäftsführer der CWAK Informationstechnologie GbR / Hamburg
2000 – 2011:	Geschäftsführer der Möller-Bornemann-Vermögensverwaltungs GmbH als Hauptgesellschafter des Konzerns „Bornemann Pumps“ / Obernkirchen
<u>Sonstiges:</u>	Englisch fließend, Spanisch solide Grundkenntnisse in Sprache und Schrift