

Identifikation von Resistenzmechanismen gegenüber
EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren in EGFR-amplifizierten und
EGFRvIII-positiven Glioblastomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Katrin Liffers
aus Kleve

Hamburg 2015

Tag der Disputation: 22.05.2015

Gutachter: Frau Prof. Dr. Katrin Lamszus
Herr PD Dr. Andreas Pommerening-Röser

Vorsitzende: Frau Prof. Dr. Julia Kehr

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Universität Hamburg

Betreuer: Frau Prof. Dr. Katrin Lamszus
 Herr PD Dr. Andreas Pommerening-Röser

Hamburg, den 02.10.2014



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Hirntumore	1
1.1.1	Das Glioblastom (<i>Glioblastoma multiforme</i>)	4
1.1.2	Genetische Alterationen und zentrale Signalwege in Glioblastomen	7
1.2	Der EGF-Rezeptor und seine Bedeutung in der Glioblastom-Pathogenese	10
1.2.1	Der EGF-Rezeptor	10
1.2.2	Veränderungen des EGFR und der EGFR-vermittelten Signaltransduktion in Glioblastomen.....	11
1.2.2.1	Alterationen des EGFR Glioblastomen	12
1.2.2.2	Die Hauptsignalwege der EGFR- und EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion in Glioblastomen.....	15
1.3	Therapieansätze zur Behandlung von GBM	18
1.3.1	EGFR und EGFRvIII-gerichtete Behandlungsmethoden von GBM	21
1.3.2	Histondeacetylasen und ihre Inhibitoren	24
2	ZIELSETZUNG.....	29
3	METHODEN	30
3.1	Methoden der Zellkultur, Transfektionen und Tierexperimente	30
3.1.1	Zelllinien.....	30
3.1.2	Kultivierung und passagieren von Zellen	30
3.1.3	Kryokonservierung von Zellen (Einfrieren)	31
3.1.4	Auftauen von Zellen.....	32
3.1.5	Proliferations-Assay	32
3.1.6	Migrations-Assay	33
3.1.7	Knockdown	34
3.1.8	Kolonie-Formations-Assays.....	34
3.1.9	RGB-Markierung von Zellen.....	35
3.1.10	Tierexperimente	38
3.2	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.1	DNA-Isolation aus Zellen.....	40
3.2.2	RNA-Isolation aus Zellen	40
3.2.3	Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration.....	40

3.2.4	cDNA-Synthese mittels reverser Transkription.....	40
3.2.5	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	41
3.2.5.1	TaqMan-PCR	42
3.2.5.2	SYBR Green I PCR	44
3.2.6	RTK-Array Analysen.....	45
3.2.7	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH)	45
3.3	Proteinbiochemische Methoden	46
3.3.1	Proteinisolation.....	46
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-Page)	47
3.3.3	Western Blot	47
3.3.4	Entfernung gebundener Antikörper (Strippen)	49
3.3.5	Magnetic Cell Sorting (MACS)	49
3.3.6	Durchflusszytometrie.....	49
3.4	Histologische Methoden	51
3.4.1	Histologische Untersuchungen mittels H&E-Färbung	51
3.4.2	Immunhistologische Färbung	52
3.5	Auswertung und Statistik.....	53
4	ERGEBNISSE.....	54
4.1	Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf BS153-Zellen.....	54
4.1.1	Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die Proliferation von BS153-Zellen	55
4.1.2	Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die Migration von BS153-Zellen	56
4.1.3	Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion von BS153-Zellen	57
4.2	Chronische Behandlung von BS153-Zellen mit TKI: Etablierung einer Erlotinib-resistenten Zelllinie .	59
4.3	Charakterisierung des wtEGFR- und EGFRvIII-Status von Erlotinib-resistenten BS153^{resE}-Zellen (BS153^{resE})	60
4.3.1	Morphologie und RTK-Status von BS153 ^{resE} -Zellen.....	60
4.3.2	Aktivität von Proteinen der HER-Familie in BS153 ^{resE} -Zellen	62
4.3.3	EGFR-Status von BS153 ^{resE} -Zellen auf DNA-Ebene	63
4.3.4	WtEGFR- und EGFRvIII-Status von BS153 ^{resE} -Zellen auf mRNA-Ebene.....	64
4.3.5	WtEGFR- und EGFRvIII-Status von BS153 ^{resE} -Zellen auf Protein-Ebene	65
4.4	Tumorinitiationskapazität von BS153^{resE}-Zellen	67
4.4.1	Tumorinitiationskapazität von BS153 ^{resE} -Zellen <i>in vitro</i>	67
4.4.2	Tumorinitiationskapazität von und BS153 ^{resE} -Zellen <i>in vivo</i>	68

4.5	Bedeutung des EGFR-Status für die Bildung von GBM und für die Ausbildung von BS153^{resE}-Zellen ..	69
4.5.1	RGB-Markierung von GBM-Zellen.....	71
4.5.2	Mechanismus der Erlotinibresistenz-Ausbildung	74
4.5.3	BS153-RGB- und U87MG-RGB-Xenograft-Maus-Modelle.....	76
4.6	Aktivität von Signalproteinen der EGFR-vermittelten Signaltransduktion in BS153- und BS153^{resE}-Zellen	78
4.6.1	Aktivität des PI3K-Akt und des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs in BS153 ^{resE} -Zellen.....	78
4.6.2	Aktivität der PI3K in BS153 ^{resE} -Zellen	79
4.6.3	Expression und Aktivität von PTEN in BS153 ^{resE} -Zellen	81
4.7	Die funktionelle Rolle von EGFRvIII und PI3Kp110δ für BS153^{resE}-Zellen.....	81
4.7.1	Die Bedeutung von EGFRvIII für die Proliferation von BS153 ^{resE} -Zellen.....	82
4.7.2	Die Bedeutung von EGFRvIII für die EGFR/EGFRvIII-vermittelte Signaltransduktion auf Proteinebene	83
4.7.3	Die Bedeutung von PI3K für die Proliferation von BS153 ^{resE} -Zellen.....	84
4.7.4	Die Bedeutung der PI3K(p110δ)-Aktivität für die Proliferation von BS153 ^{resE} -Zellen	85
4.8	Die Bedeutung von HDAC für die Proliferation, Migration und den wtEGFR/EGFRvIII-Status von GBM-Zellen	87
4.8.1	Einfluss von HDACi auf die Proliferation von GBM-Zellen	88
4.8.1.1	Einfluss von HDACi auf die Proliferation von wtEGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen	89
4.8.1.2	Einfluss von HDACi auf die Proliferation von GBM-Zelllinien mit unterschiedlichem wtEGFR/EGFRvIII-Status.....	93
4.8.2	Einfluss von HDACi auf die Migration von GBM-Zellen	98
4.8.3	Einfluss von HDACi auf den wtEGFR/EGFRvIII- und den Histonacetylierungs-Status von GBM-Zellen	100
4.8.3.1	Akute Auswirkungen einer HDACi-Behandlung auf den wtEGFR/EGFRvIII- und den Histonacetylierungs-Status von GBM-Zellen	101
4.8.3.2	Langfristige Auswirkungen einer HDACi-Behandlung auf den wtEGFR/EGFRvIII- und den Histonacetylierungs-Status von GBM-Zellen	104
5	DISKUSSION	106
5.1	Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf BS153-Zellen.....	106
5.2	Chronische Behandlung von BS153-Zellen mit TKI: Etablierung einer Erlotinib-resistenten Zelllinie	109
5.3	Charakterisierung des wtEGFR- und EGFRvIII-Status in Erlotinib-resistenten BS153-Zellen (BS153^{resE})	111
5.4	Tumorinitiierungskapazität von BS153^{resE}-Zellen	114

5.5	Bedeutung des EGFR-Status für die Bildung von GBM und für die Ausbildung von BS153^{resE}-Zellen	115
5.6	Aktivität von Signalproteinen der EGFR-vermittelten Signaltransduktion in BS153- und BS153^{resE}-Zellen	120
5.7	Die funktionelle Rolle von EGFRvIII und PI3Kp110δ für BS153^{resE}-Zellen	123
5.8	Die Bedeutung von HDAC für die Proliferation, Migration und den wtEGFR/EGFRvIII-Status von GBM-Zellen	126
5.8.1	Einfluss von HDACi auf die Proliferation von GBM-Zellen	127
5.8.2	Einfluss von HDACi auf die Migration von GBM Zellen	130
5.8.3	Einfluss von HDACi auf den wtEGFR/EGFRvIII und den Histonacetylierungsstatus von GBM Zellen	132
5.9	Ausblick	134
6	ZUSAMMENFASSUNG	137
6.1	Summary	139
7	ANHANG	139
7.1	Materialien	139
7.1.1	Laborgeräte	139
7.1.2	Verbrauchsmaterialien	140
7.1.3	Kits	141
7.1.4	Chemikalien	141
7.1.4.1	EGFR-Inhibitoren	143
7.1.4.2	HDAC Inhibitoren	144
7.1.5	PI3K Inhibitoren	145
7.1.6	Lösungen und Puffer	145
7.1.7	Medien für die Zellkultur	145
7.2	Ergebnisse der bioinformatischen RTK-Array-Auswertung	146
7.3	Publikationsverzeichnis	149
7.3.1	Zeitschriftenbeiträge	149
7.3.2	Vorträge und Posterpräsenstationen	149
7.4	Abkürzungsverzeichnis	151
7.5	Literaturverzeichnis	155

DANKSAGUNG..... 1

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG..... 1

1 Einleitung

1.1 Hirntumore

Jährlich werden bei etwa 273.000 Menschen weltweit Tumore des Gehirns und des zentralen Nervensystems (ZNS) diagnostiziert. In Deutschland liegt die Inzidenzrate bei Männern mit 6,2 Fällen pro 100.000 Einwohnern etwas höher als die Inzidenzrate von 4,5 Fällen pro 100.000 Einwohnern bei Frauen (1). Tumore des Gehirns und des ZNS gehören bei Erwachsenen zu den seltenen Tumorarten, wohingegen sie bei Kindern die am häufigsten vorkommende Form von soliden Tumoren sind (2). Zu ihnen zählen sowohl alle aus Gehirnzellen hervorgehenden Neoplasien, als auch Neoplasien der Meningen, der Sellaregion, sowie der Cranialnerven (nervi craniales) und der Spinalnerven (nervi spinales) (2). Gehirntumore mit hirneigenem Ursprung werden als primäre Tumore bezeichnet, wohingegen sekundäre Neoplasien Metastasen anderer Tumore darstellen. (3). Mit einem Anteil von etwa 30-40 % sind Gliome die am häufigsten diagnostizierten intrakraniellen primären Hirntumore (4). Sie zeigen sowohl morphologische, als auch histologische und immunhistochemische Differenzierungsmerkmale von Gliazellen. In Abhängigkeit ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu den verschiedenen Gliazelltypen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen) werden Gliome in Astrozytome, Oligodendrogliome oder Ependymome unterteilt, wobei auch Mischformen wie Oligoastrozytome und glioneuronale Tumore vorkommen (Abbildung 1) (5). Alle Gliomformen können *de novo* (spontan) entstehen oder in Form eines Rezidivs auftreten, welches sich auch in Folge einer Progression aus einem vormals niedermalignen (weniger bösartigem) Hirntumor entwickeln kann (6).

Wie alle Tumorerkrankungen können auch Gliome mit Hilfe des ICD-O Codes (Code der international classification of diseases for oncology) in Abhängigkeit ihrer Malignität, ihrer Topographie und ihrer Morphologie erfasst werden (Abbildung 1) (7). Zur genaueren Klassifizierung werden Gliome seit 1979 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in vier Gruppen (WHO-Grad I-IV) eingestuft, welche den Malignitätsgrad widerspiegeln [Gruppe I benigne (gutartige) bis Gruppe IV hoch maligne Gliome] (Abbildung 1) (8, 9). Die Einteilung der Gliome erfolgt hierbei aufgrund von Merkmalen wie Pleomorphie („Mehrgestaltigkeit“), Angiogenese (Gefäßneubildung), Proliferationsaktivität, Differenzierungsgrad oder dem Vorhandensein von nekrotischem Gewebe (8).

Gliom		WHO Grad				ICD-Code	Inzidenz [je 100.000 Einwohner]	Alters-gipfel [Jahre]	5 jährige Überlebensrate [%]
		I	II	III	IV				
Astrozytäre Gliome	pilozytisches Astrozytom	x				9421/1	0,37 (2, 8)	19,6 (10)	94,4 (2)
	diffuse Astrozytom		x			9400/3	0,14 (8)	34,5 (8)	47,3 (2)
	pleomorphes Xanthoastrozytom		x			9424/3	0,06 (2)	14 (11)	80 (12)
	anaplastisches Astrozytom			x		9401/3	0,37 (2)	54 (2)	26,5 (2)
	Glioblastom				x	9440/3	3,5 (8)	primär: 62 sekundär: 45 (8)	4,7 (2)
	Riesenzellglioblastom				x	9441/3	0,07 (13)	42 (8)	12,3 (13)
	Gliosarkom				x	9442/3	0,07 (14)	56 (8)	12,3 (14)
Oligodendrogliale Gliome	Oligodendrogliom		x			9450/3	0,27 (2)	43 (2)	79,1 (2)
	anaplastisches Oligodendrogliom			x		9451/3	0,11 (2)	49 (2)	50,7 (2)
Oligoastrozytäre Gliome	Oligoastrozytom		x			9382/3	0,09 (15)	39,8 (15)	70 (15)
	anaplastisches Oligoastrozytom			x		9382/3	0,09 (16)	44 (8)	57 (16)
Ependymale Gliome	Subependymom	x				9383/1	0,03 (17)	45,8 (18)	92 (19)
	myxopapilläres Ependymom	x				9394/1	0,07 (20)	36 (8)	91 (19)
	Ependymom		x			9391/3	0,25 (8)	34 (21)	74 (19)
	anaplastischen Ependymom			x		9392/3	0,04 (22)	8,2 (23)	48 (19)

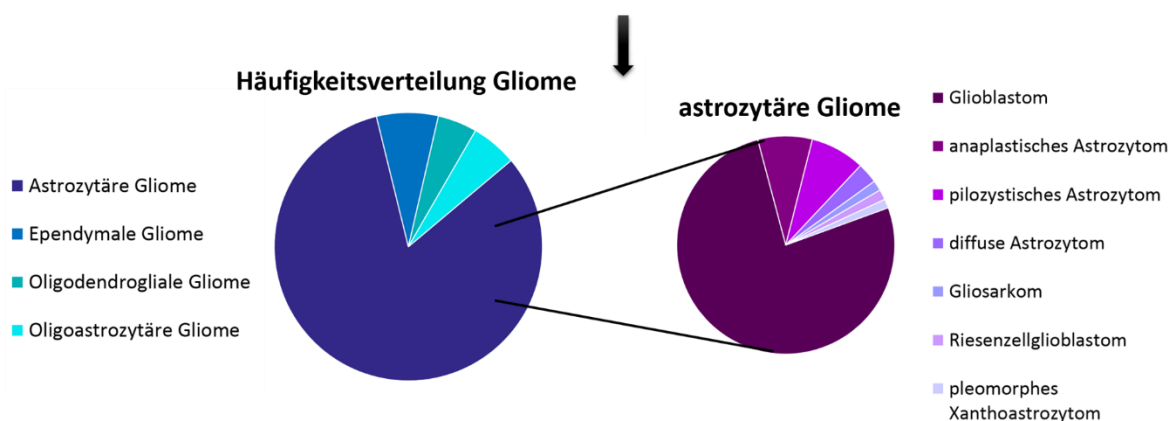


Abbildung 1 **Klassifizierung und Häufigkeiten sowie durchschnittliches Patientenalter und Überlebensprognose von Gliomen.** Astrozytäre Gliome bilden die größte und die am häufigsten auftretende Gruppe aller Gliome, wohingegen ependymale, oligodendrogliale und oligoastrozytäre Gliome weitaus seltener diagnostiziert werden. [Quellen: Gliomformen, WHO-Grad und ICD-Code (8) sonst wie angegeben]

Die vielfältigste und größte Gliomgruppe bilden die astrozytären Gliome (75 % aller Gliome), wobei das Glioblastom (GBM) das am häufigsten auftretende und gleichzeitig auch das maligneste aller Astrozytome ist. Auf das laut WHO als Grad IV eingestufte GBM sowie auf seine

Unterformen das Gliosarkom und das Riesenzell-GBM wird im Abschnitt 1.1.1 gesondert eingegangen (8).

Das langsam wachsende pilozytische Astrozytom (PA), welches von der WHO als Grad I Gliom eingestuft wurde, gehört ebenfalls zur Gruppe der astrozytären Gliome. Es ist das häufigste Gliom bei Kindern und Jugendlichen (Altersgipfel 10 Jahre), wobei das Durchschnittsalter erkrankter Patienten bei 19,6 Jahren liegt (10, 24, 25). Mit einer durchschnittlichen 5-jährigen Überlebensrate von 94,4 % haben Patienten eine günstige Prognose (2).

Das gut differenzierte und langsam wachsende diffuse Astrozytom (DA) wird von der WHO als Grad II Gliom eingestuft (8). An diesem Gliom erkrankte Patienten sind im Schnitt 34,5 Jahre alt und die 5-jährige Überlebensrate beträgt 47,3 % (2). Das DA zeichnet sich durch eine diffuse Infiltration benachbarter Hirnareale aus, weshalb eine vollständige Resektion nahezu unmöglich ist. Ferner bildet es häufig Rezidive und besitzt eine inhärente Tendenz zur Progression zum sekundären anaplastischen Astrozytom (WHO-Grad III) oder zum sekundären Glioblastom (GBM) (WHO-Grad IV) (5, 26).

Da eine vollständige Resektion des schnell und diffus wachsenden anaplastischen Astrozytoms (AA) (WHO-Grad III) kaum möglich ist (8, 27, 28), beträgt die mediane Überlebensdauer lediglich 3,3 Jahre (29) (5-jährige Überlebensrate 26,5 %) (2). Der Altersgipfel von AA-Patienten beträgt 40-60 Jahre. Bei jüngeren Patienten geht das AA bevorzugt durch Progression aus einem diffusen Astrozytom hervor, wohingegen es bei älteren Patienten zumeist *de novo* entsteht (30, 31). Prinzipiell haben AA ein hohes Potential, sich zu einem sekundären GBM zu entwickeln (mediale Progressionsdauer: 2 Jahre) und neigen dazu, über den Liquor cerebrospinalis zu streuen (29-31) .

Neben den bereits beschriebenen Gliomen, gehören auch die nur sehr selten vorkommenden subependymalen Riesenzellastrozytome (WHO-Grad I), die pilomyxoiden Astrozytome (WHO-Grad II) und das pleomorphe Xanthoastrozytom (WHO-Grad II) zur Gruppe der astrozytären Gliome (8).

Oligodendrogliale Tumore machen 5 % aller Gliome aus und werden in Oligodendrogliome (OD) (WHO-Grad II) und anaplastische Oligodendrogliome (AOD) (WHO-Grad III) unterteilt (8, 32). Das deutlich schneller wachsende und Nekrosen aufzeigende AOD kann sowohl aus den niedermalignen OD hervorgehen, als auch *de novo* entstehen (8, 33-35). Die diffus wachsenden oligodendroglialen Tumore treten zumeist zwischen dem 33. und 55. Lebensjahr auf (32, 36). Patienten mit einem OD haben eine 5-jährige Überlebensrate von 79,1 % (2), wohingegen im Schnitt nur 50,7 % aller AOD-Patienten nach fünf Jahren noch leben (2).

Bei oligoastrozytären Tumoren handelt es sich um Mischgliome, welche sowohl Zellen mit oligodendroglialer- als auch Zellen mit astrozytärer-Differenzierung aufweisen. Sowohl das langsam wachsendere Oligoastrozytom (OA) (WHO-Grad II), als auch das deutlich schneller wachsende und malignere anaplastische Oligoastrozytom (AOA) (WHO-Grad III) zeigen ein diffuses Wachstum. Oligoastrozytäre Tumore treten zumeist im Alter von 30-50 Jahren auf, wobei AOA sowohl primär als auch in Folge einer Progression eines OA auftreten können (8, 37, 38) (5-jährige Überlebensrate OA: 70 % (15), AOA: 57 % (39)).

Ependymale Gliome gehören mit einer Häufigkeit von 2-6 % zu den seltenen Gliomen des Gehirns, wohingegen sie die häufigsten intramedullären Tumore des Rückenmarks darstellen (4). Es werden vier verschiedene ependymale Gliome unterschieden, die sehr langsam wachsenden und gut abgegrenzten myxopapillären und subependymalen Ependymome (beide WHO-Grad I), sowie das ebenfalls gut abgegrenzte, langsam wachsende und differenzierte Ependymom (WHO-Grad II) und das relativ schnell und infiltrativ wachsende anaplastische Ependymom (WHO-Grad III) (8, 40). Bei Kindern liegt der Altersgipfel bei 6,4 Jahren und im Erwachsenenalter bei 30-40 Jahren (8). Kinder erkranken zumeist an Grad III Ependymomen welche überwiegend intrazerebral lokalisiert sind und haben in der Regel nur eine sehr schlechte Überlebensprognose. Jugendliche und Erwachsene erkranken hingegen vorwiegend an ependymalen Gliomen des Grades I oder II welche meistens im Rückenmark oder im Filum terminale lokalisiert sind. Zudem haben sie eine deutlich bessere Überlebensprognose als Kinder (40-42).

1.1.1 Das Glioblastom (*Glioblastoma multiforme*)

Glioblastome (GBM) bilden mit 15,6 % nach den Meningiomen die zweit größte Gruppe aller (benignen und malignen) Tumore des Gehirns und des zentralen Nervensystems (ZNS) und sind mit 54,4 % die bei weitem am häufigsten vorkommenden Gliome (2). Die Inzidenzrate des von der WHO als Grad IV eingestuften Glioms beträgt 3,19, wobei Männer 1,57mal häufiger an GBM erkranken als Frauen (Inzidenz 3,97:2,53) (2, 8). Kinder (0-19 Jahre) erkranken mit einer Inzidenzrate von 0,19 hingegen nur sehr selten an GBM (2).

Primäre GBM entstehen *de novo* und sind bevorzugt in der Konvexität der Großhirnhemisphären (insbesondere fronto-temporal) lokalisiert, können sich aber auch in tiefen Mittellinienstrukturen manifestieren (43). Der Altersgipfel von Patienten mit einem primären GBM beträgt 62 Jahre wobei Männer rund 3mal häufiger erkranken als Frauen (8, 44-46). Die Äthologie von primären GBM ist bis heute weitestgehend unbekannt. Da GBM molekulargenetisch heterogen sind, und nur bei 5 % aller GBM-Patienten eine familiäre

Vorbelastung besteht (47), ist kein für alle Patienten geltender „molekularbiologischen Auslöser“ bekannt (48). Einzig ionisierende Strahlung, welche die DNA-Struktur schädigt, scheint die Entstehung von GBM zu begünstigen (49).

Im Gegensatz zu primären GBM gehen sekundäre GBM aus vormals niedermaligneren Gliomformen hervor, wobei folgende Progressionswege bekannt sind: (i) vom diffusen Astrozytom zum sekundären GBM, (ii) vom diffusen Astrozytom über die Zwischenstufe eines sekundären anaplastischen Astrozytoms zum GBM (iii) sowie über die Progression eines *de novo* entstanden anaplastischen Astrozytoms zum GBM (Abschnitt 1.1.2, Abbildung 2) (43, 50). Patienten mit einem sekundären GBM (Altersgipfel: 45 Jahre) sind zumeist etwas jünger als Patienten mit einem primären GBM, wobei Frauen rund 3mal häufiger erkranken als Männer (8, 44, 51).

Ein besonderes Merkmal von GBM ist ihr überaus schnelles Wachstum und die diffuse Infiltration benachbarter und ferner Hirnareale. Da GBM-Zellen bevorzugt entlang von myelinisierten Bahnen wie dem Balken (Corpus callosum) migrieren, infiltrieren sie auch die kontralaterale Hemisphäre und können sich in Form beidseitiger „Schmetterlingsgliome“ manifestieren (43). Aufgrund der Wachstumseigenschaften von GBM ist eine vollständige Resektion des Tumors nicht möglich, weshalb die durchschnittliche Überlebensprognose von Patienten trotz Behandlung (Resektion, Chemo- und Radiotherapie) lediglich 14 Monate (52, 53) und die 5-jährige Überlebensprognose nur 4,7 % beträgt (2). Generell scheint sich ein junges Patientenalter (5-jährige Überlebensrate, 0-19 Jahre: 22,2 % versus 55-64 Jahre: 3,8 %) (2) sowie ein guter Karnofsky-Index (KPS) (Patienten Alter > 16 Jahre) bzw. Lansky-Index (Alter < 16 Jahre), welche den physischen Zustand von Patienten beschreiben (54, 55), günstig auszuwirken, wohingegen das Geschlecht keinen Unterschied zu machen scheint (45, 51, 54, 56).

In Abhängigkeit von der Größe und Lage der Neoplasie, können GBM sehr unterschiedliche Symptome wie Übelkeit und Erbrechen, Kopfschmerzen oder Krampfanfälle hervorrufen. GBM können ferner Persönlichkeitsstörungen verursachen oder zu Funktionsstörungen an anderen Körperstellen, sogenannten fokalen neurologischen Defiziten führen. Beispiele hierfür sind eine gestörte Motorik von Gliedmaßen, eine Beeinträchtigung der Sehkraft sowie der Gesichtsmuskulatur oder verminderte bzw. verstärkte Wahrnehmung von Sinneseindrücken (43, 48, 52). Die Diagnose von GBM erfolgt in der Regel über eine Magnetresonanztomographie (MRT) Untersuchung (43).

Histologisch zeichnen sich GBM durch zelluläre und nukleäre Atypien, hyperchromatische Nuklei, eine hohe Mitoserate, eine verringerte Apoptoserate, Neoangiogenese, sowie durch nekrotische Areale und eine ausgeprägte Anaplasie (Dedifferenzierung) aus, welche sich in einem geringem

Differenzierungsgrad oder dem Verlust differenzierter Zellen äußert (43, 57, 58). Aufgrund von histologischen Eigenarten unterscheidet die WHO das GBM von den ebenfalls als Grad IV eingestuften Riesenzell-GBM und dem Gliosarkom (8). Die zumeist im Temporallappen lokalisierten Riesenzell-GBM (2-5 % aller GBM (59-61)) zeichnen sich histologisch durch bizarr geformte, mehrkernige Riesenzellen mit oft stark ausgeprägtem Retikulinnetzwerk (62). Der Altersgipfel von Riesenzell-GBM-Patienten liegt bei 51 Jahren, wobei Männer etwas häufiger erkranken (59,6 % aller Patienten) und die 5-jährige Überlebensrate mit 12,3 % etwas besser als die von GBM-Patienten ist (13).

Bei Gliosarkomen handelt es sich um eine relativ gut begrenzte biphasische Variante des GBM, welche gliale und mesenchymale Merkmale aufweist (63). Gliosarkome zeigen viele der für GBM typischen genetischen Aberrationen und chromosomalen Instabilitäten. Sie sind bevorzugt im Temporallappen (64-66), aber auch im Frontallappen lokalisiert (67, 68). Bei 1,8-2,8 % aller diagnostizierten GBM handelt es sich um Gliosarkome (64), wobei Männer etwas häufiger erkranken als Frauen (Verhältnis 1,6:1) (64, 67) und die Prognose von Gliosarkompatienten mit 6,25-11,5 Monaten etwas schlechter ist als die von GBM-Patienten (64-68).

Allen GBM-Varianten gemein ist eine extrem niedrige Metastasierungsrate. Da nur 0,4-0,5 % aller GBM Metastasen in sekundären Organen bilden (z.B. in den Knochen, den Lymphknoten oder der Leber) (69-71), wurde bisher bezweifelt, ob GBM-Zellen überhaupt in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden und in umliegendes Gewebe vorzudringen um dort anzuwachsen (72, 73). In jüngsten Studien konnten jedoch bei 20,6 % aller GBM-Patienten zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells, CTC) im peripheren Blut nachgewiesen werden (74). Die absolute Zahl an CTC war hierbei mit 1-22 pro 2 Millionen mononukleärer Blutzellen vergleichbar mit der Menge an CTC bei Patienten mit anderen soliden Tumoren (75). Da ferner ein überraschend hoher Anteil von 10-20 % aller Transplantationspatienten deren Spender GBM-Patienten waren, extrakranielle GBM-Tumore in den transplantierten Organen ausbilden (76), legt dies die Vermutung nahe, dass die Überlebensspanne von GBM-Patienten für eine Manifestierung von Metastasen schlicht zu gering ist oder dass die Manifestierung durch das Immunsystem unterbunden wird (74).

Neben histologischen Unterschieden, zeichnen sich GBM auch durch eine Reihe molekularbiologischer Veränderungen aus, welche gesondert im nachfolgenden Abschnitt 1.1.2 besprochen werden.

1.1.2 Genetische Alterationen und zentrale Signalwege in Glioblastomen

Primäre und sekundäre GBM zeichnen sich durch ein großes Spektrum an typischen molekularbiologischen Veränderungen aus. Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrem Genotyp sondern auch hinsichtlich ihres Promotor-Methylierungsmusters, ihres RNA-Expressionsprofils und ihres Proteoms (Abbildung 2). Obwohl bisher keine für alle GBM gültige genetische oder zelluläre Ursache für die Entstehung von GBM gefunden werden konnte, scheint es einige genomische Veränderungen zu geben, welche die *de novo* Entstehung von primären GBM begünstigen oder die Progression zu sekundären GBM vorantreiben (Abbildung 2)(50, 51).

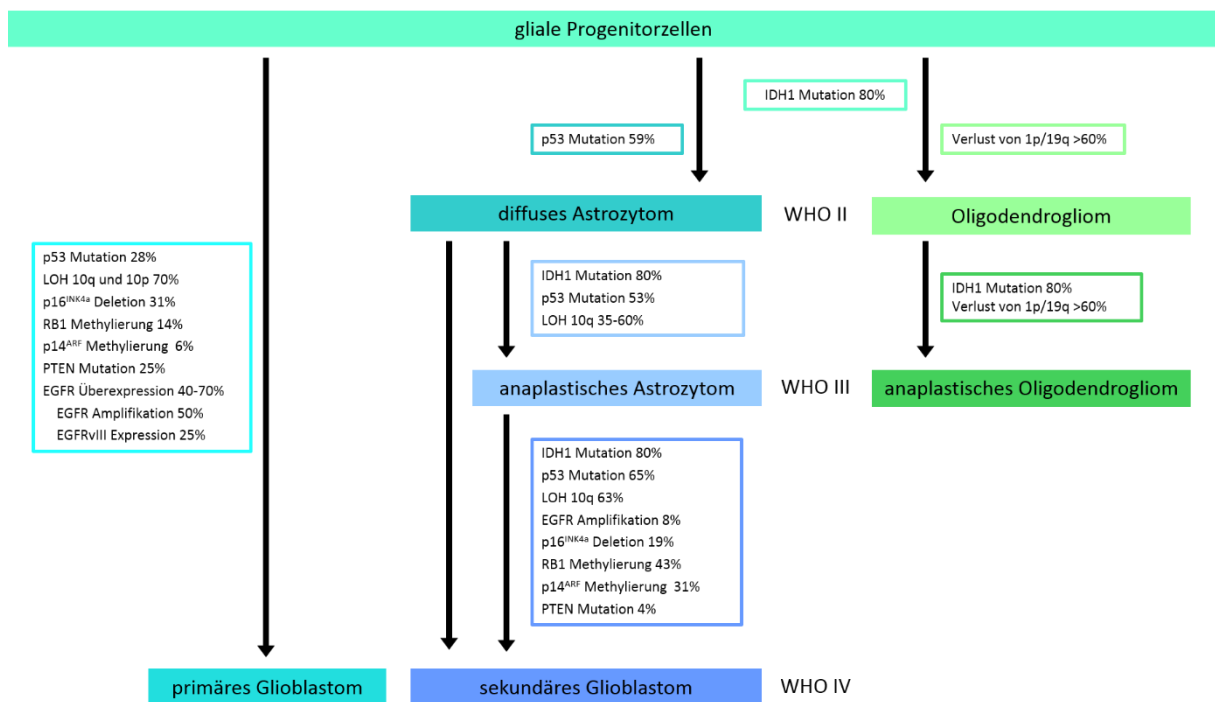


Abbildung 2 Progression und genomische Alterationen von Gliomen. Primäre GBM entstehen *de novo*, wobei insbesondere Veränderungen des Chromosoms 10 die Bildung eines GBM begünstigen. Sekundäre GBM gehen durch Progression aus niedermaligneren Gliomen hervor. Eine Reihe genomischer Veränderungen ist hierbei häufig charakteristisch für die einzelnen Progressionsstufen.

Neben einer Vielzahl genetischer Alterationen (77, 78) ist der Verlust ganzer Genomabschnitte (79-84), auf welchen häufig Tumorsuppressorgene liegen (84), typisch für GBM (Abbildung 2). Die häufigste genetische Alteration ist der Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 10 (LOH10), wobei die Loci 10p14-p15, 10q23-24 und 10q25-p besonders oft deletiert sind (85-88). Rund 70 % aller primären GBM zeichnen sich durch den Verlust einzelner Loci oder kompletter Chromosomarme (10p und 10q) aus. In 63 % aller sekundären GBM liegt eine Deletion einzelner Loci oder der Verlust des Chromosomarms 10q vor (44, 50, 85-87, 89).

Besonders interessant ist hierbei der Verlust des Lokus 10q15-p, welcher bei diffusen und anaplastischen Astrozytomen nicht auftritt und im direkten Zusammenhang mit der Progression zum sekundären GBM steht (44, 90, 91) (Abbildung 2). Häufig enthalten deletierte Loci Tumorsuppressorgene, welche für Proteine der DNA-Reparatur oder der Zellzyklus-Kontrolle kodieren. Die Expression von Proteinen kann jedoch nicht nur durch eine chromosomale Aberration, sondern auch durch epigenetische Modulationen, wie der Hypermethylierung von Promotoren, verhindert werden (50). Ein typisches Beispiel hierfür ist der $p16^{\text{INK4a}}$ /RB1(Retinoblastoma 1)-Signalweg, welcher sowohl aufgrund einer Gen-Deletion als auch infolge einer Promotormethylierung in GBM häufig fehlreguliert ist (50, 51). Im gesunden Gewebe inhibiert $p16^{\text{INK4a}}$ den CDK4 (cyclin-dependent kinase 4)/Cyclin D1-Komplex, welcher wiederum RB1 phosphoryliert und damit die Abspaltung des Transkriptionsfaktors E2F von RB1 induziert, welcher für die Expression von Genen der G₁/S-Phasen-Transition verantwortlich ist (92). In 31 % aller primären GBM ist das $p16^{\text{INK4a}}$ -Gen (44) deletiert, wohingegen der $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotor in 3 % (50, 93) und der RB1-Promotor in 14 % aller Fälle hypermethyliert ist (94). In sekundären GBM liegt in 19 % aller Fälle eine Deletion des $p16^{\text{INK4a}}$ -Gens (44) oder eine Hypermethylierung des $p16^{\text{INK4a}}$ -Promotors vor (50, 93), wohingegen der RB-1-Promotor sogar in 43 % aller sekundären Tumore hypermethyliert (94). Die beschriebenen genetischen Modulationen spiegeln sich in einer stark gesteigerten Proliferation der betroffenen GBM-Zellen wider (92). Da eine Promotormethylierung von RB1 weder in diffusen noch in anaplastischen Astrozytomen nachgewiesen werden konnte, scheint es sich hierbei um ein spätes Ereignis in der GBM-Pathogenese zu handeln (94). Ob und inwiefern sich die beschriebenen Aberrationen auf die Überlebensprognose von GBM-Patienten auswirken, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (44, 51, 95).

Neben den bereits genannten zellulären und genomischen Veränderungen scheint vor allem der p53/MDM2/p14^{ARF}-Signalweg von großer Bedeutung für die Entstehung von sekundären GBM zu sein (50, 51). In nicht transformierten Zellen induziert p53 unter anderem die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren und ist auf diese Weise nicht nur an der Regulation der Zelldifferenzierung, der Neovaskularisierung und der Apoptose beteiligt, sondern spielt vor allem durch die Induktion der p21^{Waf/Cip1}-Expression eine entscheidende Rolle bei der Zellzykluskontrolle und der DNA-Reparatur (92, 96, 97). P53 selber wird durch die Bindung von p14^{ARF} stabilisiert, wohingegen MDM2 die Degradation von p53 (Wildtyp und Mutante (98, 99)) induziert (97). In 65 % aller sekundären GBM ist TP53 mutiert, wobei in 57 % dieser Fälle die Codons 248 und 273 betroffen sind (44). Da ferner bereits 59 % aller diffusen und 53 % aller anaplastischen Astrozytome eine TP53 Mutation aufweisen, scheint es sich hierbei um ein

frühes, entscheidendes Ereignis bei der Entstehung von Astrozytomen und sekundären GBM zu handeln (44) (Abbildung 2). Bei primären GBM tritt eine Mutation des TP53-Gens mit 28 % weitaus seltener auf. Sie betrifft lediglich in 17 % die Codons 248 oder 273 und scheint auf die allgemeine genomische Instabilität von Tumorzellen zurückzuführen zu sein (50). Ob sich eine TP53-Mutation auf die Prognose von GBM-Patienten auswirkt, wird derzeit noch diskutiert (51). Neben einer TP53-Mutation ist auch eine homozygote Deletion des $p14^{ARF}$ -Gens (76 % aller GBM) (93) oder die Hypermethylierung des $p14^{ARF}$ -Promotors (primäre GBM: 6 %, sekundäre GBM: 31 %) (50), welche sich in einem Verlust der $p14^{ARF}$ -Proteinexpression äußern, charakteristisch für GBM. Weitaus seltener tritt eine Amplifikation von MDM2 auf (< 10 %) (100), wobei diese lediglich in primären GBM vorliegt, welche keine TP53-Mutation aufweisen (100, 101).

Die somatische Mutation des Isozitat Dehydrogenase (IDH) 1 Gens (102) ist eine der häufigsten genetischen Alterationen in sekundären GBM (Häufigkeit > 80 %) (103-105) und bei Tumoren mit intakter IDH1 liegt häufig eine Mutation der IDH2 vor (106). Das zytosolische Genprodukt der IDH1 katalysiert die oxydative Phosphorylierung von Isozitat zu α -Ketoglutarat und spielt somit eine Schlüsselrolle im Zitratzyklus (107). Eine Mutation der IDH1 [R132H (in der aktiven Tasche), analog R172H der IDH2], resultiert in einer verminderten Substrataffinität und inhibiert über die Bildung von enzymatisch inaktiven Heterodimeren die Aktivität intakter IDH1-Proteine (108). Da eine IDH1-Mutation nicht nur für sekundäre GBM typisch ist, sondern ebenso häufig in niedermaligneren Astrozytomen (WHO Grad II und III) sowie in oligodendroglialen und oligoastrozytären Gliomen vorliegt (103-105, 109), deutet auf einen gemeinsamen Ursprung der genannten Gliome hin (Abbildung 2) und darauf, dass die Mutation der IDH1 ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung ist. Im Gegensatz zu sekundären GBM weisen primäre GBM nur in sehr seltenen Fällen eine Mutation der IDH1 auf (103-105, 109). Eine für primäre GBM typische genetische Alteration ist hingegen die Mutation des PTEN-Gens (Lokus 10q23) (110, 111), welches für einen negativen Regulator des PI3K-Akt-Signalwegs kodiert (primäre GBM: 25 %, sekundäre GBM: 4 % (50)) (112).

Die wohl häufigste genetische Veränderung von primären GBM ist die Überexpression von EGFR (epidermal growth factor receptor) (50 % aller primären GBM) sowie die Expression der konstitutiv aktiven Rezeptorvariante EGFRvIII (25 % aller EGFR überexprimierenden primären GBM). Da beide Rezeptoren sowie die EGFR-vermittelte Signaltransduktion zentrale Bestandteile dieser Arbeit sind, wird in dem Abschnitt 1.2 gesondert auf die Bedeutung von EGFR und EGFRvIII für GBM eingegangen.

1.2 Der EGF-Rezeptor und seine Bedeutung in der Glioblastom-Pathogenese

1.2.1 Der EGF-Rezeptor

Von besonderer Bedeutung für die Pathogenese von primären GBM ist der EGFR-Signalweg. Namensgebend für diesen Signalweg sind die Rezeptoren der EGFR/ErbB-Familie, zu denen der EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) gehören (113, 114), welche sich auf der Oberfläche von epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Zellen befinden (115). Zu den Liganden dieser Rezeptorfamilie gehören neben dem epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) auch andere Mitglieder der EGF-Familie wie beispielsweise HB-EGF (heparin binding EGF-like growth factor), Amphiregulin, oder TGF- α (transforming growth factor α) (116). Das für den EGFR codierende Gen besteht aus 26 Exonen, ist 110 kb lang und liegt auf dem Chromosom 7p11-13. Der Rezeptor selbst ist ein aus 1186 Aminosäuren (AS) (115) bestehendes Glykoprotein (115, 117, 118) das aus einer amino-terminalen, extrazellulären-Domäne mit Ligandenbindungsstelle, einer hydrophoben, α helikalen Transmembrandomäne und einer carboxy-terminalen intrazellulären-Domäne besteht (115) (Abbildung 3).

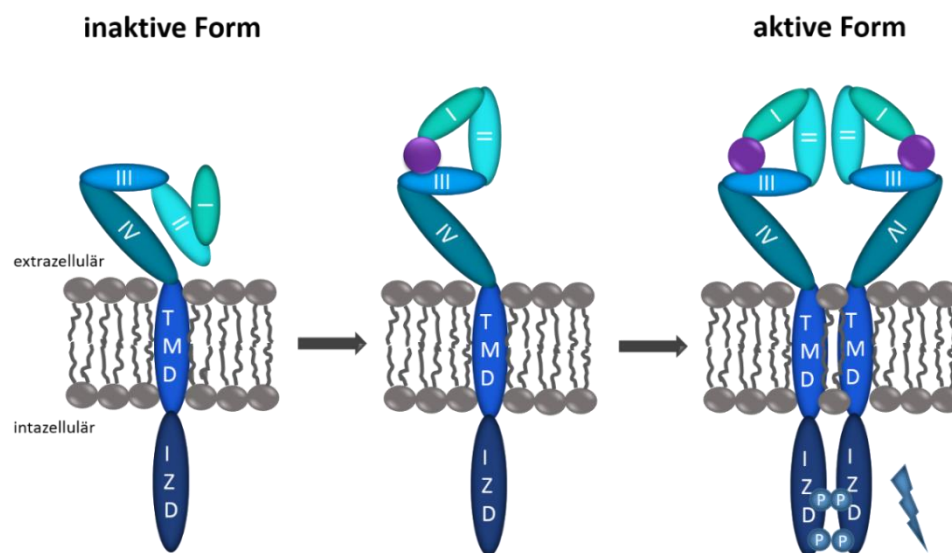


Abbildung 3 Konformationen des EGFR. Der EGFR besteht aus 4 extrazellulären Domänen (I-IV) einer Transmembrandomäne (TMD) sowie einer intrazellulären Domäne (IZD). In der inaktiven geschlossenen Konformation liegt keine Ligandenbindung vor. In der offenen aktiven Form bilden die Domänen I und III die Ligandenbindungsstellen. Nach erfolgter Ligandenbindung und Dimerisierung werden intrazelluläre Tyrosinreste trans- und autophosphoryliert was die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskade zu Folge hat.

Der intrazelluläre Teil des EGFR setzt sich aus drei Teilen zusammen, einer juxtamembran-Domäne, einem Abschnitt mit intrinsischer Tyrosinkinase (TK)-Aktivität und Src-Homologie-Domänen (SH) 1 Bindungsstellen, sowie einer dritten Domäne, welche fünf

Autophosphorylierungsmotive, SH2 und Phosphotyrosin-Bindungsstellen (phosphotyrosin binding site, PTB), drei internalisierungs-Motive sowie Bereiche für Transphosphorylierung, proteolytische Aktivierung und Degradierung enthält (115). Die extrazelluläre-Domäne besteht hingegen aus vier Domänen (I-IV) (117, 119) und kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen (117, 119-122) (Abbildung 3). In der geschlossenen, inaktiven Form verhindert eine intramolekulare Interaktion zwischen den Domänen II und IV die Interaktion der Domänen I und III welche bei Kontakt die Ligandenbindungstasche bilden (121, 122). In der offenen, aktiven Konformation (123, 124) ist die Interaktion der Domänen II und IV unterbrochen. Infolgedessen können die Domänen I und III die Ligandenbindungstasche bilden und das Dimerisierungsmotiv der Domäne II wird exponiert (117, 119). Beide Konformationen stehen im Gleichgewicht, wobei dieses in Abwesenheit des Liganden in Richtung der geschlossenen, inaktiven Form verschoben ist. Liegt hingegen eine Ligandenbindung vor, ist das Gleichgewicht zur offenen, aktiven Form hin verschoben (123, 124). In diesem Fall bildet der Rezeptor entweder Homodimere mit anderen EGFR (119, 120) oder aber Heterodimere mit EGFRvIII (125, 126), was wiederum zu einer Aktivierung der TK-Aktivität des EGFR führt. Infolgedessen werden multiple Tyrosinreste der zytoplastmatischen Domäne des EGFR auto- (113) oder transphosphoryliert (115, 127), an welche wiederum Effektorproteine über SH2- oder PTB-Domänen binden können. Auf diese Weise werden weitere Signalkaskaden aktiviert (128) und negative Regulationsmechanismen, wie die Rekrutierung von Ubiquitin-Ligasen, welche die Rezeptorinternalisierung und Degradation einleiten, induziert (129).

1.2.2 Veränderungen des EGFR und der EGFR-vermittelten Signaltransduktion in Glioblastomen

Bei der EGFR-vermittelten Signaltransduktion handelt es sich um einen pleiotrophen Signalweg. Dies bedeutet, dass in Abhängigkeit von der Rezeptor-Liganden bzw. der Rezeptor-Rezeptor-Kombination in verschiedenen Zellen eines Zellverbundes, aber auch innerhalb einer Zelle, unterschiedliche Signale ausgelöst werden (130). Auf diese Weise ist der EGFR-Signalweg an der Steuerung unterschiedlichster zellulärer Prozesse wie der Differenzierung (131), der Zellproliferation (132), -migration, -adhäsion und der Zellteilung, aber auch an der Kontrolle des Zellzyklus sowie apoptotischer- (133) und metabolischer-Prozesse (115) beteiligt. Im Folgenden soll auf verschiedene Deregulationsmechanismen des EGFR in GBM sowie auf die Hauptsignalwege des EGFR und der EGFR-Rezeptorvariante EGFRvIII eingegangen werden.

1.2.2.1 Alterationen des EGFR in Glioblastomen

Eine für primäre GBM charakteristische Aberration ist die Überexpression des EGFR (40-70 %), welche hingegen nur bei 10 % aller sekundären GBM auftritt (Abschnitt 1.1.2, Abbildung 2) (134). Die Überexpression des EGFR kann sowohl auf einer gesteigerten Translation als auch auf einer Amplifikation des EGFR-Gens beruhen (50) und resultiert in einer gesteigerten EGFR-vermittelten Signaltransduktion (128). 70-90 % aller GBM-Zellen mit einer EGFR-Überexpression weisen zusätzlich eine Genamplifikation auf, wobei eine Genamplifikation immer mit einer EGFR-Überexpression einhergeht (50, 135, 136). Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, ob sich die Auswirkungen einer EGFR-Amplifikation in GBM von denen einer gesteigerten EGFR-Translation, wie es bei Brustkrebs der Fall ist, unterscheiden (128, 137). Der Anteil EGFR-amplifizierter Zellen kann sowohl von Tumor zu Tumor als auch innerhalb eines Tumors erheblich schwanken und ist somit ein klassisches Beispiel für die inter- und intratumorale Heterogenität von GBM (138).

Neben der Amplifikation des EGFR-Gens und den in Abschnitt 1.1.2 beschriebenen typischen genetischen Alterationen in GBM-Zellen, sind vor allem Punktmutationen und Deletionen des EGFR von zentraler Bedeutung für die Pathogenese von GBM (77), wobei die Kinasedomäne des EGFR nur selten von genetischen Veränderungen betroffen ist (139, 140). Die am häufigsten auftretenden Punktmutationen R84K, A265V/D/T, P545L, G574V¹ liegen alle in der extrazellulären-Domäne des Rezeptors (117, 119) und sind in etwa 14 % aller GBM zu finden (140). Da sie die Interaktion der Domänen II und IV fördern und auf diese Weise die offene Konformation des Rezeptors begünstigen (117, 119) und zudem das Ligandenbindungsvermögen nicht beeinflussen, führen sie zu einer konstitutiv aktiven Variante des EGFR (140) (Abbildung 4).

¹ AS, Einbuchstaben-Code: R, Arginin; K, Lysin; A, Alanin; V, Valin; D, Asparaginsäure; T, Threonin; P, Prolin; L, Leucin; G, Glycin

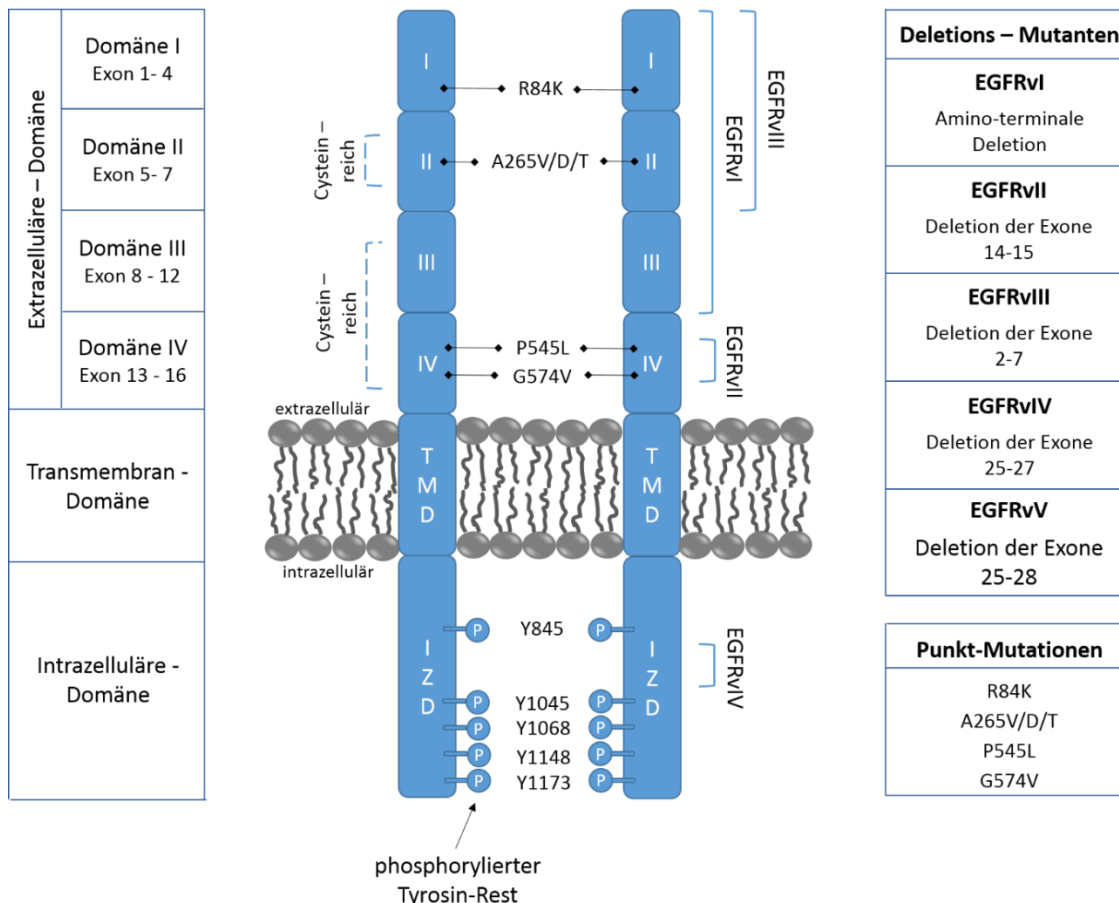


Abbildung 4 **Deletionsmutanten des EGFR**. Dargestellt sind die einzelnen Domänen des EGFR sowie häufig in GBM vorkommende Deletions-Mutanten (blaue Klammern: deletierte Bereiche) und Punkt-Mutationen.

Rezeptormutationen in Form einer Gen-Deletion können sowohl die extrazelluläre- als auch die intrazelluläre-Domäne des EGFR betreffen und resultieren in verkürzten, onkogenen Varianten des EGFR (128) (EGFRvI, EGFRvII und EGFRvIII (141, 142) bzw. EGFRvIV und EGFRvV, wobei „v“ für Variante steht (143)) (Abbildung 4). Deletionen der intrazellulären-Domäne treten mit einer Häufigkeit von 11-17 % in GBM auf (126, 144, 145) und führen vermutlich zu Defekten bei der Rezeptorinternalisierung (146). Die Rezeptorvarianten EGFRvI und EGFRvII kommen mit 12-16 % ähnlich häufig vor (126, 144, 145) und sind aufgrund ihrer Deletion nicht mehr in der Lage EGFR-Liganden zu binden (141, 142). Da sie jedoch nur eine verkürzte extrazelluläre-Domäne besitzen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie mit bisher unbekannten Liganden interagieren können (128).

Gleiches gilt für die mit Abstand am häufigsten auftretende EGFR-Deletionsmutante in GBM, dem EGFRvIII (141, 142), welcher in 25 % aller EGFR-amplifizierten GBM exprimiert wird (147, 148). Im Gegensatz zum Wildtyprezeptor sind bei EGFRvIII die Exone 2-7 (801 Basenpaare) deletiert, weshalb er auch als del2-7 EGFR bezeichnet wird (149). Diese Form der Deletion manifestiert sich in dem Verlust der extrazellulären-Domänen I und II (AS 6-273) (128, 150). Die Ursachen für diese spezifische Deletion konnten bisher nicht abschließend geklärt werden. Es ist

jedoch wahrscheinlich, dass eine Alu-Sequenz-vermittelte Rekombination der Introns 1 und 7 zu der Formation von EGFRvIII führt (151). Aufgrund der beschriebenen Deletion ist EGFRvIII nicht in der Lage, EGFR-spezifische Liganden zu binden, kann jedoch immer noch mit anderen EGFR dimerisieren (150). Da bei EGFRvIII rund 10 % aller intrazellulären Tyrosinreste (152), welche für die Signalweiterleitung von Bedeutung sind, phosphoryliert sind, handelt es sich bei EGFRvIII im Gegensatz zu den anderen EGFR-Deletionsmutanten um eine konstitutiv und somit permanent aktive Form des EGFR (150). Somit benötigt EGFRvIII zur Aktivierung der TK-Domäne weder einen Liganden, noch stellt die Bildung von Homodimeren oder von Heterodimeren mit EGFR, eine Voraussetzung für die EGFRvIII-vermittelte Signaltransduktion dar. Dennoch ist EGFRvIII ein wichtiger Partner des EGFR und die Bildung von EGFRvIII/EGFR Heterodimeren ist für die EGFR-abhängige Signaltransduktion und somit für die GBM-Pathogenese von zentraler Bedeutung.

In vitro- und *in vivo*-Experimente mit EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen haben gezeigt, dass die Expression von EGFRvIII nicht nur zu einer Steigerung des Tumorwachstums und der Tumorneovaskularisierung (153), sondern auch zu einer Zunahme der Zellproliferation (154), -Migration und -Invasion führte (155, 156). Ob die Expression von EGFRvIII mit einer schlechten Patientenprognose korreliert ist jedoch umstritten (157).

Im Gegensatz zu den Deletionsmutanten EGFRvI, EGFRvII, EGFRvIV und EGFRvV welche spezifisch für GBM sind, wurde EGFRvIII auch in einigen Fällen von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (non-small cell lung cancer, NSCLC) sowie in Brust- und Prostatatumoren nachgewiesen (158, 159) nicht aber in niedermalignen Astrozytomen.

Da die Expression von EGFRvIII in Mausmodellen nicht zu einer *de novo*-Bildung von primären GBM führte, sondern hierfür immer das Zusammenspiel mit anderen genetischen Aberrationen notwendig war, scheint es sich bei der EGFRvIII-Expression um ein GBM-förderndes nicht aber um ein GBM-induzierendes Ereignis während der GBM-Pathogenese zu handeln (128, 150).

1.2.2.2 Die Hauptsignalwege der EGFR- und EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion in Glioblastomen

Der PI3K-Akt-Signalweg ist ein für die Pathogenese von GBM entscheidender EGFR-gesteuerter Signalweg. Da er der Hauptsignalweg von EGFRvIII ist, weisen EGFRvIII-exprimierende GBM-Zellen, im Vergleich zu EGFRvIII-negativen GBM-Zellen, eine erhöhte Aktivität des PI3K-Akt-Signalwegs (160) und infolgedessen eine gesteigerte Proliferation sowie eine verminderte Apoptoserate auf (161) (Abbildung 5).

Sowohl durch den konstitutiv aktiven EGFRvIII, als auch infolge einer EGFR-Stimulation, wird die aus der katalytischen p110- (kodierendes Gen: PI3KCA) und der regulatorischen p85-Untereinheit (kodierendes Gen: PI3KR) bestehende Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert, welche die Phosphorylierung des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat [$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$] zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat induziert [$\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$] (162). $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ wiederum rekrutiert Akt (protein kinase B, PKB) zur Plasmamembran, wo es von PDK1 (pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isoenzyme 1) und mTor (mammalian target of rapamycin) an T308 respektive S473² phosphoryliert wird (163). Das nun aktive Akt bindet und phosphoryliert seinerseits weitere Signalproteine (bevorzugt 14-3-3 Proteine). In Abhängigkeit von den Akt-Zielproteinen ist der PI3K-Akt-Signalweg an der Steuerung unterschiedlichster zellulärer Prozesse beteiligt. Beispielhaft hierfür ist insbesondere die Steuerung des Zellzyklus über p27 (164), aber auch die Regulation der Apoptose, des Zellwachstums und des Metabolismus über Bcl2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2, Bcl2)/BAD (Bcl2-associated agonist of cell death, BAD), TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) bzw. GSK3 (glycogen synthase kinase 3) (165). Die Regulation des PI3K-Akt-Signalwegs erfolgt über Phosphatidylinositol Polyphosphatasen wie SHIP-1 und 2 (SH2 domain-containing inositol phosphatase 1/2) oder PTEN welche $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ zu $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ bzw. $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ dephosphorylieren (162). In 50 % aller GBM ist das PTEN Gen jedoch mutiert oder deletiert (50, 166) dies führt in den betroffenen Zellen zu einem $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ -Überschuss und infolgedessen zu einem unkontrollierten Zellwachstum und einer verminderten Apoptoserate (167). Mutationen oder Amplifikationen der PI3K treten hingegen nur sehr selten auf. Lediglich in rund 10 % aller GBM ist p85α mutiert (77) und in 5 % aller primären und 13 % aller sekundären GBM ist p110α von einer Mutation oder Amplifikation betroffen (168).

² AS, Einbuchstaben-Code: T, Threonin; S, Serin

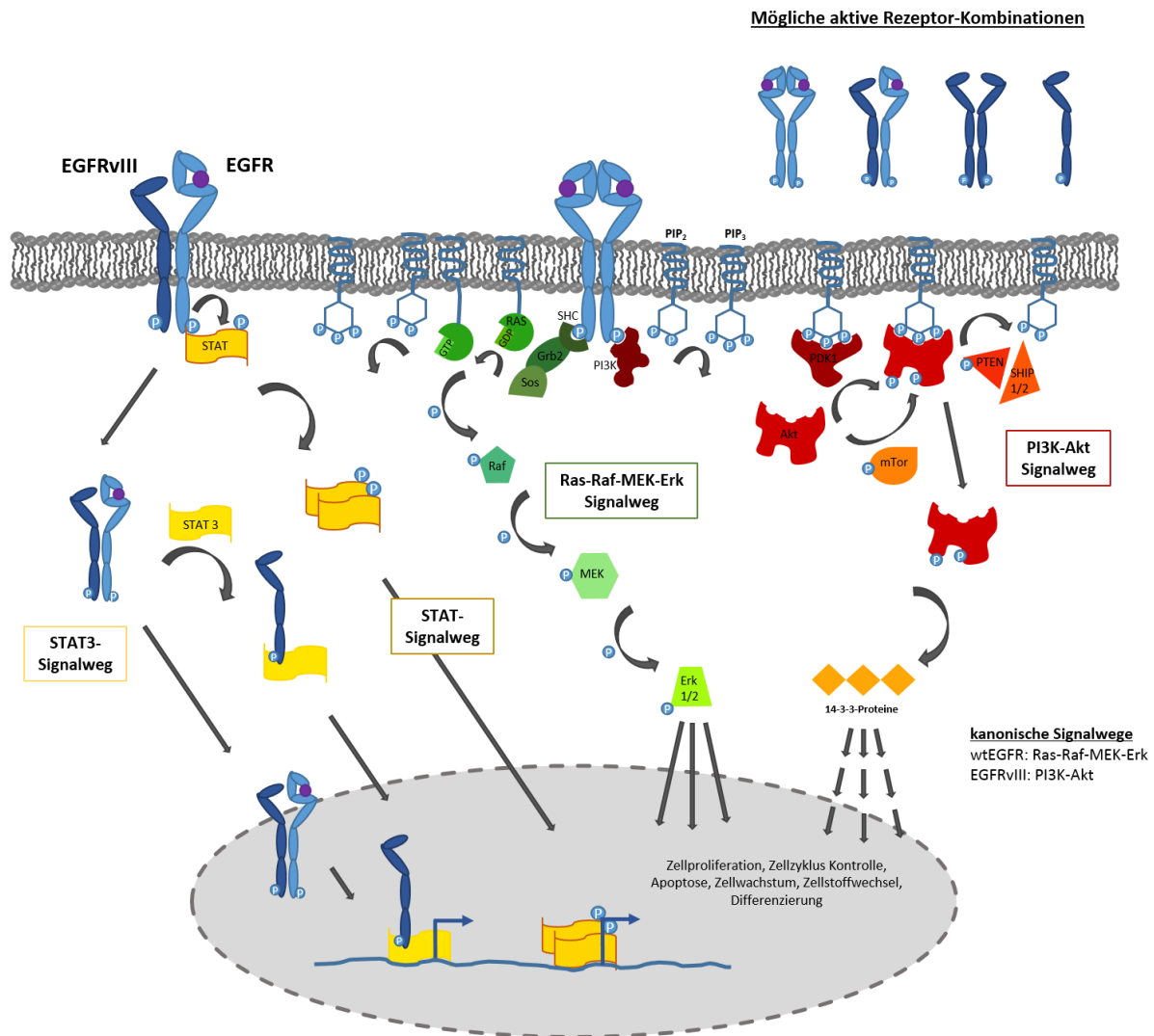


Abbildung 5 **Hauptsignalwege der EGFR-vermittelten Signaltransduktion.** wtEGFR und EGFRvIII Homo- und Heterodimere können die Ras-Raf-MEK-Erk- sowie den PI3K-Akt- und den STAT-Signalweg aktivieren. Alle Signalwege sind an der Regulation zentraler zellulärer Prozesse beteiligt. EGFRvIII kann über eine direkte Bindung an STAT3 auch als Transkriptionsfaktor fungieren.

Ein weiterer Aktivator der PI3K ist die kleine GTPase Ras (169), welche ferner eine zentrale Rolle im Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg einnimmt. Diese auch als Erk1/2-MAPK-Signalweg bezeichnete, EGFR/EGFRvIII-vermittelte Signaltransduktionskaskade (Abbildung 5) beeinflusst in GBM, ähnlich dem PI3K-Akt-Signalweg, zahlreiche zentrale zelluläre Prozesse. Nach der Aktivierung von EGFR bindet das Adapterprotein Grb2 entweder direkt an den phosphorylierten Tyrosinrest Y1086 oder indirekt über SHC (SH-Domäne beinhaltendes Adapterprotein, SH domain-containing adaptor protein) an die phosphorylierten Tyrosinreste Y1173 und Y1148 des EGFR (170) und bildet dort zusammen mit Sos (son of sevenless) den Grb2/Sos-Komplex. Im Falle des konstitutiv phosphorylierten EGFRvIII bindet Grb2 hingegen an die phosphorylierten Tyrosinreste Y1148 und Y1068 (171-174). Der Nukleotid Austausch Faktor Sos katalysiert im Folgenden die Aktivierung von Ras und startet auf diese Weise die aus Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma), MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) und Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase)

bestehende Signalkaskade (175-178). In EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen ist die Konzentration an aktivem Ras (173) und MEK (174) zwar deutlich erhöht, die Menge an aktivem Erk1/2 ist hingegen im Vergleich zu EGFRvIII-negativen GBM-Zellen kaum verändert (174, 179). Dies deutet auf eine negative Feedback-Regulation von Erk1/2 hin (174) und führt dazu, dass der Erk1/2-Signalweg in EGFRvIII-exprimierenden Zellen zwar keine erhöhte Aktivität aufweist, jedoch konstitutiv aktiviert ist (128).

Ein weiterer EGFR- und EGFRvIII-vermittelter Signalweg in GBM ist der STAT-Signalweg. Bei diesem Signaltransduktionsweg bindet STAT (signal transducer and activator of transcription) über seine SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste des aktiven EGFR, woraufhin der Rezeptor seinerseits die SH2-Domäne von STAT phosphoryliert. STAT wiederum bildet im folgenden Homo- oder Heterodimere (180, 181), transloziert in den Nukleus und induziert die Transkription von Genen des Zellüberlebens (179, 182, 183). Von besonderer Bedeutung für EGFRvIII-positive GBM-Zellen ist der STAT3-Signalweg. Anders als EGFR induziert EGFRvIII die Signaltransduktion nicht über eine direkte Phosphorylierung von STAT3 (179, 182, 183). Vielmehr scheint wtEGFR EGFRvIII zu phosphorylieren (184), woraufhin dieser einen Komplex mit STAT3 bildet und in den Kern transloziert (185). Dies legt die Vermutung nahe, dass EGFRvIII zusammen mit STAT die Transkription von bisher unbekannten Zielgenen steuert und somit die Rolle eines Transkriptionsfaktors übernehmen kann (186).

Neben der Überexpression von EGFR können auch autokrine und parakrine Mechanismen zu einer erhöhten EGFR-vermittelten Signalweiterleitung führen (128). In diesem Zusammenhang ist die Interaktion von EGFR und EGFRvIII von besonderer Bedeutung. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass EGFRvIII die Sekretion des EGFR-Liganden HB-EGF induziert (187, 188) und dass eine Korrelation zwischen EGFRvIII-Expression und TGF- α -Expression vorliegt (188). Auf diese Weise wird die EGFR-abhängige Signaltransduktion durch EGFRvIII autokrin bzw. parakrin stimuliert (187, 188). Ferner konnte gezeigt werden, dass EGFRvIII die Sekretion von LIF (leukemia inhibitor factor) und IL6 (Interleukin 6) induziert, welche ihrerseits an LIF respektive IL6-Rezeptoren benachbarter Zellen binden und auf diese Weise das membranständige gp130 aktivieren. Dieses kann im Folgenden den STAT3-Signalweg sowie über eine direkte Interaktion mit EGFR die EGFR-abhängige Signaltransduktion induzieren (187).

Eine weitere Möglichkeit der parakrinen und autokrinen Aktivierung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion stellt die Sekretion von ADAM 12 (a disintegrin and metalloprotease 12) dar, deren Menge in GBM häufig erhöht ist. ADAM12 ist in der Lage das an die extrazelluläre-Matrix gebundenen HB-EGF abzuspalten, welches im Folgenden an EGFR binden und die EGFR abhängige Signaltransduktion stimulieren kann (189).

Neben der Überexpression und der auto- bzw. parakrinen Stimulation des EGFR, können auch Defekte bei der Rezeptor-Internalisierung zu einer gesteigerten Signalweiterleitung führen. Nach der Aktivierung des EGFR und dessen unmittelbare Auto- und Transphosphorylierung, binden Cbl (Ubiquitin-Ligase) und SETA (SH3 domain-containing gene expressed in tumorigenic astrocytes, Cbl Adapterprotein) über den phosphorylierten Tyrosin-Rest (Y1045) an den Rezeptor und leiten dessen Ubiquitin-vermittelte Internalisierung und Degradation ein (190). Auf diese Weise wird die EGFR-Signalweiterleitung unterbrochen und eine permanente Aktivierung des Signalwegs verhindert (191). Da der konstitutiv aktive EGFRvIII im Vergleich zum aktivierten wtEGFR deutlich weniger phosphorylierte Tyrosinreste aufweist (152) und Y1045 statistisch hypophosphoryliert ist (154, 192), wird die direkte Bindung von Cbl unterbunden. Zwar kann Cbl über Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) an EGFRvIII binden, eine Polyubiquitinierung und somit eine Degradation des Rezeptors ist unter diesen Umständen jedoch nicht möglich (154). Eine sehr kleine Menge an EGFRvIII scheint dennoch internalisiert zu werden. Anders als der Wildtyprezeptor wird EGFRvIII jedoch nicht im Lysosom degradiert, sondern endosomal recycelt (154). Ferner muss die Frage, ob eine vermehrte Dimerisierung von EGFRvIII mit EGFR zu einer „gemeinsamen“ Internalisierung und Degradation führt noch geklärt werden.

1.3 Therapieansätze zur Behandlung von GBM

Trotz größter Bemühungen und intensiver Forschung ist der Durchbruch bei der Behandlung von GBM bisher ausgeblieben, so dass die durchschnittliche Überlebensdauer von behandelten GBM-Patienten bisher lediglich 14 Monate beträgt (193, 194). Ein Grund hierfür ist vor allem das schlechte Ansprechen von Patienten auf primäre Therapien aber auch die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Therapeutika. Die Wirksamkeit von Therapeutika wird unter anderem von der Blut-Hirn-Schranke (BHS) limitiert, welche aufgrund der Molekülgröße oder der Lipophilie von Medikamenten häufig nicht oder nur unzureichend überwunden werden kann. Der Erfolg einer GBM-Therapie wird ferner durch den aktiven Efflux von Therapeutika über membranständige Transporter (195), sowie durch die für GBM typische Hypoxie (196) maßgeblich beeinflusst. Desweiteren kann die gleichzeitige Gabe von Steroiden und Anti-Epileptika die Wirkung von GBM Therapeutika hemmen und Nebenwirkungen verstärken (197-199). Ein weiteres Problem bei der Behandlung von GBM ist die extreme inter- und intratumorale Heterogenität aufgrund welcher Patienten bzw. die Zellen eines GBM sehr unterschiedlich auf eine Behandlungsmethode reagieren können. Die derzeitige

Standardbehandlung von GBM ist ein von Stupp entwickelter Behandlungsansatz, welcher sich aus der Resektion des Tumorgewebes, gefolgt von einer postoperativen (adjuvanten) Strahlen- und Temozolomid (TMZ) –Therapie zusammensetzt (200).

Da gezeigt werden konnte, dass eine Resektion des Tumors von mehr als 98 % den Erfolg einer anschließenden Radio- und Chemotherapie begünstigt (201, 202), ist eine möglichst maximale Resektion von entscheidender Bedeutung für die Therapieeffizienz. Um die Randbereiche von GBM zu markieren und eine möglichst maximale Resektion des Tumors zu erzielen werden GBM-Zellen heutzutage häufig präoperativ mit 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) fluoreszenzmarkiert (203). Eine vollständige Resektion von GBM ist aufgrund des äußerst diffusen und infiltrativen Wachstums allerdings praktisch nie möglich. Durch eine suboptimale Resektion können jedoch die Tumorzellzahl reduziert und Massen-Effekte (z.B. intrakranieller Druck) verringert werden (48).

Die postoperative Bestrahlung erfolgt in der Regel in Form einer Strahlentherapie (external beam radiation therapy, EBRT) (Gesamtstrahlendosis von 60 Gy, bei Patienten >70 Jahren: 50 Gy (204, 205)) in Kombination mit einer Chemotherapie (Dauer: 6 Wochen). Immer häufiger wird jedoch auch die intensitätsmodulierte Strahlentherapie (intensity modulated radiation therapy, IMRT) angewandt. Bei beiden Formen der Strahlentherapie ist zu beachten, dass die Strahlendosis aufgrund der hohen Radiosensitivität einiger neuronaler Strukturen limitiert ist und nicht bei Patienten unter drei Jahren angewandt werden darf (204-206). Die Zusätzliche Gabe von Radiosensitivierern (z.B. Misonidazol) hat leider nicht zu einer Verbesserung der durchschnittlichen Überlebensdauer geführt (48).

Das heutzutage am häufigsten eingesetzte Chemotherapeutikum ist TMZ. Da TMZ oral verabreicht werden kann, ähnlich effektiv aber weniger toxisch ist als BCNU, hat es das seit den 1990er Jahren primär eingesetzte Carmustin (Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea, BCNU) weitestgehend abgelöst (207, 208). In der GBM-Therapie wird BCNU aktuell nur noch in Form von Gliadel-Implantaten, welche in die Resektionshöhle eingesetzt werden und die durchschnittliche Überlebensdauer um 2 Monate verlängern, verwendet (200, 209, 210). Ebenso wie BCNU und alle anderen Chemotherapeutika wirkt TMZ nicht tumorspezifisch sondern alkyliert die DNA aller sich teilender Zellen. Ein wichtiger prognostischer Marker für den Erfolg einer TMZ-Therapie ist der Methylierungsstatus des MGMT-Promotors (O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Promotor). Patienten mit einem methylierten MGMT-Promotor (primäre GBM: 36%, sekundäre GBM: 75 % (211)) sind gegenüber TMZ deutlich sensibler als Patienten mit einem unmethylierten Promotorstatus (212), was sich in einer deutlich erhöhten durchschnittlichen Überlebensdauer von 21,7 Monaten (2-jährige Überlebensrate: 46 %) versus 12,7 Monaten

(2-jährigen Überlebensrate: 13,8 %) widerspiegelt (212). In Anlehnung an dieses Phänomen wird derzeit getestet, ob sich die Kombination von MGMT-Inhibitoren oder Inhibitoren anderer DNA-Reparaturenzyme mit TMZ positiv auf den Therapieerfolg bei GBM-Patienten auswirkt (213).

Neben den beschriebenen Standardtherapien gehört der Einsatz von kleinen Tyrosin-Kinase Inhibitoren und monoklonalen Antikörpern, welche gegen ein oder mehrere Schlüsselproteine von GBM-spezifischen Signalwegen gerichtet sind, zu den vielversprechendsten experimentellen Behandlungsansätzen (214, 215). Bei den Zielproteinen handelt es sich häufig um Tyrosinkinaserzeptoren (TKR) oder um nachgeschaltete Signalproteine von Wachstums- oder Angiogenese-vermittelnden Signalwegen. Ein typisches Beispiel ist der Einsatz von EGFR- und EGFRvIII-spezifischen Inhibitoren oder Antikörpern auf welche detailliert im Abschnitt 1.3.1 eingegangen wird. Da gezeigt werden konnte, dass der Einsatz von Antikörpern oder TKR-Inhibitoren, welche gegen einen einzelnen Rezeptor gerichtet sind, häufig nicht ausreicht um die Signaltransduktion des Zielsignalwegs zu inhibieren, wird derzeit versucht, durch den Einsatz von Inhibitoren mit mehreren Zielproteinen oder durch eine Kombination von unterschiedlichen Inhibitoren multiple Zielproteine proximal und distal eines einzelnen oder aber von mehreren Signalwegen gleichzeitig zu inhibieren. Ferner wird die Wirksamkeit und Verträglichkeit von zusätzlich mit Toxinen oder radioaktiven Isotopen konjugierten Antikörpern (216-219) sowie von Antikörpern-beladenen Immunoliposomen, welche zytotoxische Agenzien enthalten (216, 220, 221), getestet. Bei den beschriebenen therapeutischen Antikörper-basierten Ansätzen handelt es sich um eine passive Immuntherapie. Das Ziel einer aktiven Immuntherapie ist hingegen, eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort hervorzurufen. Bei der gängigsten adoptiven Immuntherapie werden Tumor-spezifische T-Zellen, welche sich von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) ableiten, entnommen und in Gegenwart von Interleukin-2 (IL-2) *ex vivo* kultiviert. Nach der Expansion der Tumor-Antigen-reaktiven T-Zell-Population und Immunsuppression des Spenders erfolgt der adoptive-Transfer (intravenöse Injektion) der Tumor-spezifischen T-Zellen (222).

Ein weiterer Therapie-Ansatz zur Behandlung von GBM ist der Einsatz von antiangiogenen Präparaten wie beispielweise der gegen den VEGF (vascular endothelial growth factor) gerichtete, monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin) (223, 224). Neueste Studien haben jedoch gezeigt, dass die Behandlung mit Bevacizumab in Kombination mit einer Radio-Chemo-Therapie zwar die Progressionsfreie Phase um circa vier Monate verlängerte (10,6 Monate versus Placebogruppe 6,2 Monate), jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die

Gesamtüberlebensdauer der Patienten hatte (1-jährige Überlebensrate: 72,4 % versus 66,3 % ($P = 0,049$), 2-jährige Überlebensrate: 33,9 % versus 30,1 % ($P = 0,24$)) (225).

Eine weitere alternative bzw. ergänzende Methode zur Behandlung von GBM ist die Gentherapie, bei welcher virale Vektoren, Expressionsplasmide, Nanopartikel-Konstrukte oder liposomale-Konstrukte verwendet werden, um beispielsweise pro-apoptotische Gene (z.B. Kaspasen) oder Tumorsuppressorgene (z.B. Tp53) in GBM-Zellen zu schleusen (226).

Neben der Gentherapie stellt die epigenetische Alteration der Genexpression eine weitere alternative Therapieform zur Behandlung von GBM dar. Hier zeigte der Einsatz von Histondeacetylase Inhibitoren (HDACi) wie Vorinostat erste Erfolge (227). Da die Behandlung von GBM mit HDACi zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, werden HDACi im Abschnitt 1.3.2 gesondert beschrieben.

Für GBM Rezidive die sich trotz Resektion unweigerlich bilden, gibt es keine Standardtherapie. In der Regel wird bei Patienten mit einem guten KPS eine erneute Resektion vorgenommen gefolgt von einer Behandlung mit TMZ oder Gliadel. Eine Strahlentherapie ist in diesem Fall nicht üblich (48).

1.3.1 EGFR und EGFRvIII-gerichtete Behandlungsmethoden von GBM

Aufgrund der zentralen Stellung des EGFR während der GBM-Pathogenese stellt dieser ein vielversprechendes Zielprotein bei der Entwicklung von gerichteten Therapien dar. Hierbei sind vier grundlegende Therapieansätze zu unterscheiden: (i) die Blockierung der Rezeptor-Liganden-Bindung, (ii) die Inhibition der Rezeptor-Kinase-Aktivität, (iii) die Inhibierung von Signalproteinen der EGFR-vermittelten Signaltransduktion sowie (iv) die Induktion einer EGFR-gerichteten Immunantwort. Obwohl EGFR-gerichtete Therapien bei anderen Krebsarten erfolgreich angewandt werden (z.B. Kopf-Hals-Tumore), gibt es trotz größter Bemühungen und einer Vielzahl von klinischen Studien derzeit keine zugelassene EGFR- oder EGFRvIII-gerichtete Therapie zur Behandlung von GBM. Dennoch sollen im Folgenden einige der vielversprechendsten EGFR- und EGFRvIII-gerichteten Therapieansätze, welche sich derzeit noch in klinischen Studien befinden, vorgestellt werden.

Um die Rezeptor-Liganden-Bindung zu unterbinden, wurden verschiedene konjugierte und unkonjugierte EGFR- oder EGFRvIII-spezifische monoklonale Antikörper (mAK) entwickelt. Zu den aussichtsreichsten unkonjugierten EGFR spezifischen mAK gehören Cetuximab (Erbix[®]), Panitumumab (Vectibix[®], ABX-EGF) und Nimotuzumab (Theraloc[®], TheraCIM-hR3). Es konnte gezeigt werden, dass der wohl bekannteste mAK Cetuximab (IgG1) sowohl die Ligandenbindung

als auch die Dimerisierung der extrazellulären Domäne unterbindet (228) und die Rezeptorinternalisierung und -degradation fördert (229). Da Cetuximab jedoch nicht in der Lage ist die BHS in einem ausreichenden Maße zu überwinden zeigten Cetuximab-Monotherapien lediglich bei direkter intrakranieller Applikation präklinische Erfolge (230, 231). Derzeit wird die Wirksamkeit von Cetuximab in Kombination mit einer Strahlentherapie und TMZ-Behandlung zur Behandlung von hochgradigen Gliomen in einer Phase II-Studie ermittelt (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00311857). Neben unkonjugierten mAK wurden zur lokalen Radiotherapie auch mit Radioisotopen konjugierte EGFR-spezifische mAK, wie beispielsweise ¹²⁵IMAb 425 (Fox Chase Cancer Center) entwickelt, welcher sich derzeit ebenfalls in einer Phase II-Studie befindet (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00589706) (232).

Zu den bekanntesten EGFRvIII-spezifischen mAK zählt mAb806 (IgG_{2b}), welcher in präklinischen Studien (EGFRvIII-exprimierenden U87MG-Xenograft-Tumormodellen in Nacktmäusen), das Tumorstadium, die Angiogenese und die Phosphorylierung von EGFRvIII-Tyrosinresten signifikant inhibierte, die Apoptoserate der Tumorzellen erhöhte und die Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-XL herunterregulierte. Allerdings konnte auch eine Bindung von mAb806 an den Wildtyp-EGFR nachgewiesen werden (233-235). Eine Phase I-Studie mit ch806, einer chimären (ch) Form des mAb, zeigte, dass ch806 von Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten sehr gut vertragen wurde. Da ch806 nicht in normalem Gewebe und auch nicht in Geweben mit hoher wtEGFR-Expression, wie der Leber oder Haut nachgewiesen werden konnte, belegte diese Studie ferner die Spezifität des mAb (236).

Neben EGFR-spezifischen mAK stellen Vakzine eine weitere Möglichkeit der gerichteten Therapie dar. Eines der vielversprechendsten Vakzine ist das EGFRvIII-spezifische PEP-3-KLH welches vor allem unter seinem Synonym Rindopepimut bekannt ist (weitere Synonyme: PEPvIII-KLH, CDX-110, Celldex Therapeutics). PEP-3-KLH/Rindopepimut besteht aus einem 14 AS großen PEP-3 (L-E-E-K-K-Q-N-Y-V-V-T-D-H-C)³-Peptid und dem Schlitzschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin, KLH) besteht (237). Durch die Deletion der EGFR-Exone 2-7 hat sich ein neues, für Glycin codierendes Codon im Grenzbereich der Exone 1 und 8 gebildet. Das auf diese Weise entstandene, für EGFRvIII einzigartige Neoepitop in der extrazellulären Domäne des Rezeptors, wird von PEP-3 spezifisch erkannt (238). Bei KLH handelt es sich hingegen um einen Immunstimulator, der sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort stimuliert. Wird KLH an ein Trägermoleküle gekoppelt, in diesem Fall PEP-3, kann auf diese Weise eine spezifische, gegen das Zielmolekül des Haptens gerichtete Immunantwort hervorgerufen

³ AS, Einbuchstabencode: L, Leucin; E, Glutaminsäure; K, Lysin; Q, Glutamin; N, Asparagin; Y, Tyrosin; V, Valin; T, Threonin; D, Asparaginsäure; H, Histidin; C, Cystein

werden (239). Rindopepimut ist das einzige EGFRvIII-spezifische Vakzin, welches in Kombination mit TMZ nicht nur in präklinischen Studien, sondern auch in ersten klinischen Studien zu einer längeren progressionsfreien Phase und zu einer Erhöhung der mittleren Überlebensdauer von GBM-Patienten führte (US Food and Drug Administration, BB-IND-9944) (238). Es konnte gezeigt werden, dass Rindopepimut nur minimal toxisch und somit gut verträglich ist. Desweiteren ruft Rindopepimut keine Autoimmunität hervorruft, sondern induziert vielmehr eine humorale und zytotoxische EGFRvIII-spezifische Immunantwort (237, 240). Derzeit befindet sich Rindopepimut in einer Phase II-Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00458601), in welcher die Wirkung des Vakzins in einer Kombinationstherapie mit TMZ zur Behandlung von malignen Gliomen untersucht wird. In einer weiteren Phase II-Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01498328), sowie in einer Phase III-Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01480479) wird Rindopepimut zusammen mit Bevacizumab bzw. TMZ zur Behandlung von GBM, Kleinzelligen-GBM, Riesenzell-GBM, Gliosarkomen und GBM mit oligodendroglialen Merkmalen eingesetzt (241). Ein weiterer EGFRvIII-spezifischer mAb ist L8A4, dessen Wirkung Yang et al. in mehreren Studien mit BCNT (boron neutron capture therapy)-behandelten Rattengliomen (F98, ektopisch wtEGFR/EGFRvIII exprimierende Gliome) untersuchten. Bei einer BCNT-Therapie handelt es sich um eine Radiotherapie Variante, welche auf der selektiven Behandlung von Tumorzellen mit stabilen Bor-10 Isotopen, gefolgt von einer niederenergetischen Bestrahlung mit Neutronen (low-energy thermal neutrons) beruht. In dieser Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Verabreichung bronierter L8A4 Konjugaten (BD-L8A4, boronated polyamidoamine dendrimer-L8A4) mittels CED das Überleben von BCNT behandelten Tieren signifikant gesteigert werden konnte (2,8fach im Vergleich zur Kontrollgruppe) (242-245).

Den wohl am intensivsten erforschten Bereich der EGFR-gerichteten Therapie stellen Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) dar, welche kompetitiv in der ATP-Bindungstasche der Tyrosin-Kinase-Domäne des Rezeptors binden (246). Auf diese Weise wird die Kinaseaktivität inhibiert und die Autophosphorylierung der Rezeptoren sowie die Phosphorylierung von Substraten der Signaltransduktionskaskade, unterbunden (127).

Es wurden sowohl reversible TKI wie Erlotinib (Tarceva®), Gefitinib (Iressa®) oder Lapatinib (Tykerb®) (247, 248), als auch irreversible TKI wie Canertinib oder Pelitinib entwickelt (246). Insbesondere Erlotinib, Gefitinib und Lapatinib stehen im Fokus der Forschung und wurden bereits für die Behandlung anderer Krebsarten, wie beispielsweise Lungen- oder Brustkrebs zugelassen (249). Im Gegensatz zu Erlotinib und Gefitinib, welche bevorzugt den aktiven EGFR binden (250, 251), bindet Lapatinib primär den inaktiven Rezeptor (250). Phase II-Studien haben

jedoch gezeigt, dass Lapatinib nur in geringem Maße in der Lage ist, die BHS zu überwinden und dass die Konzentration des TKI im Tumor nicht ausreicht, um die Apoptose EGFR-positiver Zellen zu induzieren oder deren Proliferation nachhaltig zu inhibieren (199, 250). In klinischen Studien konnte die gute Verträglichkeit von Erlotinib und Gefitinib bestätigt werden (127, 252), es zeigte sich jedoch, dass die Konzentration von Erlotinib im Tumor deutlich geringer war als im Plasma (127). Für Gefitinib konnte hingegen eine Akkumulation im Tumorgewebe sowie eine Inhibition der (Auto-) Phosphorylierung von EGFR/EGFRvIII und eine verminderte Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren nachgewiesen werden. Allerdings konnte weder durch eine Behandlung mit Lapatinib, Erlotinib oder Gefitinib eine signifikante Inhibition der EGFR-vermittelten Signaltransduktion erzielt werden (253, 254).

Ein weiteres generelles Problem bei der EGFR/EGFRvIII-gerichteten GBM-Therapie, stellt die kompensatorische Aktivierung der EGFR/EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion durch andere RTK dar. Clark et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Behandlung von GBM-Zellen mit Cetuximab zu einer kompensatorischen Aktivierung anderer Mitglieder der EGFR-Familie (ErbB2 und ErbB3) führte, was die Inhibition des EGFR-vermittelten PI3K-Akt- und des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs verhinderte (255). Hu et al. konnten ferner zeigen, dass EGFRvIII-exprimierende GBM-Zellen infolge einer Behandlung mit Gefitinib paradoxerweise eine erhöhte Migration zeigten. Der Grund für dieses Phänomen war die kompensatorische Erhöhung der Expression von uPA (urokinase-type plasminogen activator), welches seinerseits den uPA-Rezeptor (uPAR), einen Aktivator von Kinasen der Src-Familie, aktivierte (256, 257). Da die Monotherapie mit den TKI nur in einer marginalen Verbesserung gegenüber der klassischen Behandlung nach Stupp resultierte (198, 199, 258, 259), liegt der Schwerpunkt aktueller Studien mit Erlotinib und Gefitinib vor allem auf kombinierten TKI-Radio/Chemo-Therapien, sowie auf Therapien mit multiplen TKI welche für unterschiedliche TKR spezifisch sind (241).

1.3.2 Histondeacetylasen und ihre Inhibitoren

In den letzten zwei Jahrzehnten ist die epigenetische Regulation der Genexpression immer mehr in den Fokus der Tumorphathogenese-Forschung gerückt und ein zentraler Ansatzpunkt bei der Entwicklung neuer Krebstherapien geworden. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Modifikation von Histonen des Nukleosoms durch Histonacetylasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC). Im Menschen konnten 18 verschiedene HDAC-Isoformen identifiziert werden (260-262), welche in Abhängigkeit ihrer Struktur und ihrer Homologie zu den HDAC der Hefe (260, 263) in vier Gruppen (Klasse I-IV) eingeteilt werden (Abbildung 6). Zur Klasse I gehören die ubiquitär exprimierten und primär nukleär lokalisierten HDAC 1, 2, 3 und 8

(homolog zu RPD3 der Hefe), welche eine hohe Homologie in ihrer katalytischen Domäne aufweisen (264). Neueste phylogenetische Untersuchungen legen eine weitere Einteilung in die Klassen Ia (HDAC 1 und 2), Ib (HDAC 3) und Ic (HDAC 8) nahe (265). Klasse II HDAC (homolog zu Hda1 der Hefe) werden gewebespezifisch exprimiert (266). Sie setzt sich aus HDAC 4, 5, 6, 7, 9 und 10 zusammen (261, 262), wobei HDAC der Unterklasse IIa (HDAC 4, 5, 7 und 9) sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus zu finden sind. HDAC der Unterklasse IIb sind hingegen primär im Zytoplasma lokalisiert (261, 262, 267). Bei HDAC der Klasse I und II handelt es sich um Zink-abhängige Enzyme, HDAC der Klasse III sind hingegen NAD^+ -abhängig (260). Zu ihnen gehören die Sirtuine (SIRT) 1-7 (homolog zu SIR1 der Hefe), wobei SIRT 1, 6 und 7 im Nukleus, SIRT 3, 4 und 5 in den Mitochondrien und SIRT 2 im Zytoplasma lokalisiert ist (268). Zur letzten Klasse IV der HDAC, gehört lediglich die Zink-abhängige HDAC 11 (homolog zu Hda1 similar 3) (269), welche sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma lokalisiert ist (270).

Klassifizierung Zink-abhängiger HDAC

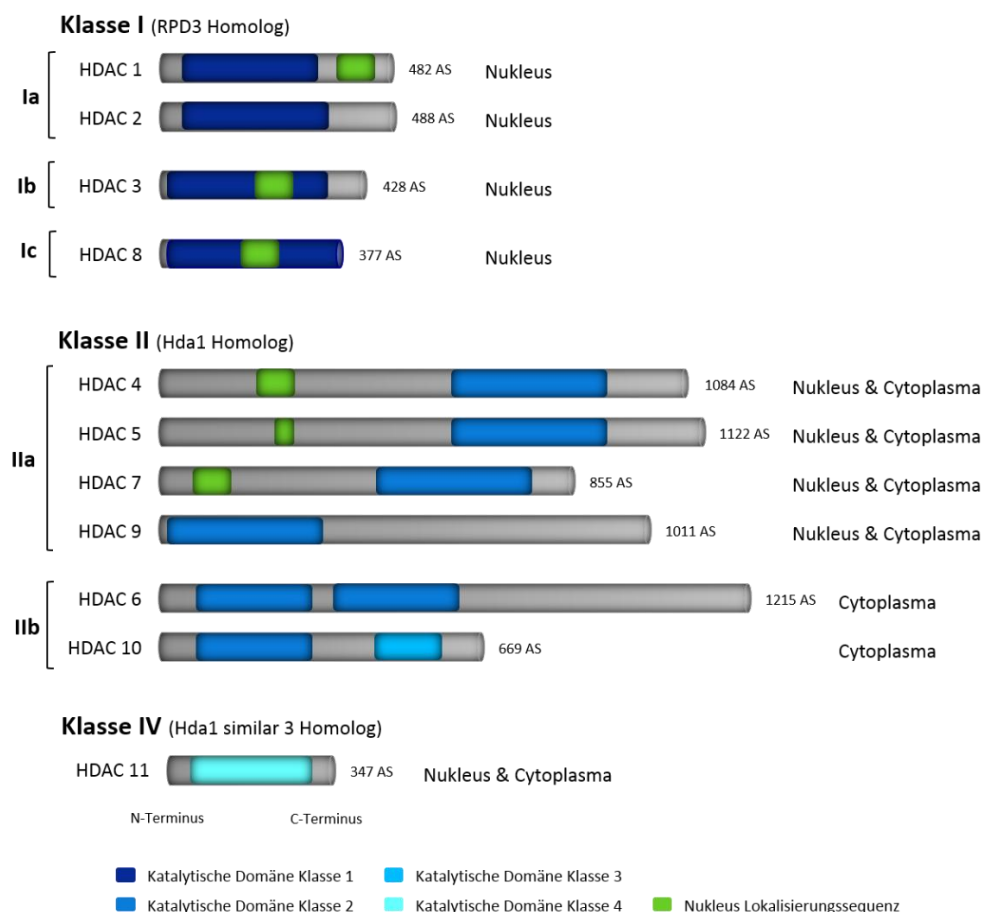


Abbildung 6 Klassifizierung von Zink-abhängigen HDAC. Zink-abhängige HDAC werden in Abhängigkeit ihrer Homologie zu den HDAC der Hefe

in die Klassen I-IV unterteilt. HDAC der Klasse I (Ia, Ib und Ic) sind ausschließlich im Nukleus lokalisiert, wohingegen HDAC der Klasse IIb ausschließlich im Cytoplasma vorkommen. Alle übrigen HDAC (IIa, IV) sind sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma zu finden.

Bei der Acetylierung von Histonen übertragen HAT die Acetylgruppen des Acetyl-Coenzyms A (Acetyl-CoA) auf die aminoterminalen Lysinresten von Histonen (271). Auf diese Weise wird die starke elektrische Wechselwirkung zwischen den zuvor positiv geladenen Lysinresten der Histone und den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA deutlich abgeschwächt. Somit begünstigen HAT die Bildung von Euchromatin und infolgedessen die Genexpression (272). HDAC hingegen entfernen Acetylgruppen von Histonen und begünstigen somit die Bildung von Heterochromatin und suprimieren somit die Genexpression (271, 273) (Abbildung 7, links). Sowohl HDAC als auch HAT bilden aus multiplen HDAC und HAT sowie aus Co-Aktivatoren und Co-Repressoren der Transkription bestehende Komplexe (274, 275).

Regulationsmechanismen von HAT & HDAC

Zellzyklus, Apoptose, Angiogenese, Immunantwort, Proliferation, Differenzierung

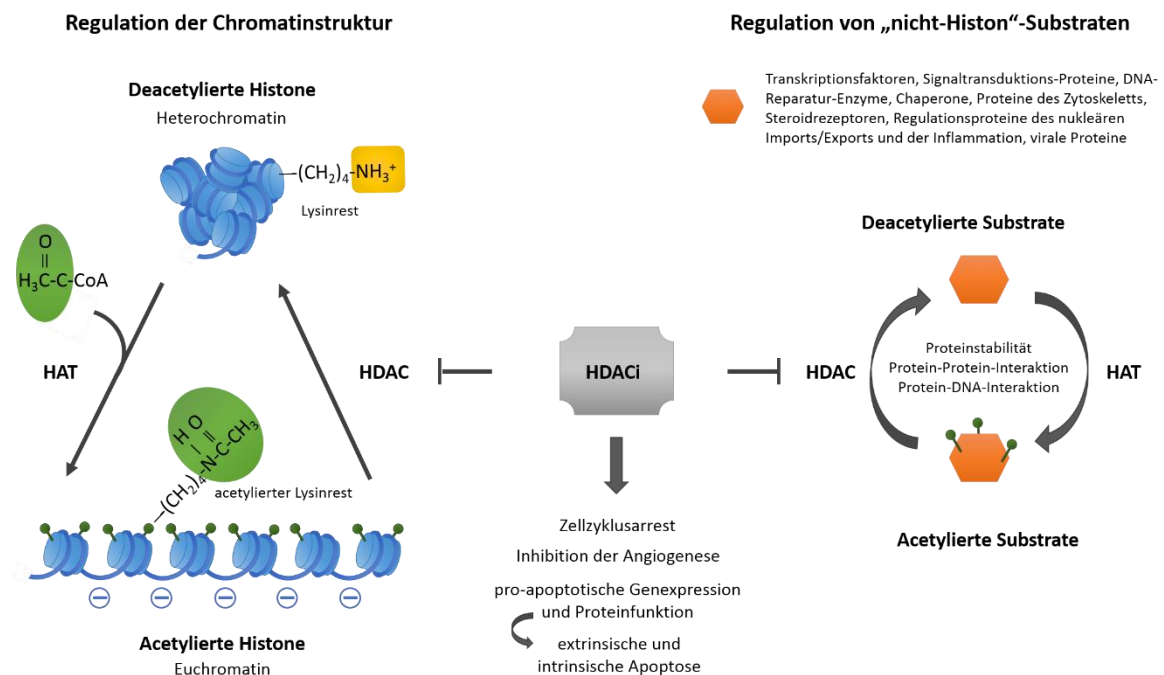


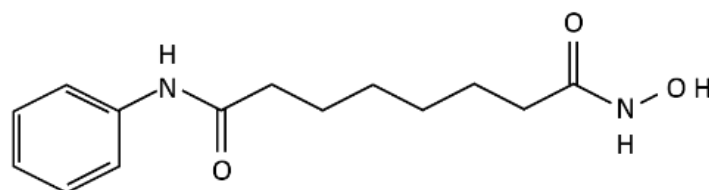
Abbildung 7 Übersichtsschaubild der regulatorischen Funktion von HAT und HDAC. HDAC und HAT sind über die Steuerung des Acetylierungsstatus von Histonen und Proteinen in der Lage die Genexpression direkt (über die Modifikation der Chromatinstruktur) und indirekt (über die Modifikation von Proteinen der Translationsregulation) zu regulieren und fähig die Interaktion von Proteinen sowie die Halbwertszeit von Proteinen zu beeinflussen. Auf diese Weise sind HDAC und HAT an der Steuerung des Zellzyklus, der Apoptose, der Angiogenese, der Immunantwort sowie der Proliferation und Differenzierung beteiligt. Die Funktion der HDAC kann durch HDACi inhibiert werden.

Der Name der HDAC rührt daher, dass zunächst angenommen wurde, dass HDAC lediglich Histone deacetylieren. In den letzten zehn Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass HDAC auch die Lysinreste von mehr als 50 verschiedenen, funktionellen, nicht-Histon-Substraten deacetylieren und auf diese Weise maßgeblich an der Regulation der Proteinstabilität, der Protein-Protein-Interaktion und der Protein-DNA-Interaktion beteiligt sind (262, 276-282). Zu ihren Substraten zählen unter anderem DNA-Bindungsproteine (p21 (283, 284) u.a.),

Transkriptionsfaktoren [NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) (285) u.a.], Co-Regulatoren der Transkription [Rb (Retinoblastom-Protein) (278) u.a.], Signalproteine [STAT3 (286), Smad7 (mothers against decapentaplegic homolog 7) (287) u.a.], DNA-Reparatur Enzyme [Ku70 (288) u.a.], Chaperone [HSP90 (heat shock protein 90) (289)], Proteine des Zytoskeletts [α -Tubulin (290, 291)] und Steroidrezeptoren [Androgen-Rezeptor (292) u.a.], aber auch inflammatorische Mediatoren [HMGB1 (high-mobility-group-protein B1) (293)] und virale Proteine [E1A (adenovirus early region 1A) (294) u.a.]. Aufgrund ihrer dualen Funktion als Deacetylasen von Histonen und nicht-Histon-Proteinen sind HDAC sowohl an der direkten epigenetischen und indirekten Regulation der Genexpression über TF (262, 276, 278, 279), als auch an der Zellzykluskontrolle (295), sowie der Regulation der Apoptose (266), der Differenzierung (295, 296), des Metabolismus und der Immunantwort (297) beteiligt.

Da eine Deregulation, Alteration oder Überexpression von HDAC bereits in mehreren Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte (z.B. HDAC 1 in Prostata Tumoren (298), HDAC 2 bei Kolorektalkrebs (299, 300), HDAC 1 und 6 bei Brustkrebs (301, 302)) und diese unter Umständen sogar kausal für die Entstehung von Krebs sein können (295), stellen HDAC einen vielversprechenden Ansatzpunkt bei der Entwicklung von Krebstherapien dar. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde eine Vielzahl unterschiedlicher HDAC-Inhibitoren (HDACi) entwickelt, welche durch eine kompetitive Bindung in der aktiven Tasche spezifischer HDAC deren enzymatische Aktivität unterbinden. In Abhängigkeit ihrer chemischen Struktur, werden HDAC-Inhibitoren (HDACi) in vier Gruppen eingeteilt: (i) den HDACi mit kurzen Fettsäureketten, (ii) den Hydroxamaten, (iii) den zyklischen Tetrapeptiden bzw. Depsipeptiden (iiii) und den Benzamidinen (266, 268, 303, 304).

Bei den meisten HDACi handelt es sich um Pan-Inhibitoren (Breitband-Inhibitoren), welche alle Zink-abhängigen HDAC-Isoformen (HDAC Klasse I und II) mit geringen oder deutlicheren Effektivitätsunterschieden inhibieren (267). Sie bestehen in der Regel aus einer Zink-chelatierenden Kopfgruppe, welche das Zink-Ion in der katalytischen Tasche der HDAC bindet, einer Linker-Gruppe, welche den Tunnel der aktiven Tasche der HDAC durchspannt und einer oberflächenerkennenden Kappe, welche eine extrem hohe Variabilität toleriert (267, 303) (Abbildung 8).



Oberflächen Erkennung

Linker

Bindung des Metall-Ions

Abbildung 8 Chemische-Struktur eines Inhibitors von Zink-abhängigen HDAC. Die Zink-chelatierende Kopfgruppe (grün) bindet Zink-Ione in der aktiven Tasche Zink-abhängiger HDAC. Der Linker (gelb) durchspannt den Tunnel der aktiven Tasche, und verbindet die Kopfgruppe mit der Oberflächen erkennenden Struktur des Inhibitors (violett).

Die Auswirkungen einer HDACi-Behandlung sind zelltyp- und kontextabhängig. Während HDACi in nicht-transformierten Zellen in der Regel keine oder nur eine sehr geringe Reaktion hervorrufen (278), verändern sie selektiv die Expression von 2-10 % aller exprimierten Gene in transformierten Zellen. Auf diese Weise sind sie in der Lage sowohl einen Zellzyklusarrest, als auch die extrinsische und intrinsische Apoptose, sowie einen autophagischen- oder ROS- (reactive oxygen species) vermittelten Zelltod auszulösen. Des Weiteren können HDACi die Phosphorylierung von Proteinen beeinflussen, die Bildung von Aggresomen stören und die Angiogenese inhibieren (284, 305-317).

Derzeit befinden sich HDACi aller sechs Gruppen entweder in Form einer Monotherapie oder aber in Kombination mit weiteren Krebstherapien in klinischen Studien (241). In der Vergangenheit konnten bereits gute Ergebnisse bei der Behandlung von hämatopoetischen Krebsformen mit HDACi erzielt werden (318, 319).

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe des Modellsystems der EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zelllinie BS153 zu überprüfen, ob die Amplifikation des EGFR-Gens bzw. die Expression der Variante III des EGFR (EGFRvIII) einen Einfluss auf die Wirkung von EGFR-gerichteten Therapien hat und/oder die Bildung von Resistenzen begünstigt. Hierzu sollte die Wirkung der Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib, sowie des monoklonalen Antikörpers Cetuximab auf die Proliferation, die Migration und die EGFR-vermittelte Signaltransduktion *in vitro* untersucht werden.

Eine Möglichkeit, die Effizienz von EGFR-gerichteten Therapien zu erhöhen, ist die Modulation der EGFR-Expression über epigenetische Mechanismen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Transkription von hoch amplifizierten Genen in Krebszellen (z.B. EGFR und HER2 in Brustkrebszellen), durch die Behandlung mit HDACi selektiv inhibiert werden konnte (320). Um den Einfluss einer HDACi-Therapie auf die Expression von EGFR sowie auf die Proliferation und Migration von GBM-Zellen zu analysieren, sollten verschiedene GBM-Modellsysteme mit unterschiedlichem wtEGFR/EGFRvIII-Status mit HDACi behandelt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob mögliche Resistenzen gegenüber EGFR-gerichteten Therapien durch eine Behandlung mit HDACi umgangen werden können.

Neben dem invasiven und diffusen Wachstum, ist vor allem ein überaus hohes Maß an inter- und intratumoraler Heterogenität charakteristisch für GBM. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss des EGFR-Status auf die Tumorentstehung und die Heterogenität bzw. die Klonalität von GBM zu untersuchen. Hierzu sollten BS153-Zellen und U87MG-Zellen (wtEGFR-exprimierende, EGFRvIII-negative GBM-Zelllinie ohne EGFR-Amplifikation), mit Hilfe von RGB-Vektoren vielfarbig und somit individuell fluoreszenzmarkiert werden. Im Anschluss sollte das Tumorentstehungspotential beider Zelllinien durch *in vivo*-Maus-Xenograft-Versuche ermittelt werden.

3 Methoden

3.1 Methoden der Zellkultur, Transfektionen und Tierexperimente

3.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl adhärent wachsende humane GBM-Zelllinien als auch sphäroid wachsende humane GBM-Stammzelllinien (GS-Zelllinien) verwendet, welche sich hinsichtlich ihres wtEGFR/EGFRvIII-Status unterschieden. Die Eigenschaften sowie die Herkunft aller Zelllinien wurden in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Zelllinien GS-27 und GS-30 stammen aus Vorarbeiten des Labors für Hirntumorbiologie der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Sie wurden zur Etablierung von GBM-Stammzelllinien, unter Einwilligung des jeweiligen Patienten, aus frischen GBM-Resektionsmaterial gewonnen und *in vitro* kultiviert.

Zelllinie	Zellart	Spezies	Histologische Herkunft	EGFR-Amplifikation	EGFRvIII Protein	wtEGFR Protein	Quelle
U87MG	konv.	human	GBM	n.v.	-	wenig	Neurochirurgie, UKE
g55t2	konv.	human	GBM	n.v.	-	wenig	(321)
0306	GS	human	GBM	mittel	-	mittel	(322)
0627	GS	human	GBM	hoch	-	mittel	(322)
GS-27	GS	human	GBM	hoch	+	mittel	(323)
GS-30	GS	human	GBM	hoch	-	hoch	(323)
BS153	konv.	human	GBM	hoch	+	mittel	(324)
BS153 ^{resE}	konv.	human	GBM	hoch	+	wenig	Neurochirurgie, UKE
DK-MG	konv.	human	GBM	hoch	+	wenig	DSMZ, AC277
DK-MG ^{resE}	konv.	human	GBM	mittel	+	mittel	Neurochirurgie, UKE
Astrozyten	konv.	human	Single Donor	n.v.	-	wenig	Life Technologies, N7805-100

Tabelle 1 Verwendete Zelllinien, ihre Herkunft sowie ihr wtEGFR/EGFRvIII-Status. [GS, GBM-Stammzelllinie; qPCR; n.v. (nicht vorhanden) ≤ 3 , mittel ≤ 10 , hoch > 10]

3.1.2 Kultivierung und passagieren von Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Abschnitt 3.1.1, Tabelle 1) wurden in Zellkulturflaschen mit den Dimensionen T25, T75 oder T175 in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ *in vitro* kultiviert. Die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Kulturmedien, ist in Tabelle 2 aufgeführt. Alle adhärent wachsenden Zelllinien wurden unter serumhaltigen und alle sphäroid-wachsenden Zelllinien unter serumfreien Bedingungen kultiviert, wobei das Medium sphäroid-wachsender Zelllinien zusätzlich mit rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren versetzt wurde. Alle Kulturmedien enthielten zusätzlich 100U/ml Penicillin und 100 µg/ml

Streptomycin. Dem Medium der in dieser Promotion etablierten Erlotinib-resistenten BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zelllinien wurden zusätzlich 10 µg/ml Erlotinib beigefügt, wobei der Tyrosinkinase-Inhibitor bei jedem Mediumwechsel in das Kulturmedium der Zellen gegeben wurde.

Zelllinie	Medium	Zusätze
BS153	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
BS153 ^{resE}	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 µg/ml Erlotinib
DK-MG	Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medium	10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
DK-MG ^{resE}	Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medium	10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 µg/ml Erlotinib
U87MG g55t2 0306 0627 GS-27 GS-30	Neurobasalmedium (NBM)	100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2% B-27 Supplement 1% Glutamax 20 ng/ml FGF-2 32 IE/ml Heparin
Astrozyten	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	20 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

Tabelle 2 Zellkulturmedien aller Zelllinien

Alle adhären-wachsenden Zelllinien wurden subkonfluent kultiviert. Das Medium wurde mindestens einmal pro Woche gewechselt und die Zellen bei Bedarf gesplittet. Hierzu wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden diese im Folgenden mit Trypsin/EDTA behandelt. Nachdem sich die Zellen vom Gefäßboden gelöst hatten, wurde das Trypsin durch die Zugabe von serumhaltigen Medium inaktiviert und die Zellen wurden in der gewünschten Dichte ausgesät.

Das Medium aller sphäroid-wachsenden Zelllinien wurde ebenfalls mindestens einmal pro Woche gewechselt. Um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen ab einer Sphärengröße von 200-500 µm mechanisch dissoziiert.

3.1.3 Kryokonservierung von Zellen (Einfrieren)

Die dauerhaften Lagerung adhären- und sphäroid-wachsender Zellen erfolgte bei -196°C in Stickstofftanks. Grundsätzlich befanden sich alle einzufrierenden Zellen in einer optimalen

(subkonfluenten) Wachstumsphase. Um das Zellkulturmedium vollständig zu entfernen, wurden alle Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Adhärenz-wachsende Zellen wurden zudem durch eine Behandlung mit Trypsin/EDTA vereinzelt. Im Anschluss wurden jeweils etwa 1×10^6 Zellen bei 1300 rpm pelletiert, in 1,6 ml Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) resuspendiert, in Kryo-Röhrchen überführt und langsam bei -80°C eingefroren. Nach fünf Tagen wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in Stickstoff-Tanks (-196°C) überführt.

3.1.4 Auftauen von Zellen

Das Auftauen in Kryo-Röhrchen bei -196°C gelagerter Zellen erfolgte zügig in einem Wasserbad bei 37°C . Die aufgetauten Zellen wurden zunächst in 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und bei 1300 rpm zentrifugiert. Um eine vollständige Entfernung des FCS und des DMSO zu gewährleisten, wurden die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen und nach einem erneuten Zentrifugationsschritt in dem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und ausgesät.

3.1.5 Proliferations-Assay

Die Quantifizierung der Zell-Proliferation erfolgte mittels des CellTiter-Glo®: Luminescent Cell Viability Assays (Promega). Mit Hilfe dieses Assays ist es möglich den realtiven ATP-Gehalt von Zellen zu bestimmen, welcher die metabolische Aktivität der Zellen widerspiegelt und Aufschluss über die Anzahl vitaler Zellen bzw. der Proliferation-Aktivität von Zellen gibt. Bei dem Lumineszenz basierten verfahren wird Beetle Luciferin in Anwesenheit von ATP, O_2 , Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase und Mg^{2+} in Oxiluciferin umgesetzt, dessen realtive Menge mit Hilfe des Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ermittelt wurde.

Am Vortag des Versuches wurden $2,5 \times 10^3$ Zellen pro Well in eine 96-Well Platte mit transparentem Boden ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt und die Zellen in DMEM- oder RPMI-Medium mit 2 % FCS bis zur Proliferationsmessung kultiviert. Sollte der Einfluss von Inhibitoren auf die Proliferation gemessen werden, wurde dem Medium zusätzlich die entsprechende Menge des Inhibitors hinzugefügt. Um gleichbleibende Versuchsbedingungen zu garantieren, wurde das Medium nach drei Tagen erneuert. Die Durchführung des Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Um eine Signifikanz der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden mindestens Quadruplikate gemessen.

3.1.6 Migrations-Assay

Um die ungerichtete und die gegen einen Chemoattraktanten gerichtete Zellmigration sowie die Einfluss von Substanzen auf die Migration von Zellen zu untersuchen, wurden modifizierte Boyden-Chamber-Assays durchgeführt. Die Messung der gerichteten Migration erfolgte in allen Fällen gegen den Wachstumsfaktor EGF (20 nM). In Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie wurden hierzu die folgenden Medien verwendet:

Zelllinie	Boyden-Medium
BS153, BS153 ^{resE} DK-MG, DK-MG ^{resE}	0,1% BSA 1% Glutamax 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
U87MG 0627	0,1% BSA 1% Glutamax 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in Neurobasalmedium (NBM)

Tabelle 3 Boyden-Medien

Um ein möglichst optimales und vergleichbares Ergebnis zu erzielen, wurden adhärent-wachsende Zellen einen Tag und sphäroid-wachsende Zellen zwei Tage vor dem Assay subkultiviert. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde ein Filter (Neuprobe, Porengröße: 8 µm) mit 5 µg/ml Laminin beschichtete und für mindestens 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank (5 %CO₂) gelagert. Im Anschluss wurden der Filter mit 100 ml 0,1 % BSA in PBS gewaschen und getrocknet. Am Versuchstag wurden die zu testenden Substanzen in unterschiedlichen Verdünnungen in dem jeweiligen Boyden-Medium (Tabelle 3) angesetzt, wobei die Konzentration der Substanzen vom jeweiligen Versuch abhing. Zur weiteren Versuchsvorbereitung wurden adhärent-wachsende Zellen mit Trypsin/EDTA vereinzelt und ebenso wie sphäroid-wachsende Zellen bei 1300 rpm für 7 min zentrifugiert. Um das Kulturmedium vollständig von den Zellen zu entfernen, wurden diese dreimal mit Boyden-Medium gewaschen, welches gegebenenfalls bereits die zu testende Substanz enthielt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Im Folgenden wurde die untere Boyden-Kammer mit jeweils 30 µl Boyden-Medium befüllt, welches gegebenenfalls zuvor mit EGF (Endkonzentration 20 nM) oder 2 µM Erlotinib versetzt wurde. Im nächsten Schritt wurde der beschichtete Filter vorsichtig auf die befüllte Kammer gelegt, auf welchen wieder die obere Kammer aufgesetzt wurde, bevor beide Kammern fest miteinander verschraubt wurden.

Nachdem beide Kammern fest miteinander verschraubt wurden, wurden jeweils 50 µl der zuvor eingestellten Zellen (50 µl Boyden-Medium ± Testsubstanz enthielten $1,5 \times 10^4$ Zellen) in die

Wells der oberen Boyden-Kammer gegeben. Um statistisch signifikante Werte zu erhalten, wurden mindestens Quadroduplikate pipettiert. Im Anschluss wurden die Kammern für 24 Stunden im Brutschrank (37°C, 5 %CO₂) inkubiert. Um den Versuch zu beenden, wurden die Kammern auseinandergeschraubt, und die Oberseite der Filter mit Hilfe eines Q-Tips von den nicht migrierten Zellen befreit. Um die migrierten Zellen auf der Unterseite des Filters zu fixieren und anzufärben, wurden die Filter jeweils nach Anleitung für 3 min in den drei DiffQuick-Lösungen inkubiert.

Zur Auswertung des Assays, wurden die Zellzahl in je zehn Feldern pro Well bei einer 40fachen Vergrößerung am Mikroskop ausgezählt und die Standardabweichung berechnet. Die Anzahl migrierter Zellen wurde in Zellen/10 high power fields (hpf) angegeben.

3.1.7 Knockdown

Der Knockdown spezifischer Gene erfolgte mittels siRNA. Hierzu wurden die adhären wachsenden Zellen am Vortag des Versuches angesplittet und semikonfluent in eine Zellkulturschale ausgesät. Die siRNA-Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine RNAiMax-Reagent (Life Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers. Folgende siRNAs wurden verwendet:

siRNA-Sequenzen:

EGFRvIII 5'-CUGGAGGAAAAGAAAGGUAU-3' (325)

PI3Kp100δ 5'-TCAGCTGCTCCAAAGACATCCAGTA-3' (326)

Kontroll-siRNA:

Control siRNA-A (sc-37007), Santa Cruz

3.1.8 Kolonie-Formations-Assays

Die *in vitro*-Tumorigenität von Zellen wurde durch Kolonie-Formations-Assays ermittelt. Zur Versuchsvorbereitung wurde eine 2 %ige Agarose-Stammlösung in PBS angesetzt und autoklaviert. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die Wells einer 6-Well-Platten mit jeweils 1,5 ml einer 0,8 %iger Agarose-Lösung (2 % Agarose-Stammlösung + Serumfreies Medium) befüllt. Um eine optimale Wachstumsphase am Versuchstag sicherzustellen, wurden die zu untersuchenden Zellen ebenfalls einen Tag vor Versuchsbeginn angesplittet und semikonfluent ausgesät. Am Versuchstag wurden die Zellen zunächst trypsiniert und vereinzelt. Im Anschluss wurden je Well 10-50 x 10³ Zellen in 1,5 ml einer 0,3 %igen Agarose-Lösung (2 % Agarose-Stammlösung + Zellkulturmedium, 2 % FCS, 100 U/ml Penicillin und

100 µg/ml Streptomycin + evt. 10 µg/ml Erlotinib) ausgesät. Die Aushärtung der Agarose erfolgte für 15 min bei 4°C. Im Anschluss wurden die Zellen für sieben Tage in einem Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) kultiviert. Um ein Austrocknen der Agarose zu verhindern wurde jeden zweiten Tag Medium auf die Zellen gegeben welches gegebenenfalls Erlotinib (10 µg/ml) enthielt. Zur Auswertung des Assays, wurden die Zellen für 5 min mit einer 5 %igen Kristallviolett Lösung angefärbt, bevor die Kolonien an einem Lichtmikroskop ausgezählt wurden.

3.1.9 RGB-Markierung von Zellen

Eine elegante Möglichkeit, die Heterogenität bzw. die Klonalität von Tumoren (*in vivo*) und Zelllinien (*in vitro*) zu untersuchen, bietet die von Weber et al. entwickelte RGB- (rot, grün, blau, multiple Farbmischung) Markierung von Zellen (327). Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, tausende von Zellen individuell Fluoreszenz zu markieren und auf diese Weise ihr Schicksal zu verfolgen. Das RGB-Verfahren beruht auf dem Prinzip der additiven Farbmischung, nach welchem alle Spektralfarben durch die Mischung der drei Grundfarben rot, grün und blau dargestellt werden können (Abbildung 9) (328).

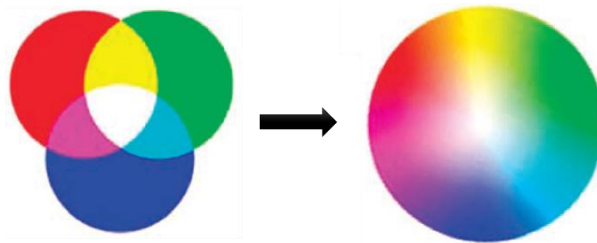


Abbildung 9 **Additives Farbmischungsprinzip.** Durch die Mischung der drei Grundfarben rot, grün und blau, können alle Spektralfarben gebildet werden (multiple Farbmischung).

Angelehnt an das additive Farbmischungsprinzip werden alle zu markierenden Zellen simultan mit drei verschiedenen lentiviralen Vektoren (LetiLox 3,7, lentivirale Vektoren der dritten Generation), welche für die Fluoreszenzproteine mCherry (LeGO-C2, rot) (327), Venus (LeGO-V2, gelb-grün) (329) oder Cerulean (LeGO-Cer2, blau) (328) kodieren, transduziert (Abbildung 10). Da alle RGB-Vektoren zusätzlich eine Puromycin-Resistenz vermitteln, ist es im Anschluss an die Transduktion möglich, durch eine Behandlung mit dem Antibiotikum positiv transduzierte Zellen anzureichern (327).

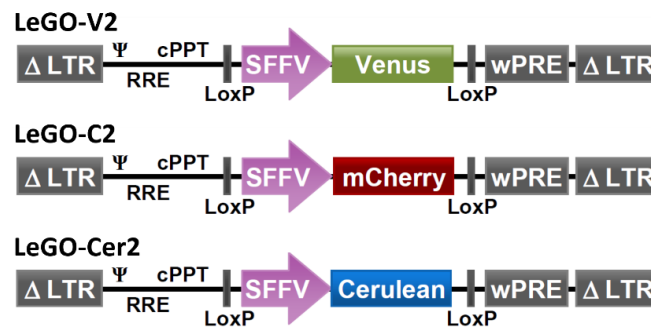


Abbildung 10 **RGB-Vektoren**. Schematische Darstellung der RGB-Vektoren LeGO-V2 (kodiert für Venus, gelb-grün), LeGO-C2 (kodiert für mCherry, rot) und LeGO-Cer2 (kodiert für Cerulean, blau). Bei allen Vektoren handelt es sich um lentivirale LentiLox 3.7 Vektoren. [Δ LTR = long terminal repeat, SFFV (Promotor) = spleen focus-forming virus, wPRE = woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element] (verändert nach Weber et al. (327))

Bei einer stark vereinfachten Darstellung des RGB-Prinzips, nach welcher jede Zelle in der Lage ist maximal drei verschiedene Vektoren aufzunehmen, können auf diese Weise 64 unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Zellen generiert werden (Abbildung 11).

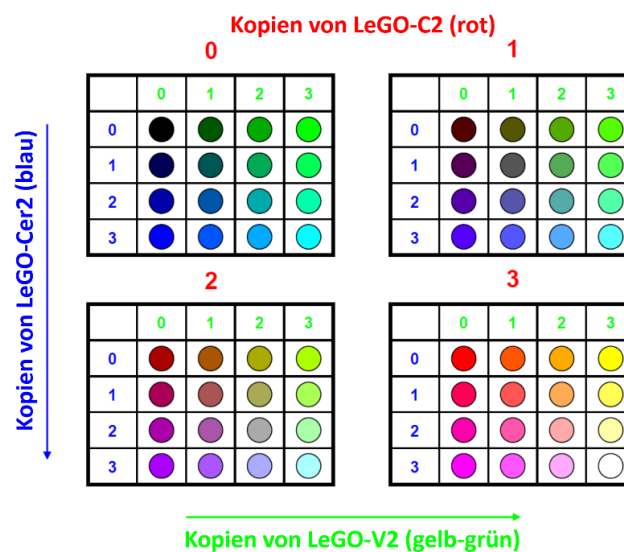


Abbildung 11 **Farbmischungs-Matrix nach dem Prinzip der RGB-Markierung**. Durch die simultane Transfektion von Zellen mit RGB-Vektoren ergeben sich bei einer maximalen Vektorzahl von drei pro Zelle, in Abhängigkeit von der Vektorzahl und der Vektorkombination, 64 verschiedene Farben. (verändert nach Weber et al. (327))

Bei der RGB Markierung von Zellen ist die Farbvielfalt ungleich höher als in Abbildung 11 dargestellt, was teilweise auf eine vielfältigere Transduktionsrate und somit auf eine größere Spannweite der Vektoranzahl pro Zelle zurück zu führen ist (330). Das Farbspektrum RGB-markierter Zellen wird ferner maßgeblich durch die genomische Insertionsstelle der Vektoren bestimmt. In Abhängigkeit dieser kann die Expressionsrate eines Vektors um den Faktor vier schwanken (331).

Von großer Bedeutung für die Farbvielfalt ist neben der Transduktionsrate und der Insertionsstelle der Vektoren auch die Wahl des Richtigen MOI (multiplicity of infection), welcher das Verhältnis der Viruspartikel zu den zu transduzierenden Zellen wiedergibt. Idealerweise sollte der MOI 0,7 betragen. In diesem Fall sollte die theoretische Transduktionsrate je RGB-Vektor, bezogen auf die Zellzahl der Gesamtpopulation circa 50 % betragen. Bei drei unterschiedlichen Vektoren ergeben sich auf diese Weise acht verschiedene, gleichgroße Zellpopulationen welche jeweils 12,5 % der Gesamtpopulation darstellen. In diesem Fall setzt sich die Gruppe 1 aus nicht transfizierten Zellen zusammen, wohingegen Zellen welche einfach oder mehrfach mit einem der drei Vektoren transfiziert wurden die Gruppen 2-4 bilden. Die Gruppen 5-7 sowie die Gruppe 8 setzten sich wiederum aus Zellpopulationen zusammen, welche mit jeweils zwei bzw. drei verschiedenen Vektoren transduziert wurden (Abbildung 12) (327, 330).

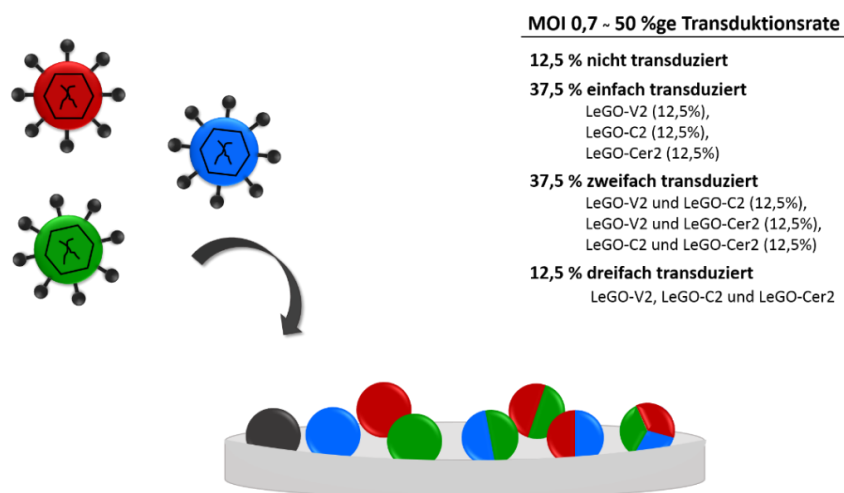


Abbildung 12 Transduktionsschema der RGB-Markierung von Zellen. Bei einem MOI von 0,7 ergibt sich eine theoretische Transduktionsrate von 50 %. In diesem Fall ergeben sich 8 gleichgroße Zellpopulationen (je 12,5 %), welche mit den folgenden Vektoren transduziert wurden: Gruppe 1: nicht transduzierte Zellen; Gruppe 2-4: LeGO-V2, LeGO-C2 oder LeGO-Cer2; Gruppe 5-7: LeGO-V2 + LeGO-C2, LeGO-V2 + LeGO-Cer2 oder LeGO-C2 + LeGO-Cer2; Gruppe 8: LeGO-V2 + LeGO-C2 + LeGO-Cer2.

Sollte der MOI zu niedrig gewählt werden, resultiert dies in einer verminderten Farbvielfalt. Der Grund hierfür ist eine verringerte Anzahl an Zellen, welche mit allen drei Vektoren transduziert wurden. Ein zu hoher MOI äußert sich ebenfalls in einem verminderten Farbspektrum. In diesem Fall überwiegt der Anteil der Zellen, welche mit zwei oder drei verschiedenen Vektoren transduziert wurden, was in einer verminderten Farbsättigung und in der Bildung von Pastelltönen resultiert (Abbildung 13). Desweiteren führt ein erhöhter MOI zu einer gesteigerten Toxizität und einem höheren Risiko insertionaler Mutagenese (332, 333).

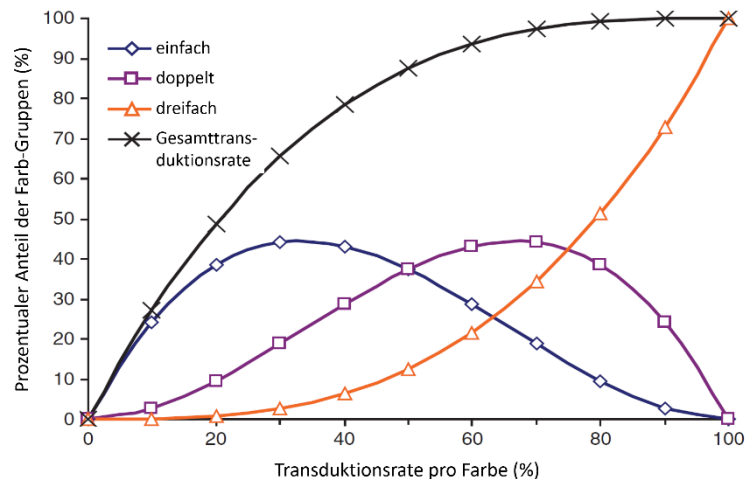


Abbildung 13 Auswirkungen der Transduktionsrate bei einer RGB-Markierung von Zellen. In Abhängigkeit von der Transduktionsrate variiert das Verhältnis einfach- (Zellen mit einer Vektorsorte), doppelt- (Zellen mit zwei unterschiedlichen Vektoren), dreifach- (Zellen mit drei unterschiedlichen Vektoren) und nicht-transduzierter Zellen. Bei einer niedrigen Transduktionsrate (0-40 %) überwiegt der Anteil einfach-transduzierter Zellen, bei einer hohen Transduktionsrate (60-100 %) überwiegt hingegen der Anteil mehrfach-transduzierter Zellen. Ein ideales Verhältnis zwischen den Transduktionsgruppen liegt bei einer Transduktionsrate von 50 % vor. (verändert nach Weber et al. (330))

Bei der Wahl des richtigen MOI und unter idealen Transduktionsbedingungen, ergeben sich bei einer Zellpopulation von 50.000 Zellen theoretisch 6.250 (12,5 %) nicht transfizierte Zellen und 43.700 individuell Fluoreszenz markierte Zellen. Hierbei handelt es sich jedoch nur um eine mathematische Annahme, da der derzeitige technische Stand eine Unterscheidung aller Fluoreszenzfarben und somit aller Klone nicht zulässt (330).

Die RGB-Markierung von Zellen wurde nach dem Protokoll zur RGB-Markierung von 293T-Zellen (330) in Zusammenarbeit mit der Klinik für Stammzellentransplantation des Onkologischen Zentrums des UKE durchgeführt.

3.1.10 Tierexperimente

Alle Tierexperimente wurden durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt und nach den gesetzlichen Vorgaben und Richtlinien für Tierhaltung durchgeführt.

3.1.10.1.1 Tierexperimente mit humanen GBM-Zellen

Zur Ermittlung der *in vivo* Tumorigenität von Zellen wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen intrazerebral in sechs bis acht Wochen alte NMRI-FoxN1^{nu} Nacktmäuse implantiert. Hierzu wurden die zu untersuchenden, adhären-wachsenden Zellen im Vorfeld zunächst mit Trypsin/EDTA vereinzelt, zwei mal mit Medium (ohne Zusätze) gewaschen und auf $62,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Medium (ohne Zusätze) eingestellt. Zur Injektion der Zellen wurden die Versuchstiere durch die intraperitoneale

Injektion von Ketamin (120 mg/kg) und Xylazin (16 mg/kg) narkotisiert (Vollnarkose). Im Anschluss wurden die Tiere stereotaktisch fixiert. Um ein Auskühlen der Tiere zu unterbinden, wurden diese während der Operation auf ein Heizkissen gelegt. Zudem wurden die Augen mit einer Creme bedeckt um eine Reizung oder Austrocknung dieser zu verhindern. Nachdem die Kopfhaut der Tiere mit einer Jodtinktur desinfiziert wurde, wurde die Kopfschwarte durch einen sagittalen Mittellinienschnitt eröffnet. Die Kraniotomie erfolgte durch ein Bohrloch 2 mm links lateral der Sagittalnaht und 1 mm anterior des Bregmans. Zur Injektion der Zellen wurde eine Hamilton-Spritze am Arbeitsarm der Stereotaxie-Vorrichtung angebracht. Nachdem die Nadel der Spritze vorsichtig 2,5 mm tief in das Caudatum/Putamen vorgeschoben wurde, erfolgte die Injektion der Zellen (4 µl mit $1,5 \times 10^5$ Zellen) mit Hilfe der Microinjection-Unit über einen Zeitraum von 5 min, wodurch ein Herausquellen der Zellen aus dem Gewebe verhindert wird. Um eine schnelle Heilung zu gewährleisten, wurde das Bohrloch im Anschluss an die Zellinjektion mit Knochenwachs und die Kopfschwarte mit Gewebekleber verschlossen. Zur Linderung der Schmerzen, wurde den Tieren während der Narkose subkutan 6 mg/kg Carprofen (Rimadyl) verabreicht und post-operativ 1,25 mg/ml Novalgin für drei Tage Trinkwasser beigelegt. Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere regelmäßig überwacht und Gewichtskontrollen durchgeführt. Bei einer Gewichtsabnahme von mehr als 10 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht sowie beim Auftreten neurologischer Symptome, welche auf eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Tiere hindeuteten, wurden diese umgehend durch eine finale CO₂-Narkose getötet. Nachdem der Tod der Tiere festgestellt wurde, erfolgte die Eröffnung des Schädels und die Entnahme des Gehirns, welche in 4 % Formalin (36-40% Formaldehyd) über Nacht fixiert wurde. Im Anschluss wurden die Gehirne in Einbettautomaten des Instituts für Neuropathologie weiter prozessiert und in Paraffinblöcke gegossen. Zur Untersuchung der Gehirne wurden von den Paraffinblöcken mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica) koronare Stufenserienschnitte angefertigt (Dicke: 4 µm), auf SuperFrost Objektträger übertragen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

3.1.10.1.2 Tierexperimente mit RGB-markierten humanen GBM-Zellen

Neben den im Abschnitt 3.1.10.1.1 beschriebenen *in vivo*-Versuchen mit humanen GBM-Zellen, wurden auch Tierversuche mit RGB-markierten humanen GBM-Zellen durchgeführt.

Die Vorbereitung der Zellen sowie die Operation, die post-operative Versorgung und die Kontrolle der Tiere erfolgte wie unter 3.1.10.1.1 beschrieben. Auch in diesem Fall wurden die Tiere bei einem Gewichtsverlust von mehr als 10 % oder dem Auftreten anderer Symptome, welche auf eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes hindeuteten umgehend durch eine

finale CO₂-Narkose getötet. Nach der Entnahme der Gehirne, wurden diese bei 4°C in PBS gelagert. Für eine weitere Auswertung der Versuche, wurden 35-50 µm dicke, serielle Schnitte der Gehirne am Vibratom (VT1000S, Leica) angefertigt. Hierzu wurde die Schneidekammer des Vibratoms mit PBS befüllt und das Gehirn auf die Schneidevorrichtung des Vibratoms geklebt. Die angefertigten Schnitte wurden kurzzeitig in einer mit PBS befüllten 24-Well Platte bei 4°C gelagert. Zur mikroskopischen Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss), wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen und mit Fluoromount-G® (SouthernBiotech) eingedeckelt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Isolation aus Zellen

Zur Isolation der gesamten genomischen DNA aus Zellen wurde in Abhängigkeit von der Zellzahl das NucleoSpin Tissue oder das NucleoSpin Tissue XS Kit von Macherey Nagel verwendet. Die Isolation erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

3.2.2 RNA-Isolation aus Zellen

In Abhängigkeit von der Zellzahl wurde zur Isolation der Gesamt-RNA entweder das NucleoSpin RNA II Kit (bei 5×10^5 bis 5×10^6 Zellen) oder das NucleoSpin RNA XS Kit ($\leq 5 \times 10^5$ Zellen) von Macherey-Nagel verwendet. Die Isolation erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

3.2.3 Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Die Bestimmung der DNA- oder RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Messung der Reinheit, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 230 und 280 nm ermittelt. Anhand des Quotienten aus OD_{260}/OD_{280} wird die Reinheit einer Probe ermittelt. Ein Wert von 1,8 steht für reine DNA wohingegen bei einem Wert von 2,0 reine RNA vorliegt. Ist die Probe ferner frei von Kontaminationen und Proteinen liegt der Quotient aus OD_{260}/OD_{230} zwischen einem Wert von 2,0 und 2,2.

3.2.4 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Um die isolierter RNA einer Zelle (siehe Abschnitt 3.2.2) in cDNA umzuschreiben

Die Umschreibung der isolierter RNA von Zeller in cDNA erfolgte durch eine reverse Transkription unter Verwendung von oligo-dT Primern und mit Hilfe des SuperScript

First-Strand® Synthese Systems. Für einen 100 µl Reaktionsansatz wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Komponenten des Ansatzes (A) auf Eis in einem 0,2 ml großen, DNase und RNase freiem Reaktionsgefäß pipettiert.

Komponente	Menge
RNA	15 µg
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	50 µM
Oligo-dT Primer	2,5 µg
ddH ₂ O (DNase/RNase-freies Wasser)	ad 60 µl

Tabelle 4 Ansatz (A) der Reversen-TRanskriptase-Reaktion

Im nächsten Schritt wurde der Ansatz (A) für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Parallel hierzu wurde der in Tabelle 5 aufgeführte Ansatz (B) pipettiert:

Komponente	Menge/Probe
5x Reaktionspuffer	20 µl
DTT (100 mM)	10 µl
RNaseOut (40U/µl)	5 µl
SuperScript II RT (200 U/µl)	5 µl

Tabelle 5 Ansatz (B) der Reversen-TRanskriptase-Reaktion (SuperScript First-Strand® Synthese System)

Nachdem Abkühlen der Ansatz (B) zum Ansatz (A) gegeben wurde, erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA in der darauffolgenden Inkubationzeit von 52 min bei 42°C. Im Anschluss wurde die Reaktion durch die Hitze-Inaktivierung der Reversen-Transkriptase bei 70°C (15 min) gestoppt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

3.2.5 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Quantitativen Real-Time PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR) beruht auf dem Prinzip der klassischen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der synthetisierten DNA-Menge in Echtzeit. Eine qPCR besteht ebenso wie die klassische, nicht-quantitative PCR aus mehreren Zyklen welche sich jeweils aus der folgenden Phasen zusammensetzten: (i) Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge, (ii) Hybridisierung (annealing) der Primer an komplementäre DNA-Sequenzen und (iii) Elongation des komplementären DNA-Strangs an der freien 3'-OH-Gruppe am Ende des angelagerten Primers (in 5'-3'-Richtung). Die Elongation wird hierbei durch die Aktivität einer DNA-Polymerase, welche zumeist aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq) gewonnen wird, katalysiert. Das auf diese Weise *de novo* entstanden doppelsträngige

DNA-Fragment dient in den darauffolgenden PCR-Zyklen selber als Template für die Synthese weiterer DNA-Fragmente, wodurch die exponentielle Anreicherung von DNA-Abschnitten, welche durch die Primer definiert werden möglich ist.

Die Quantifizierung der synthetisierten DNA-Menge kann durch verschiedene Methoden erfolgen, beruht aber immer auf dem Prinzip der Fluoreszenzmessung. Einige gängige Methoden der qPCR sind Quantifizierung der DNA-Menge durch DNA-interkallierende Farbstoffe (SYBR Green I, Ethidiumbromid) (Abschnitt 3.2.5.2), durch FRET-Sonden oder mit Hilfe von TaqMan-Sonden (Abschnitt 3.2.5.1).

Für die Quantifizierung der qPCR-Produkte wurde in der vorliegenden Arbeit der Ct-Wert der qPCR-Reaktion verwendet, welcher ein Schwellwert ist und angibt bei welchem Zyklus das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant größer ist als das Hintergrund-Fluoreszenzsignal. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden die Ct-Werte der Zielgene gegen die Ct-Werte einer endogenen Kontrolle (house keeping gene, z.B. RPL13a) normalisiert (delta Ct, ΔCt). Zur Ermittlung der relativen Quantität des Ausgangstemplates gegenüber der Bezugsprobe (Kalibratorprobe, z.B. eine unbehandelte Kontrolle), wurde die Differenz aus dem ΔCt -Wert der zu untersuchenden Probe und dem ΔCt -Wert der Kalibratorprobe gebildet ($\Delta\Delta Ct$). Durch das einsetzen des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes in die Gleichung $x = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ wurde die n-fache Expression des Zieltranskript einer Probe gegenüber der Kalibratorprobe bestimmt.

3.2.5.1 TaqMan-PCR

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Menge von Zellen wurde zunächst die gesamt-RNA-Menge der Zellen aufgereinigt (3.2.2), in cDNA umgeschrieben (3.2.4) und eine auf fluoreszenzmarkierten TaqMan Sonden basierende quantitative Real-Time-PCR (qPCR) (siehe Abschnitt 3.2.5) durchgeführt wurde. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit das Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System mit validierten 6-carboxyfluorescein- (FAM) gelabelten TaqMan-Sonden der Firma Applied Biosystems benutzt. Bei diesen Sonden befindet sich der Reporter (FAM) am 5'-Ende und der Quencher am 3'-Ende jeder Sonde. Basierend auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) wird das Fluoreszenzsignal des Reporters, zunächst durch den Quencher unterdrückt. Erst durch den Elongationsprozess kommt es zu einer räumlichen Trennung des Reporters und des Quenchers, wodurch die Energie des angeregten Reporters nicht länger auf den Quencher übertragen und das Fluoreszenzsignal des Reporters detektiert werden kann. Auf diese Weise ist eine Echtzeitdarstellung der synthetisierten Amplifikate möglich.

Die Quantifizierung der Messwerte erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben wobei RPL13a in allen Fällen als endogene Kontrolle (house keeping gene) verwendet wurde. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle PCR-Ansätze mindestens als Triplikate untersucht und der Mittelwert sowie die Standardabweichung dieser berechnet. Für einen qPCR-Ansatz wurde je ein Reaktionsansatzes (20 µl) (Tabelle 6) in ein Well einer thermostabilen 96-Well Platte (Applied Biosystems) pipettiert.

Taq-Man (klassisch)	
Komponente	Menge/Probe
cDNA-Probe	1 µl
Taq-Man Sonde	1 µl
RNase freies Wasser	8 µl
2x Real-Time Mastermix TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	10 µl
Taq-Man (EGFRvIII)	
Komponente	Menge/Probe
cDNA-Probe	1 µl
Taq-Man Sonde	1 µl
EGFRvIII _{forward} Primer	1 µl
EGFRvIII _{revers} Primer	1 µl
RNase freies Wasser	6 µl
2x Real-Time Mastermix TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	10 µl

Tabelle 6 Komponenten eines qPCR-Ansatzes(TaqMan-Sonden: Applied Biosystems)

Die Reaktion wurde unter den von der Firma Applied Biosystems empfohlenen Standardbedingungen durchgeführt (Tabelle 7), wobei 40 Zyklen (Denaturierung, Hybridisierung/Annealing und Elongation) durchlaufen wurden.

Phase	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	50 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
Annealing und Elongation	60°C	1 min

Tabelle 7 qPCR Programm

Folgende TaqMan-Sonden der Firma Applied Biosystems wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Gen	ABI-ID
EGFR _{all}	Hs01076088_m1
wtEGFR	Hs01076078_m1
Humanes RPL-13a	Hs01578912_m1
PI3Kp100 α	Hs00907957_m1
PI3Kp100 β	Hs00927728_m1
PI3Kp100 γ	Hs00227090_m1
PI3Kp100 δ	Hs_00192399_m1
Gen	Primersequenz
EGFRvIII _{forward}	5'-CAG CAG ATG TGG ATC AGC AAG-3' (334)
EGFRvIII _{revers}	5'-GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3' (334)

Tabelle 8 Verwendete TaqMan-Primer der Firma Life Technologies

3.2.5.2 SYBR Green I PCR

Zur Bestimmung des EGFR-Amplifikationsstatus von Zellen, wurde zunächst die gesamt-DNA-Menge der Zellen aufgereinigt (3.2.1) und eine auf SYBR Green I basierende quantitative Real-Time-PCR (qPCR) durchgeführt. Bei SYBR Green I handelt es sich um einen asymmetrischen Cyanin-Farbstoff, welcher in die kleine Furche doppelsträngiger DNA interkaliert. Der auf diese Weise gebildete DNA-Farbstoffkomplex absorbiert blaues Licht ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$) welches von einem Photometer detektiert werden kann.

Zur Messung des SYBR Green I Fluoreszenzsignals wurde in der vorliegenden Arbeit das Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System verwendet. Die Quantifizierung der Messwerte erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben wobei humane Leukozyten-DNA, welche 2 EGFR-Gen-Kopien enthalten in allen Fällen als endogene Kontrolle und INF_{γ} als Housekeeping-gene verwendet wurde. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle PCR-Ansätze mindestens als Triplikate untersucht und der Mittelwert sowie die Standardabweichung dieser berechnet. Für einen 20 μl Reaktionsansatz wurden die Tabelle 9 aufgeführten Komponenten in einem Well einer thermostabilen 96-Well-Platte mit dunklen Wänden (Nunc™ MicroWell™ 96-Well-Platten, Thermo Scientific) pipettiert. Für die SYBR Green I-PCR-Reaktion wurde das Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System verwendet. Zunächst wurden die Proben für 2 min auf 50°C und im Anschluss für 10 min auf 95°C erwärmt. Die

folgenden 60 Zyklen setzten sich aus einer Deanturierungs-Phase (95°C, 15 sek) einer Annealing/Elongations-Phase (60°C, 60 sek) zusammen.

Komponente	Menge/Probe
genomische DNA	4 µl (10ng/µl)
SYBER Green I Master Mix	10 µl
EGFR-1 Primer	0,5 µl (10 pmol/µl)
EGFR-2 Primer	0,5 µl (10 pmol/µl)
INFγ-1 Primer	0,5 µl (10 pmol/µl)
INFγ-2 Primer	0,5 µl (10 pmol/µl)
ddH ₂ O (DNase/RNase-freies Wasser)	5 µl

Tabelle 9 Komponenten sowie Konzentrationen eines PCR-Ansatzes zur Ermittlung der EGFR-Amplifikation

Sequenzen der verwendeten Primer:

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

3.2.6 RTK-Array Analysen

Der RTK-Phosphorylierungsstatus von Zellen wurde mit Hilfe eines Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kits von R&D-Systems ermittelt. Die zu untersuchenden, adhären wachsenden Zellen wurden einen Tag vor dem Versuch angesplittet und semikonfluent ausgesät. Zur Analyse des RTK-Status wurden die Zellen trypsinisiert, vereinzelt und nach Anleitung des Herstellers in Puffer aufgenommen. Durchführung des Arrays erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

3.2.7 Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

Die Amplifikation des EGFR-Gens wurde mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tumorbologie des UKE untersucht. Die Probe zur EGFR-Detektion stammte aus *Homo sapiens* PAC Klon RP5-1091E12 und enthielt nahezu die gesamte EGFR-Gensequenz (Genbank no. AC006977). Zur Standardisierung des Versuchs wurde ferner eine Zentromer-7 Probe (Spectrum Green) verwendet. Mit Hilfe des BioPrime DNA

Labeling Systems (Invitrogen) wurde die Probe mit Spectrum Orange-dUTP (Abbot Molecular, Inc) fluoreszenz-gelabelt. 1 µg der Probe wurde vorsichtig in 19 µl ddH₂O gelöst, für 5 Min aufgekocht und auf Eis abgekühlt. Subsequent wurden 5 µl 10x Deoxynukleoid Triphosphate , 20 µl 2,5x random Hexamere, 1 µl Klenow-Fragment und 5 µl 0,5mmol/L Spectrum Orange-dUTP zur Probe gegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA mit Hilfe einer Bio-Spin 30 Tris Säule (Bio-Rad) isoliert. Zu 1 µl der DNA-Probe wurden im Folgenden 50 µl Cot-1-DNA (1 mg/ml, Invitrogen), 1 µl hairpin-loop DNA (Sigma-Aldrich), 1 µl blue dextran (100 mg/ml) und 7 µl sodium acetat gegeben, bevor die DNA durch die Zugabe von 2,5 Volumeneinheiten gefällt wurde. Im Anschluss wurde das DNA-Pellet in 10 µl einer 50 %igen Formadine-Lösung und 2x SSC aufgenommen. Die gelöste DNA wurde im Anschluss über Nacht (37°C) auf im Vorfeld endparaffinierte Maus-Hirn-Paraffinschnitte (4 µm) gegeben (Endparaffinierung: 0,25mg/ml Proteinkinase K, 45 min bei 45°C). Am folgenden Tag wurden nicht hybridisierte DNA-Sonden durch das Waschen der Schnitte bei 45°C mit 50 % formadine, 2x SSC und 2x SSC/0,1 % Tween 20 entfernt. Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte im Anschluss mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories) bevor die Zellen mit Citifluor antifading solution (Agar Scientific) fixiert wurden.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinisolation

Für die Proteinisolation aus eukaryotischen Zellen wurde Triton X-Lysis-Puffer verwendet (Abschnitt 7.1.6). Um eine Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern, wurde der Lysis-Puffer zusätzlich mit Orthovanadat (Phosphatase-Inhibitor, 2mM) versetzt.

Zur Proteinisolation wurden adhärente- und sphäroid-wachsende Zellen zunächst mit gekühltem PBS (4°C) gewaschen und in Triton X-Lysis-Puffer + Orthovanadat (gekühlt, 200 µl, je 1×10^6 Zellen) aufgenommen, wobei die Zellen bei jedem Schritt auf Eis gelagert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min schüttelnd auf Eis inkubiert und für 30 min bei 1300 rpm in einer Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert. Sowohl das Pellet als auch der Überstand wurden entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert, oder für eine nachfolgenden SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (Abschnitt 3.3.2) direkt mit Lämmli-Puffer versetzt.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-Page)

Zur analytischen Trennung der Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts wurden Gradienten-Gel (4-15 %) der Firma Bio-Rad verwendet (Abschnitt 7.1.2). Nachdem die Proteine aus den zu untersuchenden Zellen isoliert wurden, (Abschnitt 3.3.1) die Pellets zur Analyse von Kern-Proteinen in 2fach Lämmli-Puffer aufgenommen (Volumen des Puffers entsprach dem eingesetzten Lysis-Puffer-Volumen), wohingegen die Überstände mit 10fach Lämmli-Puffer versetzt wurden (Endkonzentration 1fach) (Abschnitt 7.1.6). Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben im Anschluss für 5 min bei 98°C aufgeköcht. Aufgrund des im Lämmli-Puffers enthaltenen β -Mercaptoethanols werden auf diese Weise vorhandene Disulfidbrücken und durch das ebenfalls enthaltene SDS (sodium dodecyl sulfate) nicht-kovalente Bindungen zwischen Aminosäuren zerstört. Zudem erhalten alle Proteine durch die Anlagerung des SDS eine negative Ladung, was eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe ermöglicht.

Als Marker für das Molekulargewicht der Proteine wurde bei jeder SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (-Page) zusätzlich 10 μ l des Precision Plus Protein™ Standard Dual Color (Bio Rad) mit auf das Gradienten-Gel aufgetragen. Von den Proteinlysaten wurden jeweils 2-18 μ l pro Gel-Tasche aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100 Volt (Dauer: 1 bis 2 Stunden).

3.3.3 Western Blot

Zur Identifizierung der in der SDS-Page aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Western Blot. Hierzu wurden die Gradienten-Gele nach Anweisung des Herstellers aus den Gel-Kammern gelöst. Im Anschluss erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran (Abschnitt 7.1.2). Hierzu wurden die Membran zunächst aktiviert (Inkubation in: (i) Methanol (ii) H₂O und (iii) Transfer-Puffer (Abschnitt 7.1.6) und zusammen mit dem Gradienten-Gel zwischen zwei Glasfasermatten und je zwei in Transfer-Puffer getränkte Whatman-Filter (3MM) fixiert (Abschnitt 7.1.2). Der Transfer der Proteine erfolgte in einer Blot-Kammer in eiskaltem Transferpuffer bei 100 Volt (30 min). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran im Anschluss an den Blot-Vorgang für mindestens 1 Stunde mit Roti-Block inkubiert (Abschnitt 7.1.4). Die anschließende Inkubation des Primären-Antikörpers [Tabelle 10, gelöst in TNT-Puffer (Abschnitt 7.1.6)] erfolgte über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden am folgenden Tag durch drei Waschschrte mit TNT (je 10 min) von der Membran entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation des Sekundären-Antikörpers (Tabelle 11,

gelöst in TNT) für 1 Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur (RT). Auch in diesem Fall wurden ungebundene Antikörper durch drei Waschriffe mit TNT (je 10 min) entfernt.

Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde die Membran zunächst mit ddH₂O gespült und im Anschluss für 5 min mit den Chemi-lumineszenz-Reagenzien Luminol/Enhancer und stabiler H₂O₂-Lösung (SuperSignal West Pico oder Femto) inkubiert (Abschnitt 7.1.4). Die Detektion der Signale erfolgte in der Dunkelkammer. In Abhängigkeit von der Signalstärke, wurden X-Ray Filme (Fuji Medical) mit variabler Expositionszeit aufgelegt und im Anschluss entwickelt. Die densitometrische Quantifizierung der Signale erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ.

Antikörper	Spezies	Klonalität	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
Tubulin	Maus	monoklonal	0,1 µg/ml	Calbiochem	CP06
Akt	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	4691
P-Akt	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	4060
EGFR, (1005) [intrazellulär]	Kaninchen	monoklonal	0,2 µg/ml	Santa Cruz	sc-03
Phospho-EGFR (Tyr1068)	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	2234
ERK 1/2 [p44/42 MAPK]	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	9102
ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) [p44/42 MAPK]	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	9101
Histone H3 (D1H2) XP	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	4499
Acetyl-Histone H3 (Lys9) Antibody	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	9671
L8A4	Maus	monoklonal	0,1 µg/ml	D.Bigner (335)	-
PI3Kinase Class III (D4E2)	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	3358P
P-PI3K p85 (Y458)/p55(Y199)	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	4228S
PI3Kp85	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	4257
PI3Kp100α	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	4249
PI3Kp100β	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	3011
PI3Kp100δ	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Abcam	Ab109006
PTEN	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	138G6
P-PTEN	Kaninchen	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Cell Signaling Technologies	9551

Tabelle 10 Verwendete Primäre-Antikörper (Western Blot)

Antikörper	Gekoppelte Substanz	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
α -Kaninchen-IgG	HRP	Schaf	1:80000	Sigma	A0545
α -Maus-IgG	HRP	Schaf	1:20000	Sigma	A9309

Tabelle 11 Verwendete Sekundäre-Antikörper (Western Blot)

3.3.4 Entfernung gebundener Antikörper (Strippen)

Um an die PVDF-Membran gebundene Primäre- und Sekundäre-Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen zunächst mit TNT-Puffer gewaschen (5 min, RT) und für 15 min bei RT mit Restore Western Blot Buffer (Abschnitt 7.1.6) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (TNT-Puffer, 5 min bei RT), wurden die Membranen wie im Abschnitt 3.3.3 beschrieben erneut blockiert und für die Detektion weiterer Proteine verwendet.

3.3.5 Magnetic Cell Sorting (MACS)

Um die Bildung von EGFR Heterodimeren nachzuweisen wurde das Magnetic Cell Sorting (MACS)-System von Miltenyi Biotec verwendet. Hierzu wurden BS153-Zellen einen Tag vor dem Versuch angesplittet und semikonfluent ausgesät (Zellkulturschale). Am Versuchstag wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS/0,01 % NaN_3 gewaschen, vorsichtig mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst und in PBS/0,01 % NaN_3 aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers (Tabelle 12) für 45 min bei 4°C. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen wurden die Zellen mit PBS/0,01 % NaN_3 gewaschen. Im nächsten Schritt folgte die Bindung der primären Antikörper an anti-Maus IgG Microbeads (Miltenyi Biotec) des MACS-Systems sowie die Trennung der Zellen mit Hilfe einer MiniMACS™ MS-Säule (Miltenyi Biotec). In beiden Fällen wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen. Die Auswertung des Experiments erfolgte mittels Western Blot.

Antikörper	Spezies	Klonalität	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
EGFR.1 (extrazellulär)	Maus	monoklonal	3 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Scientific	MA5-13048
L8A4	Maus	monoklonal	3 $\mu\text{g/ml}$	D.Bigner (335)	-

Tabelle 12 MACS-System: Primäre Antikörper

3.3.6 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse können einzelne Zellpopulationen anhand der Zellgröße oder Zellmorphologie innerhalb einer Gesamtpopulation identifiziert und quantifiziert

werden. Zudem ist es mittels spezifischer Antikörper möglich, Zellen mit unterschiedlichem Antigen-Expressionsmuster voneinander zu unterscheiden. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Fluoreszenzmarkierung von Zellen durch Fluorochrom-gekoppelte Antikörper oder Proteine, welche an spezifische Antigene bzw. an spezifische zelluläre Strukturen binden. Es ist ferner möglich Zellen durch chemischer Substanzen, welche von den Zellen aufgenommen und intrazellulär in fluoreszierende Moleküle umgesetzt werden, zu markiert. Während einer durchflusszytometrischen Analyse einer Zellpopulation fließen alle Zellen mit hohem Tempo in einem dünnen Strahl in den Mikrokanal einer Küvette und passieren dabei einen Laserstrahl. Das auf diese Weise entstandene Streulicht wird im Vorwärtsstreulicht-Kanal (forward scatter, FCS) und im Seitwärtstreulicht-Kanal (sideward scatter, SSC) detektiert, wobei das Signal des FCS ist ein Maß für die Größe der Zelle und der SSC ein Maß für die Granularität einer Zellen ist. In Abhängigkeit von der Wellenlänge des Laserstrahls, können zudem unterschiedliche Fluoreszenzproteine angeregt werden deren Emission von einem Photomultiplier detektiert wird.

Um die Signifikanz der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle durchflusszytometrischen untersuchten Proben mindestens als Quadruplikate gemessen und der Mittelwert sowie die Standardabweichung dieser berechnet. Als Kontrolle diente in allen Fällen eine unbehandelte Probe.

Die Farbverteilung von RGB-gefärbten Zellen wurde am FACS Aria™ III (BD) der Corefacility des UKE untersucht. Zur Vorbereitung, wurden die adhären wachsenden Zellen einen Tag vor dem Versuch angesplittet und semikonfluent ausgesät (Zellkulturschale). Am Versuchstag wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis vorsichtig mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst und in kaltem PBS aufgenommen. Bis zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Um den wtEGFR/EGFRvIII Status von Zellen mittels Durchflusszytometrie zu ermitteln, wurden die zu untersuchenden Zellen am Vortag der Messung angesplittet und semikonfluent ausgesät. Am Versuchstag wurden die adhären wachsenden Zellen auf Eis mit einer kalten 0,01 %igen NaN_3 -PBS-Lösung gewaschen, vorsichtig mit einem Zellkulturschaber vom Gefäßboden gelöst und in 0,01 % NaN_3 -PBS aufgenommen. Im Anschluss an einen Zentrifugationsschritt (4°C , 1.300 rpm) wurden je 2×10^5 Zellen pro 150 μl NaN_3 -PBS in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Die Inkubation der primären Antikörper (Tabelle 13) erfolgte für 1 Stunde auf Eis auf einem Schüttler. Um nicht gebundene Antikörper von den Zellen zu trennen wurden diese mit 0,01 % NaN_3 -PBS gewaschen und mit je 150 μl FCS unterschichtet. Die Inkubation der sekundären Antikörper (Tabelle 14) erfolgte für 1 Stunde auf

Eis auf einem Schüttler. Nachdem darauffolgenden Waschschrift (0,01 % NaN_3 -PBS und FCS) wurden die Zellen zur abschließenden Färbung der Nuklei in 150 μl DAPI-Cystain aufgenommen. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte an einem Partec PAS Durchflusszytometer.

Antikörper	Spezies	Klonalität	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
EGFR.1 (extrazellulär)	Maus	monoklonal	3 $\mu\text{g/ml}$	Thermo Scientific	MA5-13048
L8A4	Maus	monoklonal	3 $\mu\text{g/ml}$	D.Bigner (335)	-

Tabelle 13 Verwendete Primäre-Antikörper (Durchflusszytometrie)

Antikörper	Gekoppelte Substanz	Spezies	Fluoreszenz	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Maus	FITC	Schaf	grün	10 $\mu\text{g/ml}$	Dako	F0479

Tabelle 14 Verwendete Sekundäre-Antikörper (Durchflusszytometrie)

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Histologische Untersuchungen mittels H&E-Färbung

Um die Lokalisation, Morphologie sowie das Maß der Invasion von Maushirnen aus Maus-Xenograft-Tumoren zu untersuchen wurden Gewebeschnitte mittels Hämatoxylin-Eosin (H&E-Färbung) angefärbt (Präparation der Gewebeschnitte siehe Abschnitt 3.1.10.1.1). Da Hämatoxylin seine färbenden Eigenschaften erst durch die Oxidation zu dem blauen Farbstoff Hämatein entwickelt, färbt Hämatoxylin bzw. Hämatein alle sauren Bestandteile einer Zelle (überwiegend die DNA der Zellkerne) blau an. Bei Eosin handelt es sich hingegen um einen Farbstoff welcher alle basischen Strukturen einer Zelle und somit vor allem zytoplasmatische Strukturen wie Proteine des Zytoplasmas, Mitochondrien, Kollagen, Keratin u.a. an.

Zur H&E-Färbung von Mäusehirnen wurden zunächst folgende Lösungen hergestellt:

Eosin-Stammlösung (1%)	1000ml Ethanol (99%) + 10 g EosinG
Ethanol/HCl-Differenzierungslösung	964 ml Ethanol (98%) + 21,6 ml HCl (25%)

Von den im Vorfeld fixierten Mäusehirne (Abschnitt 3.1.10.1.1) wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica) koronare Stufenserienschnitte angefertigt (Dicke: 4 μm), auf SuperFrost

Objektträger übertragen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Zur Entparafinierung wurden die Schnitte am Folgetag zweimal für je 10 min in Xylol inkubiert und im Anschluss jeweils 2 min in einer absteigenden Alkoholreihe (98 %, 96 %, 80 %, 70 %) rehydriert. Nachdem die Schnitte 5 min mit ddH₂O gewaschen wurden, erfolgte die Färbung der Kerne durch eine 5 minütige Inkubation in Hämatoxylin. Um das überschüssige Hämatoxylin zu entfernen, wurden die Schnitte vorsichtig unter fließendem Leitungswasser für 5 min gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte für 2 sek in Ethanol/HCl differenziert und für weitere 5 min erneut unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Eosin-Färbung durch eine 7 minütige Inkubation in einer 1 %igen Eosin Lösung (in 96 % Ethanol). Um das überschüssige Eosin zu entfernen und die Schritte zu Dehydrieren, wurden diese im Anschluss für jeweils 10 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90 %, 96 %, 100 %) und für 10 min in Xylol inkubiert. Zur mikroskopischen Analyse der H&E-Färbung wurden die Schnitte mit Eukitt® Eindeckmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen bedeckt.

3.4.2 Immunhistologische Färbung

Um die Expressionsmuster spezifischer Gene in Gewebsschnitten zu bestimmen wurden Gewebsschnitte von Maushirnen aus Maus-Xenograft-Versuchen immunhistologisch gefärbt (Präparation der Gewebeschnitte siehe Abschnitt 3.1.10.1.1). Hierzu wurden zuvor getrocknete Stufenserienschnitte zunächst zweimal für 10 Min in Xylol entparaffiniert. Um die Schnitte von überschüssigem Xylol zu befreien, wurden diese für 2 min in 100 % Ethanol inkubiert. Die Blockierung endogener Peroxidasen erfolgte in 3 % H₂O₂ in 100 % Ethanol (3 min), bevor die Schnitte zur Rehydrierung in 2 min Intervallen eine abfallende Alkoholkonzentrationsreihe (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 % Ethanol) durchliefen. Nachdem die Schnitte 5 min in H₂O gewaschen wurden erfolgte die Demaskierung der Gewebsschnitte für 60 min kochendem Citrat-Puffer (pH 6,0, Abschnitt 7.1.6). Nachfolgend wurden die Schnitte für jeweils 5 min mit ddH₂O und Trit-Triton-Puffer (TTP, Abschnitt 7.1.6) gewaschen bevor über Nacht die Inkubation des Primären-Antikörpers (in TTP, Tabelle 15) bei 4°C in einer Feuchtkammer erfolgte. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte am folgenden Tag dreimal für 5 min mit TTP gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation des Sekundären-Antikörpers (in TTP, Tabelle 16) für 1 Stunde bei RT in einer Feuchtkammer, bevor die Schnitte erneut dreimal für 5 min mit TTP gewaschen wurden. Zur Detektion der gebundenen Antikörper-Komplexe wurden die Schnitte nachfolgend mit NovaRed Substrat für Peroxidasen (Abschnitt 7.1.4) behandelt, wobei das Substrat durch die Aktivität der HRP der Sekundären-Antikörper in einen bräunlichen Farbstoff umgesetzt wird. Um die Farbreaktion zu stoppen wurden die Schnitte im für 5 min

unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zur Anfärbung der Kerne wurden die Schnitte im Anschluss für 30 sek in Mayer's Hämalaun inkubiert bevor sie erneut für 10 min mit fließendem Leitungswasser gewaschen wurden. Zur mikroskopischen Auswertung der Immunfärbung, wurden die Schnitte mit Glycingelatine eingedeckelt (Abschnitt 7.1.4).

Antikörper	Spezies	Klonalität	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
L8A4	Maus	monoklonal	0,1 µg/ml	D.Bigner (335)	-
EGFR, (1005)	Kaninchen	monoklonal	0,2 µg/ml	Santa Cruz	sc-03
Ki-67 Antigen, Clone MIB-1	Maus	monoklonal	Nicht quantifiziert, 1:1000 verdünnt	Dako	M724029-2

Tabelle 15 Verwendete Primäre-Antikörper (Immunhistologische Färbung) M724029-2

Antikörper	Gekoppelte Substanz	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Histofine® Simple Stain™ MAX PO (M) Histofine α-Maus-IgG	HRP	Schaf	unverdünnt	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan	41413
Histofine® Simple Stain™ MAX PO (R) Histofine α-Kaninchen-IgG	HRP	Schaf	unverdünnt	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan	41414
Histofine® Simple Stain™ MAX PO (G) Histofine α-Schaf-IgG	HRP	Kaninchen	unverdünnt	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan	41416

Tabelle 16 Verwendete Sekundäre-Antikörper (Immunhistologische Färbung)

3.5 Auswertung und Statistik

Die Aufarbeitung der Daten sowie die Auswertung und die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programmen Excel (Microsoft Office, Microsoft Corporation). Zur Darstellung der Überlebensspanne von Versuchstieren der *in vivo* Maus-Xenograft-Experimente, wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit Hilfe der Software MedCal erstellt. Die Signifikanz wurde mittels Longrank-Tests berechnet. Alle Ergebnisse wurden in Form von Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Die vergleichende Statistik erfolgte mit Hilfe von Excel (Microsoft Office, Microsoft Corporation). Das t-Test-Verfahren wurde zum Vergleich zweier Gruppen, unabhängiger oder abhängiger Stichproben, angewandt. Ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde in allen Fällen als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf BS153-Zellen

Da etwa die Hälfte aller GBM-Patienten eine Überexpression des EGFR aufweisen, wurden verschiedenste TKI und mAK zur Inhibierung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion entwickelt. Obwohl EGFR-spezifische TKI und mAK in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse lieferten, konnten diese in klinischen Studien nicht bestätigt werden (198, 200, 336). Ein Grund für diese Diskrepanz ist vermutlich nicht zuletzt die Wahl inadäquater *in vitro* Modellsysteme. Da primäre GBM-Zellen *in vitro* in der Regel ihre EGFR-Amplifikation verlieren (337), wurden in der Vergangenheit häufig ektopisch EGFR exprimierende GBM-Modellsysteme gewählt, welche sich jedoch anders Verhalten als GBM-Zellen mit endogener EGFR-Amplifikation (323). Anders als bisher charakterisierten GBM-Zelllinien exprimiert die ursprünglich von Jones et al. beschriebene BS153-Zelllinie, welche als Modellsystem für diese Arbeit ausgewählt wurde, EGFRvIII und zeigt eine etwa 50fache EGFR-Genamplifikation (324). BS153-Zellen wachsen *in vitro* als adhärenter Monolayer und sind in der Lage, invasive Maus-Xenograft-Tumore induzieren (Abbildung 14 C, D). Sie stellen somit ein repräsentatives EGFR-amplifiziertes und EGFRvIII-exprimierendes Modellsystem dar, um die Wirkung EGFR-spezifischer TKI oder mAK *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

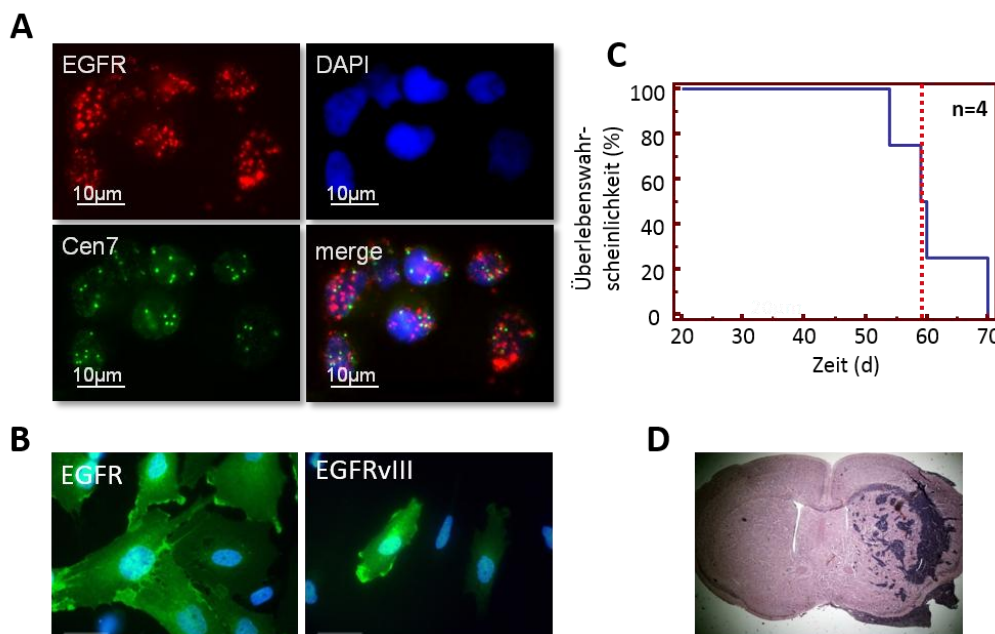


Abbildung 14 **BS153-Zellen.** (A) FISH-Analyse: BS153-Zellen zeigen eine deutliche EGFR-Amplifikation. Vereinzelte EGFR-Signale außerhalb des Nukleus sind charakteristisch für extrachromosomale Double-Minute-Chromosomen während der Interphase. Alle Zellen weisen eine Polysomie des Chromosoms 7 auf. (rot, EGFR; grün, Cen7; blau, DAPI). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen: BS153-Zellen zeigen eine deutliche Färbung für EGFR und EGFRvIII (grün, EGFR bzw. EGFRvIII; blau, DAPI/Nukleus). (C) Kaplan-Meier Überlebenskurve von Maus-Xenograft-Versuchen mit BS153-Zellen: BS153-Zellen wurden in das Caudatum/Putamen von NMRI/Fox1^{nu} Nacktmäuse implantiert; mediane Überlebensdauer: 59 Tage (rote Linie). (D) H&E Färbung von Maushirnen des Versuchs (C): BS153-Zellen induzieren *in vivo* invasive Tumore.

Da GBM ein stark invasives Wachstum zeigen, sollte eine effiziente GBM-Therapie idealerweise die Proliferation und Migration von GBM-Zellen unterbinden. Um die Auswirkungen einer EGFR-spezifischen TKI- und mAK-Behandlung zu bestimmen, wurde zu Beginn dieser Arbeit der Einfluss einer Erlotinib-, Gefitinib- (TKI) bzw. einer Cetuximab- (mAK) Behandlung auf die Proliferation (Abschnitt 4.1.1), Migration (Abschnitt 4.1.2) und den wtEGFR/EGFRvIII-Status (Abschnitt 4.1.3) von BS153-Zellen *in vitro* untersucht.

4.1.1 Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die Proliferation von BS153-Zellen

Um die Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf BS153-Zellen auf die Proliferation zu untersuchen, wurden diese zunächst über einen Zeitraum von 72 und 144 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,5-10 µg/ml) der TKI bzw. des mAK behandelt. Im Anschluss wurde der relative ATP-Gehalt der Zellen, welcher ein Maß für die Proliferationsaktivität ist, über ein lumineszenzbasiertes Verfahren gemessen (Abschnitt 3.1.5).

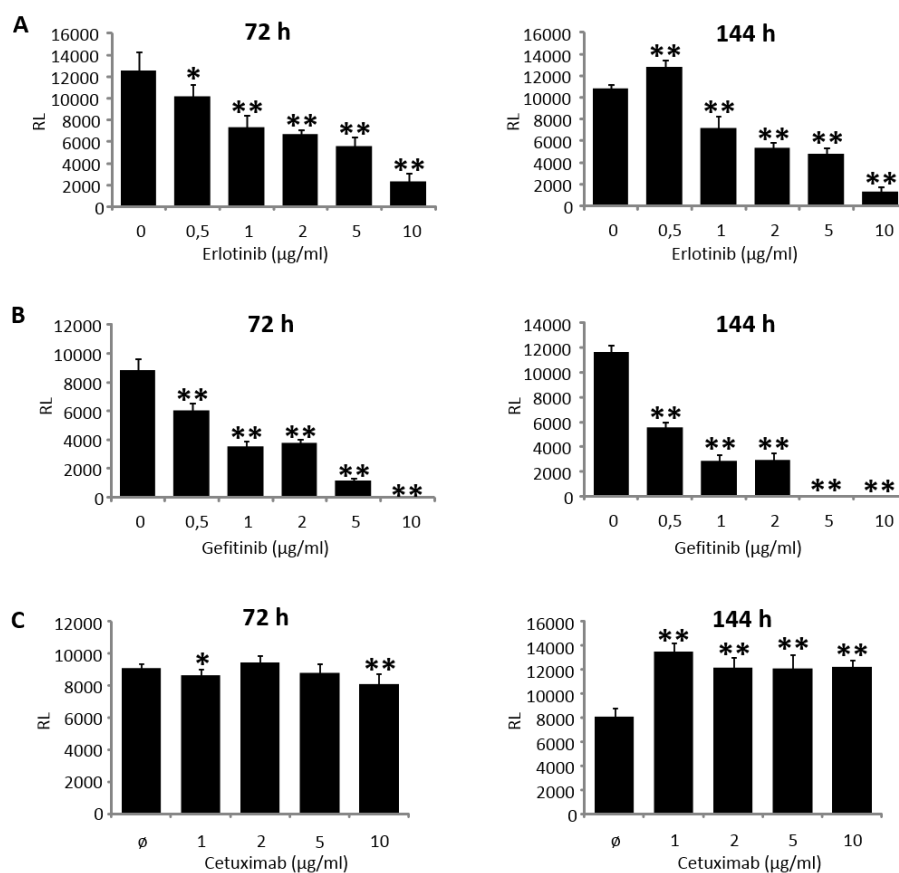


Abbildung 15 Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die Proliferation von BS153-Zellen. BS153-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen der TKI Erlotinib (A) und Gefitinib (B) bzw. des mAK Cetuximab (C) behandelt. Die Proliferation wurde nach 72 h und 144 h gemessen (CellTiter-Glo®-Assay). Erlotinib und Gefitinib inhibierten die Proliferation signifikant und konzentrationsabhängig. Cetuximab zeigte hingegen keinen inhibitorischen Effekt (72 h) und stimulierte die Proliferation teilweise sogar (144 h). [Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten; RL, relative Lumineszenz; * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, t-test; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung $\pm$ Standardabweichung (SA)]

Die Behandlung mit Erlotinib und Gefitinib führte innerhalb von 72 Stunden zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Inhibition der Proliferation. Eine Gefitinib-Konzentration von 1 µg/ml war ausreichend, um die Proliferation um mehr als 50 % zu senken (Abbildung 15 B), wohingegen ein vergleichbarer Effekt erst bei einer Erlotinib-Konzentration von 5 µg/ml erzielt wurde (Abbildung 15 A). Ferner führte die Behandlung mit 5 und 10 µg/ml Gefitinib innerhalb von 144 Stunden zu einer vollständigen Inhibition der Proliferation (Abbildung 15 B). Zellen, welche mit 10 µg/ml Erlotinib behandelt wurden, wiesen im gleichen Versuchszeitraum hingegen immer noch eine leichte Proliferationsaktivität auf. Interessanterweise zeigten mit 0,5 µg/ml Erlotinib behandelte Zellen nach 144 Stunden eine leichte, aber signifikante Steigerung der Proliferation ($p < 0,005$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen) (Abbildung 15 A). Für Gefitinib konnte ein derartiger Effekt nicht beobachtet werden (Abbildung 15 B).

Die Behandlung mit Cetuximab führte nach 72 Stunden lediglich bei einer Konzentration von 1 und 10 µM zu einer marginalen Inhibition der Proliferation. 144 Stunden nach der Behandlung mit dem mAK konnte für alle Konzentrationen (1-10 µM) eine signifikante Steigerung der Proliferation gemessen werden (Abbildung 15 C). Somit konnten die TKI Erlotinib und Gefitinib die Proliferation von BS153-Zellen signifikant inhibieren, wohingegen eine Behandlung mit dem mAK Cetuximab *in vitro* keine Wirkung zeigte.

4.1.2 Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die Migration von BS153-Zellen

Um den Einfluss von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die Migration zu ermitteln, wurden BS153-Zellen mit jeweils 10 µg/ml (25 µM) der TKI bzw. des mAK behandelt. Die Messung der Migration erfolgte nach 6 Stunden mit Hilfe eines modifizierten Boyden Chamber Assays (Abschnitt 3.1.6), wobei sowohl die ungerichtete als auch die chemotaktisch gesteuerte Migration in Richtung des EGFR-Liganden EGF, ermittelt wurde.

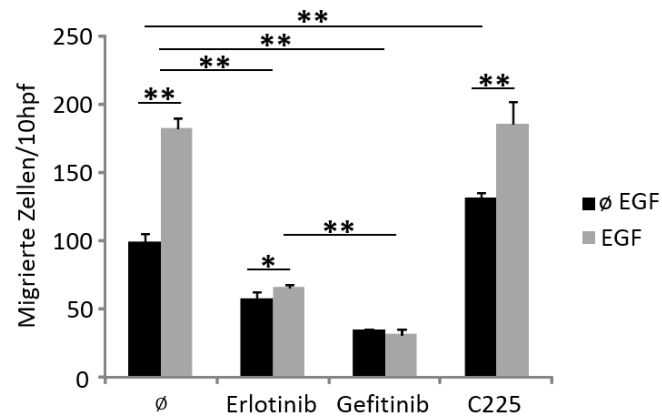


Abbildung 16 **Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die Migration von BS153-Zellen.** BS153-Zellen wurden mit 10 µg/ml Erlotinib, Gefitinib oder Cetuximab behandelt. Die Migration erfolgte ungerichtet oder gerichtet (chemotaktisches Stimulanz: 20 nM EGF) jeweils über einen Zeitraum von 6 h. EGF stimulierte die Zellmigration wohingegen Erlotinib und Gefitinib die Migration signifikant inhibierten. Die Behandlung mit Cetuximab steigerte die ungerichtete Migration; bei einer zusätzlichen Stimulation mit EGF veränderte sich die Migration im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht. [$*P < 0.05$, $**P < 0.005$, t-test; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung $\pm$ SA; dargestellt wurde eines von drei unabhängigen Experimenten; hpf, high power fields (Hauptgesichtsfeld)]

In Abwesenheit der TKI induzierte EGF, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (ungerichtete Migration) eine signifikante Steigerung der Migration (Abbildung 16). Die Behandlung der Zellen mit den beiden TKI Erlotinib und Gefitinib führte sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von EGF, zu einer signifikanten Reduktion der Migration, wobei Gefitinib ($65 \% \pm 1$) die Migration effizienter inhibierte als Erlotinib ($53 \% \pm 5$). Die Behandlung mit dem mAK Cetuximab führte in Abwesenheit von EGF hingegen zu einer Steigerung der Migration ($30 \% \pm 5$). Bei zusätzlicher EGF Stimulation zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede. Erlotinib und Gefitinib konnten somit die Migration von BS153-Zellen inhibieren, wohingegen die Behandlung mit Cetuximab zu einer Steigerung der ungerichteten Migration führte.

4.1.3 Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion von BS153-Zellen

Im nächsten Schritt sollten die Auswirkungen einer Erlotinib-, Gefitinib- oder Cetuximab-Behandlung auf die EGFR-Expression und -Aktivität sowie auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion untersucht werden. Hierzu wurden BS153-Zellen über einen Zeitraum von 30 min mit den TKI oder dem mAK (je 10 µg/ml) behandelt. Nach 10 min erfolgte zudem eine zusätzliche Stimulation mit EGF (20 nM). Im Anschluss wurde der Phosphorylierungsstatus von Akt, einem Schlüsselprotein des EGFR/EGFRvIII-vermittelten PI3K-Akt-Signalwegs, und Erk, einem zentralem Protein des EGFR/EGFRvIII-vermittelten Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs, im Western Blot untersucht.

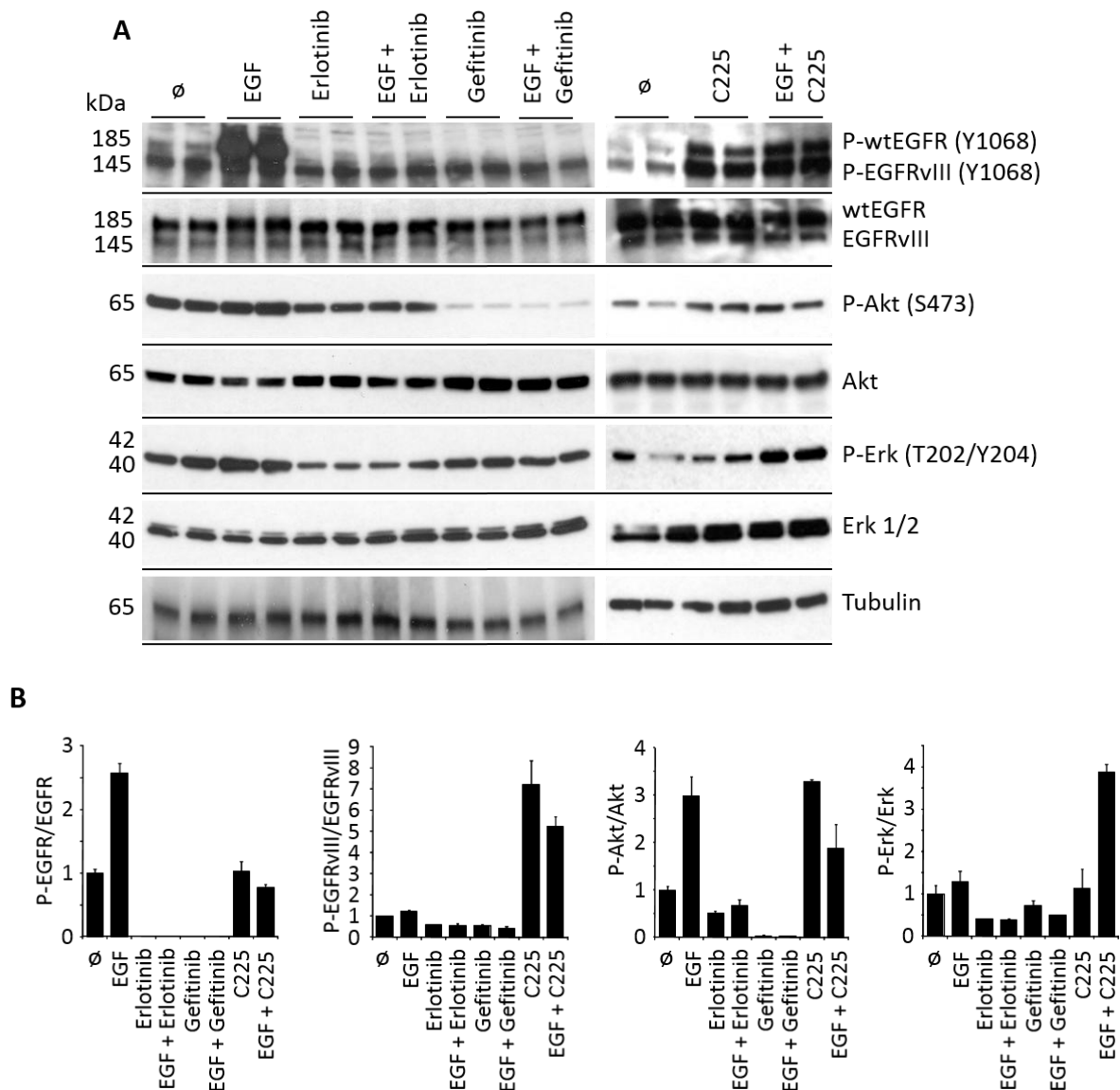


Abbildung 17 Wirkung einer Erlotinib-, Gefitinib- oder Cetuximab-Behandlung von BS153-Zellen auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion. (A) BS153-Zellen wurden für 10 min mit Erlotinib, Gefitinib oder Cetuximab (10 μ g/ml) präinkubiert bevor sie für 20 Min mit EGF (20 nM) stimuliert wurden. (B) Densitometrische Quantifizierung der Protein-Phosphorylierung. (A)-(B) Erlotinib und Gefitinib inhibierten die Phosphorylierung (P-) von EGFR, Akt und Erk unabhängig von einer Stimulation mit EGF. Die Phosphorylierung von EGFRvIII wurde durch die TKI hingegen nur geringfügig beeinflusst. Die Behandlung mit Cetuximab induzierte eine gesteigerte EGFRvIII-Phosphorylierung, sowie eine erhöhte Erk- und Akt-Phosphorylierung. [Ladekontrolle: Tubulin, dargestellt wurde eines von drei unabhängigen Experimenten]

Die Stimulation mit EGF führte zu einem starken Anstieg der wtEGFR-Phosphorylierung, sowie zu einer gesteigerten Akt- und Erk-Phosphorylierung sowie zu einer geringfügig gesteigerten Phosphorylierung von EGFRvIII (Abbildung 17 A und B). Interessanterweise wurde die Phosphorylierung von EGFRvIII durch die Behandlung mit Erlotinib oder Gefitinib nur geringfügig beeinflusst, wohingegen die Phosphorylierung von wtEGFR durch die beiden TKI fast vollständig reduziert werden konnte. Ferner führten Erlotinib oder Gefitinib zu einer Reduktion der Akt- und Erk-Phosphorylierung, wobei Erlotinib die Aktivierung von Erk etwas deutlicher und Gefitinib die Aktivierung von Akt fast vollständig inhibierte. Alle genannten Effekte waren unabhängig von der

Stimulation mit EGF. Im Gegensatz zu den TKI bewirkte der Einsatz von Cetuximab sowohl in An- als auch in Abwesenheit von EGF keine Inhibition der EGFR-Phosphorylierung. Vielmehr führte die Behandlung mit Cetuximab zu einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung von wtEGFR und EGFRvIII. Zudem induzierte Cetuximab in Abwesenheit von EGF die Phosphorylierung von Akt und Erk. Zusammenfassend konnten Erlotinib und Gefitinib die EGFR-vermittelte Signaltransduktion mit leichten Spezifitätsunterschieden inhibieren, wohingegen eine Behandlung mit Cetuximab zu einer Induktion der untersuchten Signalwege führte.

4.2 Chronische Behandlung von BS153-Zellen mit TKI: Etablierung einer Erlotinib-resistenten Zelllinie

Da die Ergebnisse der Versuche 4.1 gezeigt haben, dass Cetuximab im Gegensatz zu Erlotinib und Gefitinib nicht in der Lage ist die Proliferation, die Migration oder die EGFR-abhängige Signaltransduktion zu inhibieren, wurden die folgenden Versuche lediglich auf die beiden TKI beschränkt.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Erlotinib-vermittelten Inhibition der Proliferation um einen temporären oder permanenten Effekt handelte, wurden BS153-Zellen chronisch (> 15 Passagen) mit 10 µg/ml des TKI behandelt (BS153_{Erlotinib}-Zellen). Im Anschluss wurde die Proliferationsrate von BS153_{Erlotinib}-Zellen in Anwesenheit von Erlotinib und Gefitinib über einen Zeitraum von 144 Stunden ermittelt. Da bereits gezeigt wurde, dass eine Behandlung mit 5 und 10 µg/ml Gefitinib nach sechs Tagen zu einer vollständigen Inhibition der Proliferation führte (Abschnitt 4.1.1, Abbildung 15) wurde dieser Versuch lediglich mit Erlotinib durchgeführt.

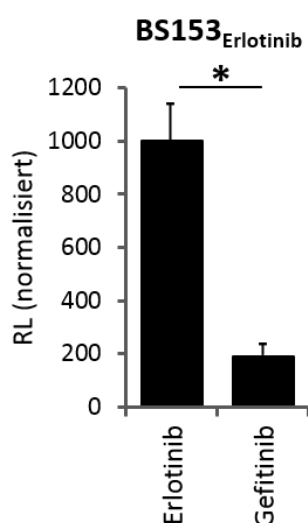


Abbildung 18 Proliferation von permanent mit Erlotinib behandelten BS153-Zellen. Proliferationsassay (CellTiter Glo®) permanent Erlotinib-behandelter BS153-Zellen (10 µg/ml Erlotinib, > 15 Passagen) über einen Zeitraum von 144 h. Chronisch mit Erlotinib-behandelte BS153-Zellen zeigten eine stabile Proliferation und waren sensitiv gegenüber Gefitinib. [$*P < 0.005$, t-test; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung $\pm$ SA; dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten; RL, relative Lumineszenz]

Permanent mit Erlotinib behandelte Zellen zeigten eine stabile Proliferation, mit einer Verdopplungsrate von 44 Stunden. Zudem führte eine Gefitinib-Behandlung von BS153_{Erlotinib}-Zellen zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation (Abbildung 18).

Da BS153-Zellen auch unter dem permanenten Einfluss von Erlotinib in der Lage waren stabil zu proliferieren und sich somit tolerant gegenüber dem TKI zeigten, werden BS153_{Erlotinib}-Zellen im Folgenden als Erlotinib resistente BS153-Zellen (BS153^{resE}) bezeichnet.

4.3 Charakterisierung des wtEGFR- und EGFRvIII-Status von Erlotinib-resistenten BS153-Zellen (BS153^{resE})

Zur Charakterisierung der aus Abschnitt 4.2 hervorgegangenen Erlotinib-resistenten BS153-Zelllinie (BS153^{resE}), wurde diese zunächst morphologisch mit der parentalen BS153-Zelllinie verglichen. Zudem wurde der EGFR- und EGFRvIII-Status von BS153^{resE}-Zellen auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene untersucht.

4.3.1 Morphologie und RTK-Status von BS153^{resE}-Zellen

Bei einem lichtmikroskopischen Vergleich von parentalen und Erlotinib-resistenten BS153-Zellen konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden. Die Zellen beider Zelllinien waren etwa gleich groß und beide Zellpopulationen setzten sich aus morphologisch heterogenen Zellen zusammen (Abbildung 19).

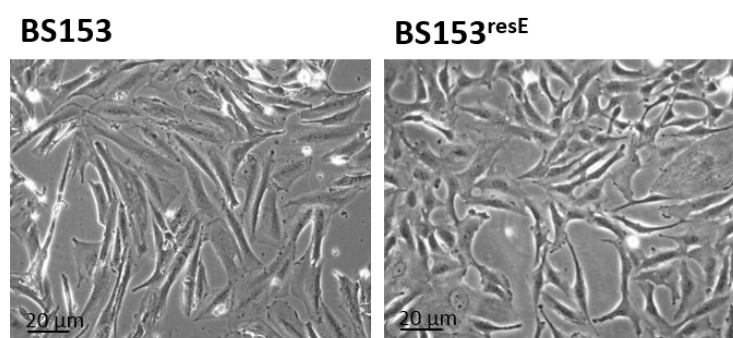
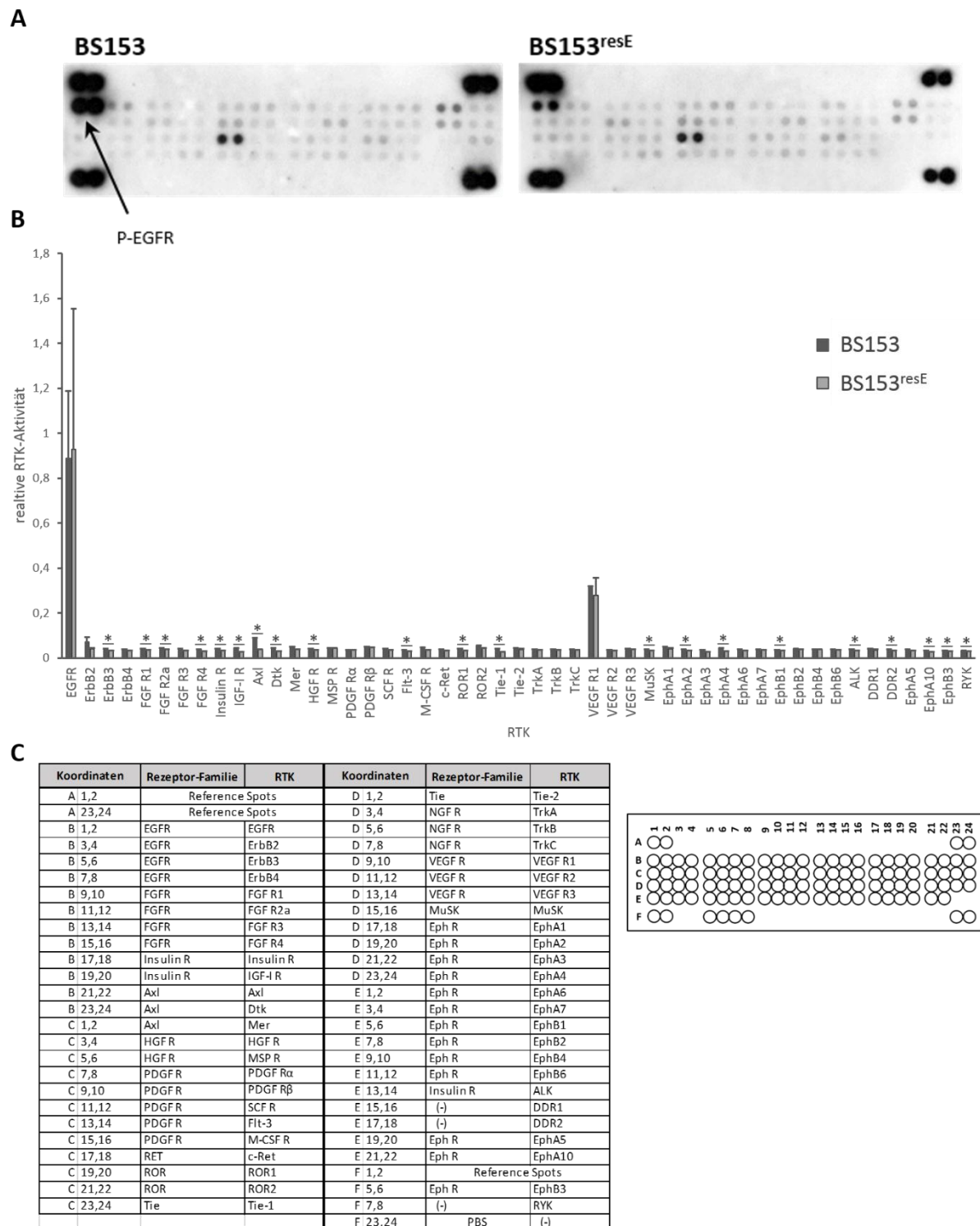


Abbildung 19 Morphologie von parentalen und Erlotinib resistenten BS153-Zellen. Parentale und Erlotinib resistente BS153-Zellen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Morphologie nicht. [Lichtmikroskop, 20fache Vergrößerung]

Um zu untersuchen, ob die permanente Erlotinib-Behandlung von BS153-Zellen zu einer Veränderung der EGFR-Aktivierung oder zu einer kompensatorischen Erhöhung der Aktivität von anderen RTK führte, wurden RTK-Arrays von BS153- und BS153^{resE}-Zellen angefertigt. Mit Hilfe dieser Arrays ist es möglich den Phosphorylierungsstatus von 49 verschiedenen RTK parallel zu

Abbildung 20 RTK-Array von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. (A) RTK-Array von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. (B) Auswertung von (A): Die Signalstärke von EGFR unterscheidet sich in BS153- und BS153^{resE}-Zellen nicht signifikant. In BS153^{resE}-Zellen konnte verglichen mit BS153-Zellen, keine generelle kompensatorische Hochregulation der RTK-Signalstärke gemessen werden. [Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit, R&D Systems; t-test, * $P < 0.05$, $\pm$ SA;]. (C) Positionen (Koordinaten) der einzelnen RTK auf dem Array.

überprüfen.



Der Vergleich der RTK-Arrays von parentalten und Erlotinib resistenten Zellen zeigte, dass die Signalstärke von keinem RTK in BS153^{resE}-Zellen signifikant höher war als in BS153-Zellen. Vielmehr konnte bei einigen RTK (zum Beispiel: FGFR1, HGFR u.a) eine Abnahme der Signalstärke

in BS153^{resE}-Zellen gemessen werden. Ein Vergleich der ErbB-Familie zeigte zudem, dass lediglich die Signalstärke von ErbB3 in BS153^{resE}-Zellen geringer war als in BS153-Zellen, wohingegen sich die Signale von ErbB1, ErbB2 und ErbB4 in den beiden Zelllinien nicht signifikant unterschieden (Abbildung 20). Somit führte die permanente Erlotinib Behandlung von BS153-Zellen zu keiner kompensatorischen Hochregulation der Aktivität von anderen RTK.

4.3.2 Aktivität von Proteinen der HER-Familie in BS153^{resE}-Zellen

Aufgrund der zentralen Stellung des EGFR für BS153- und BS153^{resE}-Zellen (Abschnitt 4.3.1), sollte im nächsten Schritt die Gesamtexpressionsmenge des wtEGFR im Western Blot untersucht werden. Um die Ergebnisse des RTK-Arrays zu überprüfen und eine kompensatorische Aktivierung von anderen Mitgliedern der HER-Familie definitiv auszuschließen, wurden zusätzlich die Proteinexpression und der Phosphorylierungsstatus von allen Mitgliedern der HER-Familie (EGFR/HER1, HER2, HER3 und HER4) analysiert.

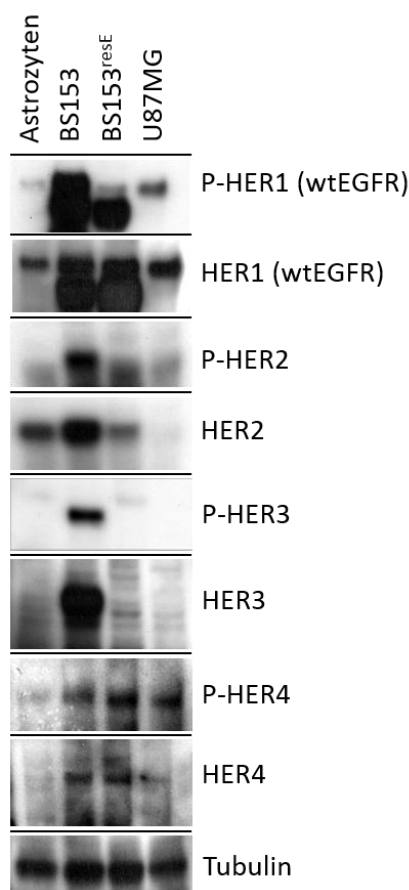


Abbildung 21 Expression und Aktivität von Mitgliedern der HER-Familie. Western Blot von BS153- und BS153^{resE}-Zellen (Kontrollen: Astrozyten und U87MG; Ladekontrolle: Tubulin). Sowohl die Gesamtproteinmenge, als auch die Aktivität von HER1, HER2 und HER3 war in BS153^{resE}-Zellen geringer als in BS153-Zellen. Die Phosphorylierung von HER4 war hingegen leicht erhöht.

Der Vergleich der Proteinexpression von parentalen und Erlotinib-resistenten BS153-Zellen verdeutlichte, dass sowohl die Gesamtproteinmenge, als auch die Menge an phosphoryliertem HER1- (wtEGFR), HER2- und HER3-Protein in BS153^{resE}-Zellen geringer war als in BS153-Zellen. Ein anderes Bild zeigte sich bei einem Vergleich des HER4-Status. Während die

Gesamtproteinmenge in beiden Zelllinien nahezu identisch war, konnte eine leichte Erhöhung der HER4-Phosphorylierung in BS153^{resE}-Zellen detektiert werden. Demnach zeigten BS153^{resE}-Zellen verglichen mit der parentalen Zelllinie insgesamt keine konsistente Herauf- oder Herunterregulation der Expression und der Aktivität von Proteinen der HER-Familie.

4.3.3 EGFR-Status von BS153^{resE}-Zellen auf DNA-Ebene

Im Abschnitt 4.3.2 konnte gezeigt werden, dass die permanente Erlotinib-Behandlung von BS153-Zellen zu einer Reduktion der wtEGFR-Phosphorylierung führte. Um zu untersuchen, ob die Veränderung des EGFR-Proteinstatus auf einem Verlust der EGFR-Amplifikation beruht, sollte in diesem Versuch die Amplifikation des EGFR-Gens in BS153- und BS153^{resE}-Zellen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) und qPCR-Analysen ermittelt und miteinander verglichen werden.

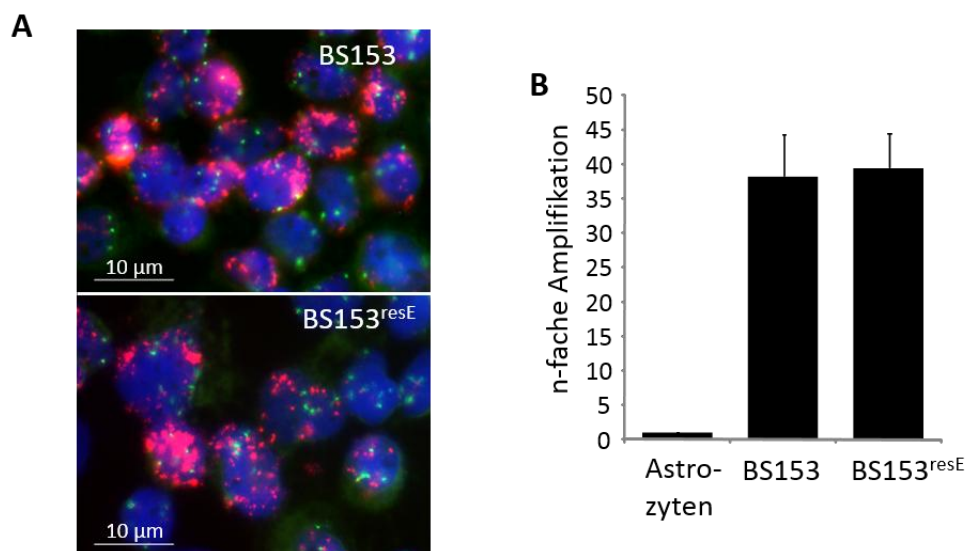


Abbildung 22 EGFR-Amplifikation von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. (A) FISH-Analyse: Sowohl BS153-, als auch BS153^{resE}-Zellen zeigten eine deutliche EGFR-Amplifikation, wobei sich die Signalquantität beider Zelllinien nicht unterschied. (rot, EGFR; grün, Cen7; blau, DAPI). (B) Quantitative PCR-Analyse des EGFR-Gens: Die quantitative Auswertung der PCR zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. (Kontrolle Astrozyten, 2fache EGFR-Amplifikation)

Sowohl BS153- als auch BS153^{resE}-Zellen zeigten eine deutliche EGFR-Amplifikation. Bei der quantitativen Auswertung der FISH-Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Signalquantität zwischen den beiden Zelllinien gemessen werden (BS153: $45,9 \pm 8,5$ % versus BS153^{resE}: $41,4 \pm 6,5$ % Signale pro Zelle). Sowohl BS153- als auch BS153^{resE}-Zellen wiesen eine Chromosom 7-Polysomie und vereinzelte EGFR-Signale außerhalb des Nukleus auf, welche charakteristisch für extrachromosomale Double-Minutes während der Interphase sind (Abbildung 22 A). Die Ergebnisse der FISH-Analyse konnten durch die quantitative PCR-Analyse des EGFR-Gens von BS153- und BS153^{resE}-Zellen bestätigt werden.

(EGFR-Amplifikation von BS153^{resE}-Zellen: 39,5fache $\pm$ 5,0 versus BS153^{resE}-Zellen: 39,5fache $\pm$ 5,0) (Abbildung 22 B). Somit weisen sowohl BS153- als auch BS153^{resE}-Zellen eine etwa 40fache Amplifikation des EGFR-Gens auf.

4.3.4 WtEGFR- und EGFRvIII-Status von BS153^{resE}-Zellen auf mRNA-Ebene

Da die im Vergleich zu BS153-Zellen verminderte EGFR-Aktivität von BS153^{resE}-Zellen (Abschnitt 4.3.2) nicht nur auf einer Veränderung der Genamplifikation, sondern auch auf einer erhöhten Transkriptionsrate beruhen kann, wurde im folgenden Versuch der EGFR-mRNA-Status von BS153- und BS153^{resE}-Zellen miteinander verglichen. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte sowohl mittels konventioneller, semiquantitativer PCR, als auch mit Hilfe quantitativer PCR. Neben dem mRNA-Status des wtEGFR, wurde zudem auch der mRNA-Status von EGFRvIII untersucht.

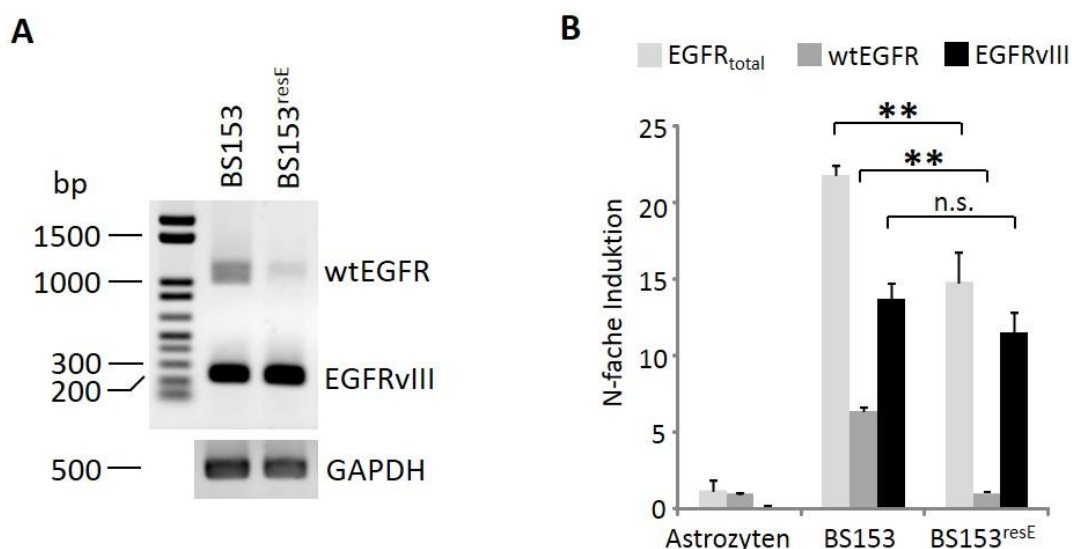


Abbildung 23 EGFR-Status von BS153^{resE}-Zellen auf mRNA-Ebene. (A) Semiquantitative PCR-Analyse der cDNA und (B) quantitative PCR-Analyse der mRNA: verglichen mit BS153-Zellen konnte eine Abnahme der wtEGFR-mRNA in BS153^{resE}-Zellen gemessen werden. Die Menge der EGFRvIII-mRNA war unverändert. [(A) GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; (B) **P < 0.005, t-test, n.s. = nicht signifikant; Mittelwerte einer vierfach-Bestimmung $\pm$ SA]

Der Vergleich der cDNA-Menge von BS153- und BS153^{resE}-Zellen mittels semiquantitativer PCR-Analyse zeigte, dass die wtEGFR-Menge in BS153^{resE}-Zellen geringer war als in der parentalen Zelllinie, wohingegen sich die EGFRvIII-cDNA-Mengen nicht unterschieden (Abbildung 23 A). Die direkte quantitative Messung der mRNA-Menge mittels real-time PCR-Analyse, bestätigte diese Ergebnisse. Während sich die EGFRvIII-mRNA von BS153- und BS153^{resE}-Zellen quantitativ nicht signifikant voneinander unterschied, waren die wtEGFR-mRNA- und die gesamte EGFR-mRNA-Menge in den resistenten Zellen signifikant geringer als in den parentalen Zellen.

(Abbildung 23 B). Somit unterschied sich der EGFRvIII-Status von BS153- und BS153^{resE}-Zellen auf mRNA-Ebene nicht, wohingegen die wtEGFR-mRNA Menge in BS153^{resE}-Zellen deutlich geringer war als in parentalen Zellen.

4.3.5 WtEGFR- und EGFRvIII-Status von BS153^{resE}-Zellen auf Protein-Ebene

Die Expression des wtEGFR und des EGFRvIII auf Proteinebene, wurde mittels Durchflusszytometrie und Western Blot untersucht. Zudem wurden MACS- (Magnetic Activated Cell Sorting) Experimente durchgeführt um zu überprüfen, ob es sich bei den EGFRvIII-exprimierenden Zellen um Subpopulationen der Gesamtzellpopulation handelte, oder ob EGFRvIII ubiquitär von allen Zellen exprimiert wurde. Ferner sollte mit diesen Experimenten festgestellt werden, ob in BS153-Zellen nur EGFR-Homodimere oder EGFR-Heterodimere vorliegen oder ob sowohl Homo- und Heterodimere nachgewiesen werden können. Sollte es möglich sein, wtEGFR-EGFRvIII-Heterodimere nachzuweisen, wäre dies ein Indiz für eine mögliche, Liganden-unabhängige Kreuzaktivierung von wtEGFR durch EGFRvIII.

Die durchflusszytometrische Analyse der wtEGFR- und EGFRvIII-Expression zeigte, dass lediglich $8,3 \pm 1,3$ % aller BS153-Zellen EGFRvIII exprimierten (Abbildung 24 A), wohingegen der Anteil EGFRvIII-positiver BS153^{resE}-Zellen mit $52,9 \pm 1,9$ % in BS153^{resE}-Zellen 6,6mal höher war (Abbildung 24 B). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei einem Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI), welche ein Maß für die Gesamtsignalstärke und somit für die Gesamtmenge an wtEGFR und EGFRvIII pro Zelle ist. Während für EGFRvIII in BS153-Zellen lediglich eine MFI von $19,8 \pm 1,7$ gemessen werden konnte (Abbildung 24 A), war diese in BS153^{resE}-Zellen mit $72,2 \pm 3,8$ deutlich höher, was einer 3,7fachen Hochregulation der EGFRvIII-Rezeptoranzahl pro Zelle entspricht (Abbildung 24 B).

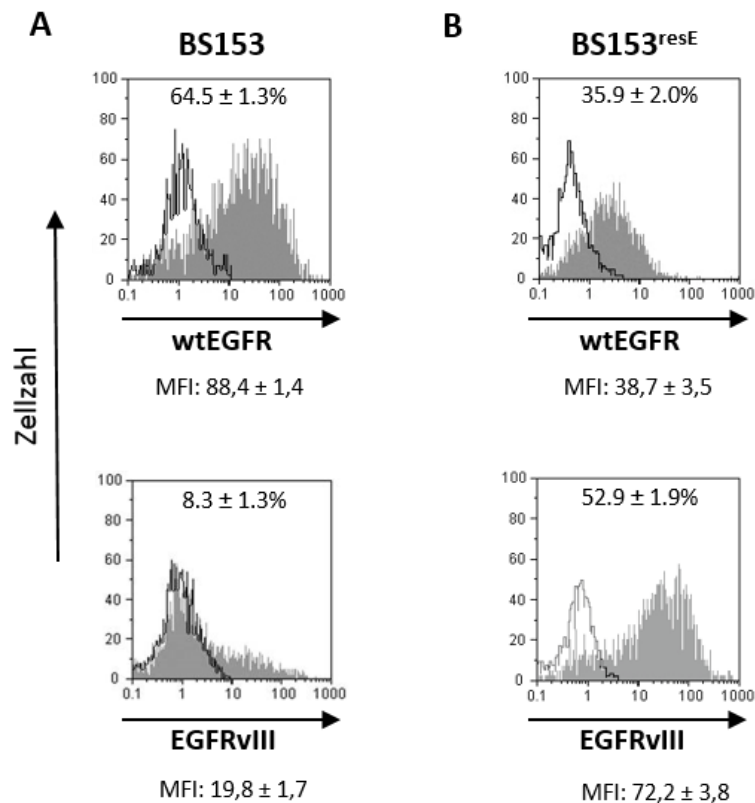


Abbildung 24 Vergleich der wtEGFR- und EGFRvIII-Expression in BS153^{resE}-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Der Anteil EGFRvIII-positiver Zellen war in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu parentalen BS153-Zellen stark hochreguliert, wohingegen BS153^{resE}-Zellen deutlich weniger wtEGFR exprimierten (MFI= mean fluorescence intensity).

Ebenso wie bei der durchflusszytometrischen Analyse der wtEGFR- und EGFRvIII-Expression von BS153- und BS153^{resE}-Zellen, konnte auch mittels Western Blot-Analysen ein deutlicher Anstieg der EGFRvIII-Menge in BS153^{resE}-Zellen beobachtet werden. Zudem exprimierten beide Zelllinien mehr EGFRvIII als wtEGFR, wobei sich die Konzentration des wtEGFR in beiden Zelllinien nicht wesentlich unterschied (Abbildung 25).

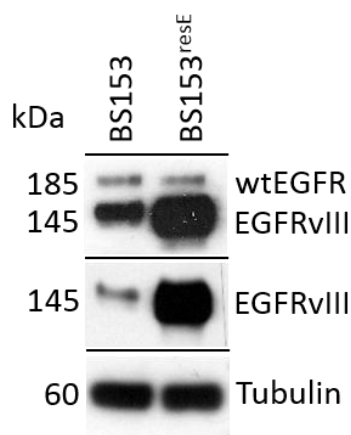
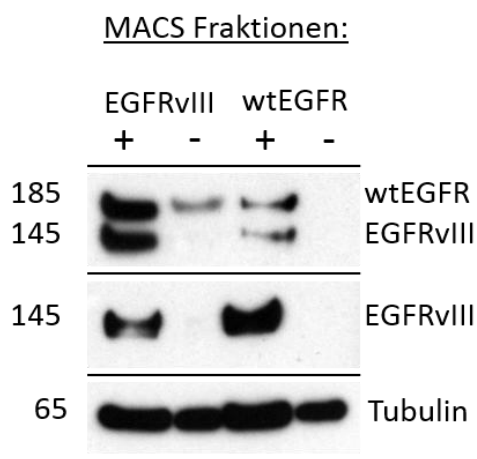


Abbildung 25 Vergleich der wtEGFR- und EGFRvIII-Protein-Expression in BS153- und BS153^{resE}-Zellen. (A) Western Blot von BS153- und BS153^{resE}-Zelle: BS153^{resE}-Zellen exprimierten im Vergleich zu BS153-Zellen deutlich mehr EGFRvIII, während die Expression des wtEGFR unverändert war.

In MACS-Experimenten mit BS153-Zellen (Abbildung 26) konnten in der EGFRvIII-Bead-Fraktion sowohl wtEGFR als auch EGFRvIII nachgewiesen werden. In der Proteinfraction, welche nicht an die Beads gebunden hatte, konnte hingegen lediglich wtEGFR detektiert werden. In der wtEGFR-Bead-Fraktion konnten ebenfalls beide Rezeptorvarianten nachgewiesen werden. In der Zellpopulation, welche nicht an die Antikörper-gekoppelten Beads gebunden hat, konnten hingegen weder der wtEGFR, noch EGFRvIII detektiert werden. Zusammenfassend lassen diese Versuche auf eine Heterodimerisierung von wtEGFR und EGFRvIII schließen.



IB

Abbildung 26 Vergleich der wtEGFR- und EGFRvIII-exprimierenden Zellpopulation in BS153-Zellen. Western Blot einer MACS-Analyse mit EGFRvIII- oder wtEGFR-spezifischen Antikörpern. Sowohl mit Hilfe von wtEGFR- als auch mittels EGFRvIII-gekoppelter Beads konnte eine Heterodimerisierung der beiden Rezeptoren nachgewiesen werden. [+ Bead-Fraktion, - Durchflussfraktion]

4.4 Tumorigenitätskapazität von BS153^{resE}-Zellen

Neben der Proliferation und Migration ist die Tumorigenitätskapazität von GBM-Zellen ein zentrales Merkmal eines repräsentativen GBM-Modellsystems. Um die Tumorigenitätskapazität von BS153^{resE}-Zellen mit der von parentalen BS153-Zellen zu vergleichen, wurden sowohl *in vitro* Kolonie-Formations-Assays (4.4.1) als auch *in vivo* Maus-Xenograft-Versuche (4.4.2) durchgeführt.

4.4.1 Tumorigenitätskapazität von BS153^{resE}-Zellen *in vitro*

Das adhäsionsunabhängige Wachstum von 153- und BS153^{resE}-Zellen, welches die *in vitro*-Tumorigenitätskapazität von Zellen widerspiegelt, wurde mit Hilfe von Kolonie-Formations-Assays ermittelt.

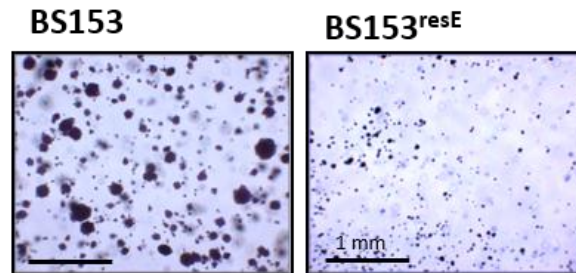


Abbildung 27 *In vitro*-Tumorinitiierungskapazität von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. Kolonie-Formations-Assay mit BS153- und BS153^{resE}-Zellen (Inkubationszeit 7 d). Verglichen mit BS153-Zellen, zeigten 153^{resE}-Zellen eine deutlich verzögerte Koloniebildung.

Parentale BS153-Zellen bildeten bereits nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden erste Kolonien, wohingegen BS153^{resE}-Zellen 7 Tage benötigten, um Kolonien auszubilden. Die durchschnittliche Kolonienanzahl nach sieben Tagen betrug für unbehandelte BS153-Zellen pro 1mm² sieben, wohingegen BS153^{resE}-Zellen durchschnittlich lediglich eine Kolonie ausbildeten. Der Durchmesser von BS153-Kolonien betrug durchschnittliche 98,2 µm und von BS153^{resE}-Kolonien 24,3 µm. Somit zeigten BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu parentalen BS153-Zellen eine verminderte *in vitro*-Tumorinitiierungskapazität.

4.4.2 Tumorinitiierungskapazität von und BS153^{resE}-Zellen *in vivo*

Zur weiteren Validierung der Tumorinitiierungskapazität von BS153^{resE}-Zellen wurden neben den unter 4.4.1 beschriebenen *in vitro*-Versuchen, auch *in vivo*-Versuche durchgeführt. Hierzu wurden NMRI/Fox1^{nu} Nacktmäusen jeweils 150.000 BS153- (n=7) oder BS153^{resE}-Zellen (n=5) intrakraniell in das Caudatum/Putamen (Striatum) implantiert (Abbildung 28 A). Bei einer Gewichtsabnahme von mehr als 10 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht sowie beim Auftreten neurologischer Symptome, wurde die Tumore entnommen und histologisch ausgewertet (Abbildung 29).

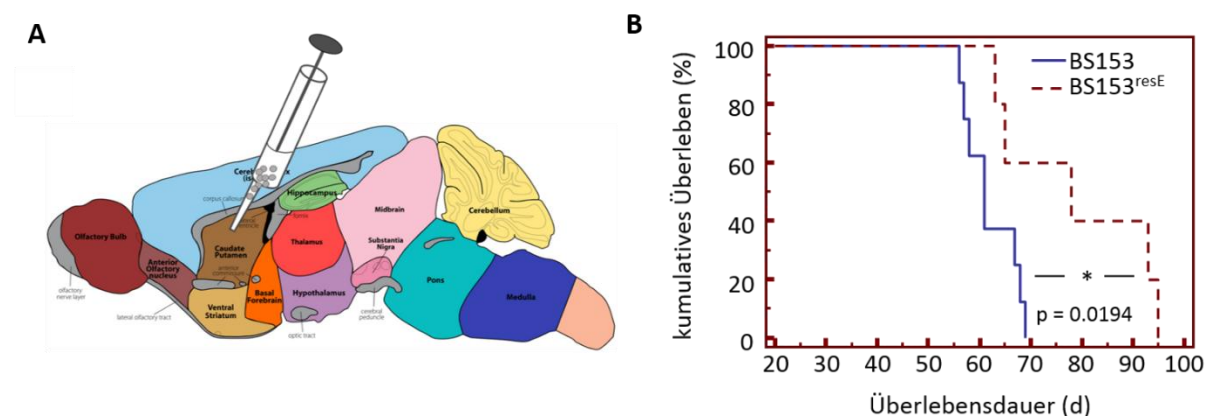


Abbildung 28 *In vivo*-Tumorinitiierungskapazität von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. (A) schematische Darstellung eines Maushirns (verändert nach http://www.gensat.org/atlas/ADULT_ATLAS_07.jpg). (C) Kaplan-Meier Kurve von NMRI/Fox1^{nu} Nacktmäusen mit intrakraniell implantierten BS153- (n=7) oder BS153^{resE}-Zellen (n=5). Mäuse mit BS153-Xenograft-Tumoren

wurden signifikant früher symptomatisch als Mäuse mit BS153^{resE}-Xenograft-Tumoren (Median: 61 d versus 78 d). [*p = 0.0194; long-rank test]

Mäuse mit BS153-Xenograft-Tumoren entwickelten im Median bereits nach 61 Tagen Symptome, wohingegen Mäuse mit BS153^{resE}-Xenograft-Tumoren erst 17 Tage später (Durchschnitt: 78 Tagen) symptomatisch wurden (Abbildung 28 B).

Die im Anschluss durchgeführte histologische- und immunhistochemische-Untersuchung der Tumore zeigte, dass BS153- und BS153^{resE}-Xenograft-Tumore, sowohl solide als auch invasive Areale (H&E-Färbung) mit hoch proliferativen Zellen (MIB-1 Antikörper gegen Antigen Ki-67 (Ki-67)) aufwiesen (Abbildung 29). Ebenso wie für BS153- und BS153^{resE}-Zellen beobachtet, wiesen die Zellen von BS153^{resE}-Xenograft-Tumoren eine starke und von BS153-Xenograft-Tumoren eine mäßige EGFRvIII-Expression auf. Ferner zeigten die Tumore beider Zelllinien eine starke EGFR-Expression (EGFR_{total} = wtEGFR und EGFRvIII) sowie eine deutliche EGFR-Amplifikation (FISH-Analyse). Somit spiegelten BS153- und BS153^{resE}-Tumore alle phänotypischen Merkmale der jeweiligen Zelllinie wieder (siehe auch Abschnitt 4.3).

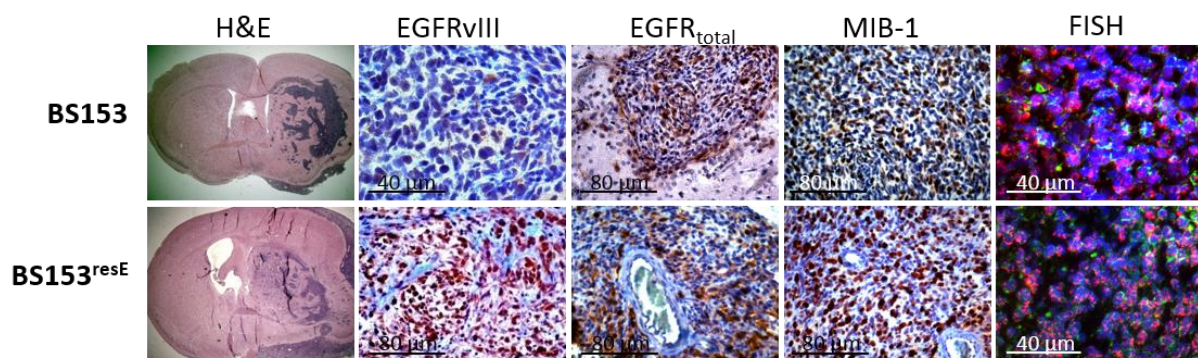


Abbildung 29 **Histologische- und immunhistochemische-Analyse von BS153- und BS153^{resE}-Xenograft-Tumoren.** Paraffinschnitte von BS153- und BS153^{resE}-Xenograft-Tumoren zeigten solide und invasive Areale (H&E Färbung), wohingegen lediglich BS153^{resE}-Tumore eine starke EGFRvIII-Überexpression aufwiesen. Beide Tumor wiesen zudem eine deutliche EGFR-Expression auf (EGFR_{total} = wtEGFR und EGFRvIII), beinhalteten hoch proliferative Zellen (MIB-1 AK gegen Ki-67) und zeigten eine deutliche EGFR-Amplifikation (FISH).

4.5 Bedeutung des EGFR-Status für die Bildung von GBM und für die Ausbildung von BS153^{resE}-Zellen

Ein besonders prägnantes Merkmal von GBM ist ein äußerst hohes Maß intra- und intertumoraler Heterogenität, welche sich in der heterogenen Amplifikation des EGFR-Gens oder der EGFRvIII-Expression widerspiegelt. Welche Rolle der heterogene wtEGFR/EGFRvIII-Status bei der Tumorinitiierung spielt, konnte jedoch bisher nicht vollständig geklärt werden.

Da BS153-Zellen nicht nur morphologisch sehr unterschiedlich sind, sondern sich auch in hinsichtlich ihres wtEGFR/EGFRvIII-Status signifikant unterscheiden, eignen sie sich hervorragend

um die intratumorale Heterogenität von GBM zu untersuchen. In den folgenden Abschnitten sollte geklärt werden, ob der unterschiedliche wtEGFR/EGFRvIII-Status von BS153- und BS153^{resE}-Zellen (Abschnitt 4.3.3-4.3.5) auf einer Reduktion der klonalen Vielfalt beruht oder aber auf eine Adaptation des Expressionsprofils parentaler BS153-Zellen zurückzuführen ist (Abschnitt 4.5.2). Zudem sollte die Bedeutung des wtEGFR/EGFRvIII-Status hinsichtlich der GBM-Initiierung *in vivo* untersucht werden (Abschnitt 4.5.3).

Eine elegante Möglichkeit, die Heterogenität bzw. die Klonalität von Zelllinien (*in vitro*) und Tumoren (*in vivo*) zu untersuchen, bietet die von Weber et al. entwickelte RGB- (rot, grün, blau, multiple Farbmischung) Markierung von Zellen (327). Angelehnt an das Prinzip der additiven Farbmischung (Abbildung 30 A) werden Zellen simultan mit drei verschiedenen lentiviralen Vektoren (LetiLox 3,7, lentivirale Vektoren der dritten Generation), welche für die Fluoreszenzproteine mCherry (LeGO-C2, rot) (327), Venus (LeGO-V2, gelb-grün) (329) oder Cerulean (LeGO-Cer2, blau) (328) kodieren, transduziert (Abbildung 30 B). In Abhängigkeit von der individuellen Transduktionsrate und Faktoren wie der genomischen Insertionsstelle der Vektoren, welche maßgeblich die Expressionsrate der einzelnen Vektoren beeinflusst, können tausende von Zellen individuell fluoreszenzmarkiert werden (siehe auch Abschnitt 3.1.9). Auf diese Weise ist es möglich das Schicksal einzelner Zellen *in vitro* und *in vivo* zu verfolgen.

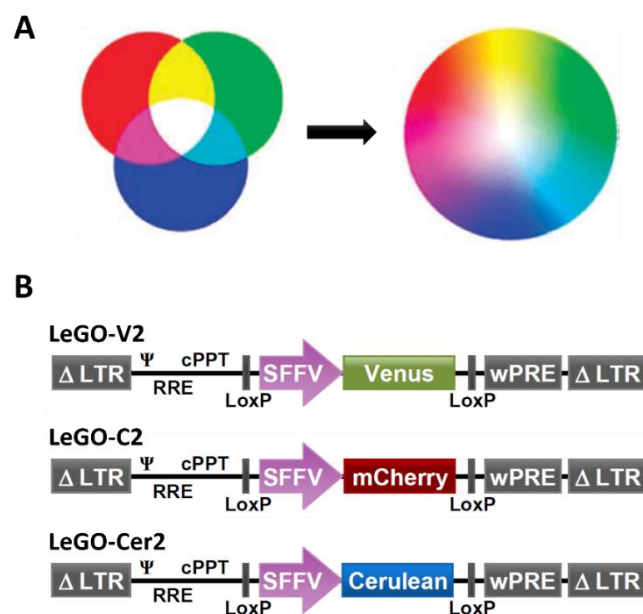


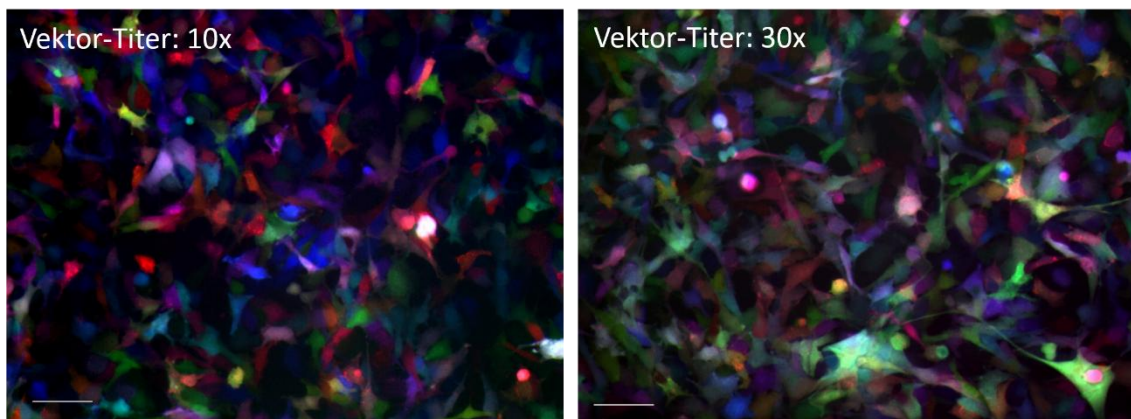
Abbildung 30 **RGB-Markierung**. (A) **Additives Farbmischungsprinzip**: Durch die Mischung der drei Grundfarben rot, grün und blau, können alle Spektralfarben gebildet werden (multiple Farbmischung). (B) RGB-Vektoren: Schematische Darstellung der RGB-Vektoren LeGO-V2 (kodiert für Venus, gelb-grün), LeGO-C2 (kodiert für mCherry, rot) und LeGO-Cer2 (kodiert für Cerulean, blau). Bei allen Vektoren handelt es sich um lentivirale LentiLox 3.7 Vektoren. [Δ LTR = long terminal repeat, SFFV (Promotor) = spleen focus-forming virus, wPRE = woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element] (verändert nach Weber et al. (327))

4.5.1 RGB-Markierung von GBM-Zellen

Um zu untersuchen ob BS153^{resE}-Zellen durch klonale Selektion, oder aufgrund einer veränderten Expressionsprofils aus der parentalen BS153-Zellen hervorgegangen sind, wurden zunächst parentale BS153-Zellen RGB-markiert (Abbildung 31 A). Da zudem die Bedeutung des wtEGFR/EGFRvIII-Status für die *in vivo*-Tumorinitiierung von GBM untersucht werden sollte, wurden neben BS153-Zellen auch U87MG-Zellen, welche weder eine EGFR-Amplifikation aufweisen, noch EGFRvIII exprimieren, ebenfalls RGB-markiert (Abbildung 31 B). Die Anreicherung erfolgreich transduzierte Zellen erfolgte im Anschluss an die Transduktion durch eine Behandlung mit Puromycin.

A

BS153-RGB



B

U87MG-RGB

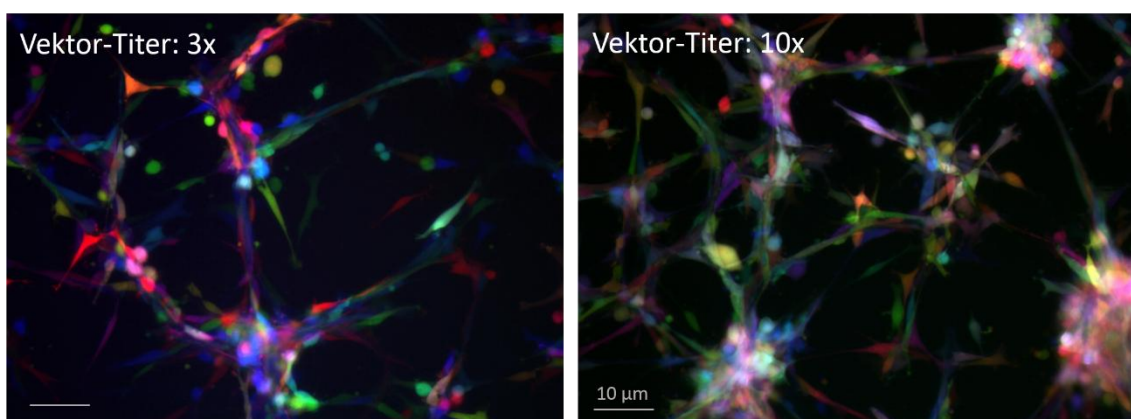


Abbildung 31 RGB Markierung von BS153- und U87MG-Zellen. BS153- und U87MG-Zellen wurden mit unterschiedlichen RGB-Vektor-Titern transduziert. Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von (A) BS153-RGB-Zellen, welche mit einem 10x und 30x Vektortiter transduziert wurden, sowie von (B) U87MG-RGB-Zellen welche mit einem 3x und einem 10x Vektor-Titer transduziert wurden. Für BS153-Zellen erwies sich ein 10x und für U87MG-Zellen ein 3x Vektor-Titer als optimal. [1x Titer entspricht einem MOI von 0,7; fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nachdem die Zellen 4 Tage lang mit Puromycin behandelt wurden. Overlay]

Sowohl BS153- als auch U87MG-Zellen wurden mit unterschiedlichen RGB-Vektor-Titern transduziert, wobei ein 1x Titer einem MOI von 0,7 entsprach. Für die RGB-Markierung von BS153-Zellen (Abbildung 31 A) erwies sich ein 10x Vektor-Titer als optimal was sich in einer farbintensiven Fluoreszenzmarkierung der Zellen widerspiegelte. Die Transduktion von BS153-Zellen mit einem 30x Titer, führte hingegen zu einem überdurchschnittlich hohen Anteil mehrfach transduzierter Zellen, was zu der vermehrten Bildung von Pastelltönen führte. Ein anderes Bild zeigte sich bei RGB-markierten U87MG-Zellen (Abbildung 31 B). Für diese Zellen erwies sich 3x Vektor-Titer als optimal, wohingegen ein 10x Vektor-Titer bereits zu einer besonders hohen Rate mehrfach transduzierter Zellen und der Bildung von Pastelltönen und führte.

Die Untersuchung von BS153-RGB (Titer 10x) (Abbildung 32 A) und U87MG-RGB (Titer 3x) (Abbildung 32 B) Zellen mittels Durchflusszytometrie, zeigte bei beiden Zellpopulationen einen gleich hohen Anteil von Zellen mit LeGO-C2, (mCherry, rot), LeGO-V2 (Venus, gelb-grün) und LeGO-Cer2 (Cerulean, blau) Vektoren. Dies spricht dafür, dass sich die Zellpopulation aus acht verschiedenen, gleich großen Zellsubpopulationen zusammensetzte (jeweils 12,5 % der Gesamtpopulation → Gruppe 1: nicht transfizierten Zellen, Gruppe 2-4: Zellen mit einer oder mehrfachen Kopien von einem der drei RGB-Vektoren, Gruppe 5-7: Zellen mit zwei verschiedenen RGB-Vektoren, Gruppe 8: Zellen mit allen drei RGB-Vektoren, siehe auch Abschnitt 3.1.9)

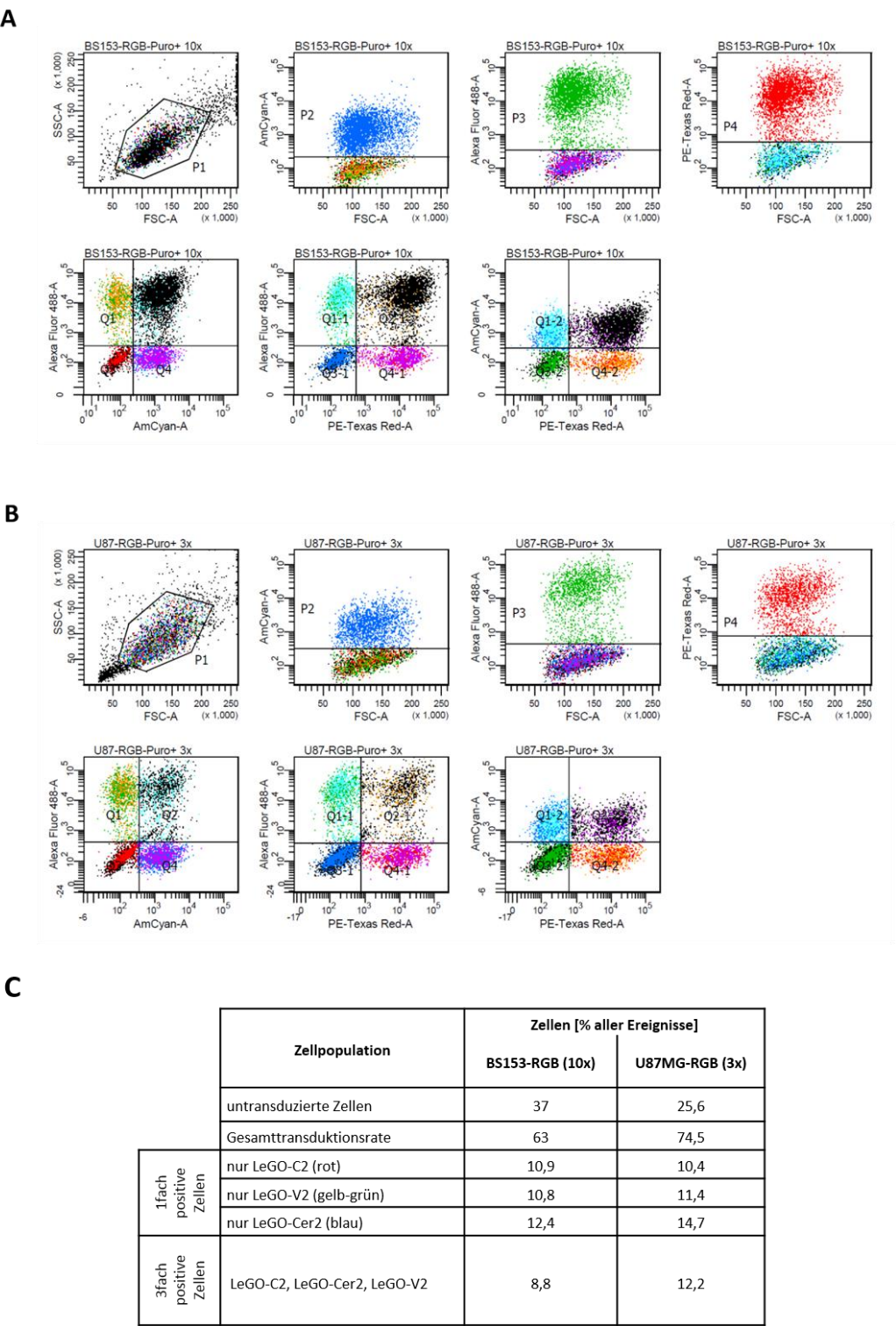
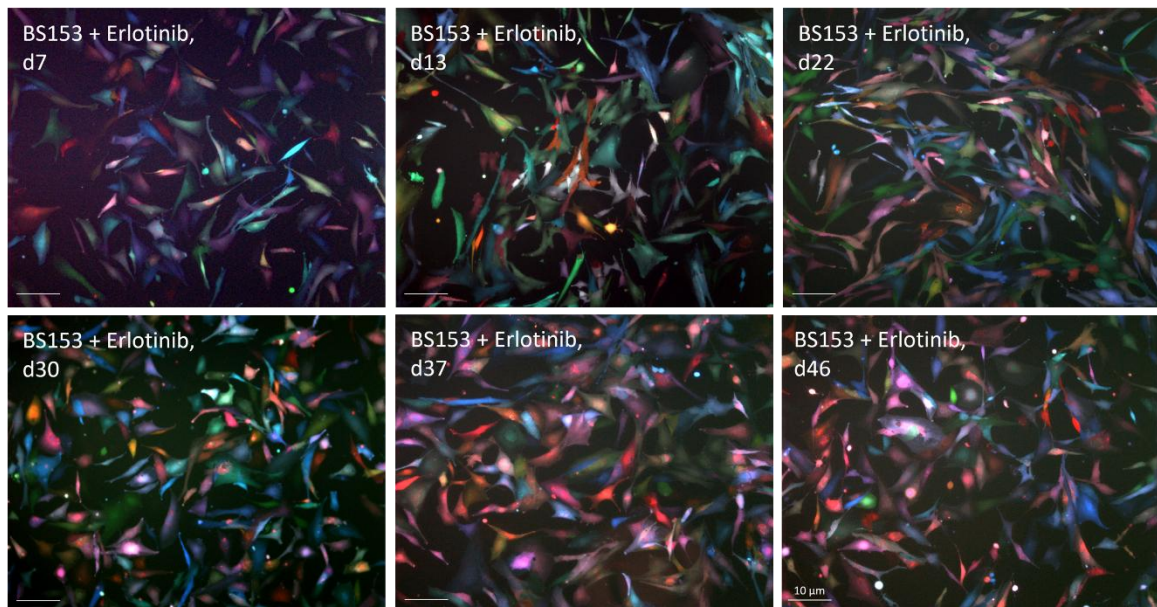


Abbildung 32 **Durchflusszytometrische-Analyse von BS153-RGB- und U87MG-RGB-Zellen.** (A) (B) FACS-Diagramme der fluoreszenzmikroskopisch untersuchten (A) BS153-RGB- (Titer 10x) und (B) U87MG-RGB-Zellen (Titer 3x) (Abbildung 31), sowie die statistische Auswertung der Durchflusszytometrischen-Analyse (C). Beide Ziellinien zeigten einen etwa gleich hohen Anteil von Zellen mit LeGO-C2, (mCherry, rot), LeGO-V2 (Venus, gelb-grün) und LeGO-Cer2 (Cerulean, blau) Vektoren RGB-Vektoren.

4.5.2 Mechanismus der Erlotinibresistenz-Ausbildung

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass BS153^{resE}-Zellen verglichen mit parental BS153-Zellen eine Hochregulation der EGFRvIII- und eine Herunterregulation der wtEGFR-Expression aufweisen (Abschnitten 4.1-4.4). Um zu klären ob BS153^{resE}-Zellen aufgrund einer Veränderung des Expressionsprofils, oder aber durch die Selektion einzelner a priori resistenter Zellen aus der parental BS153-Zelllinie hervorgegangen sind, wurden BS153-Zellen RGB-markiert (Abschnitt 4.5.1) und über einen Zeitraum von 46 Tagen permanent mit Erlotinib (10 µg/ml) behandelt. Eventuelle Veränderungen im Farbspektrum wurden fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert (Abbildung 33 A). Zudem wurde das Farbspektrum der Zellen nach 50 Tagen durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 33 B). Die Ergebnisse wurden

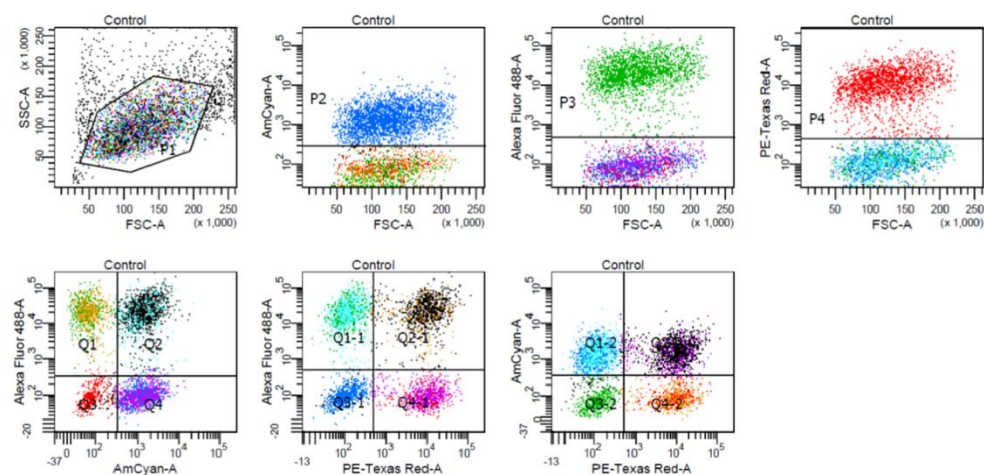
A



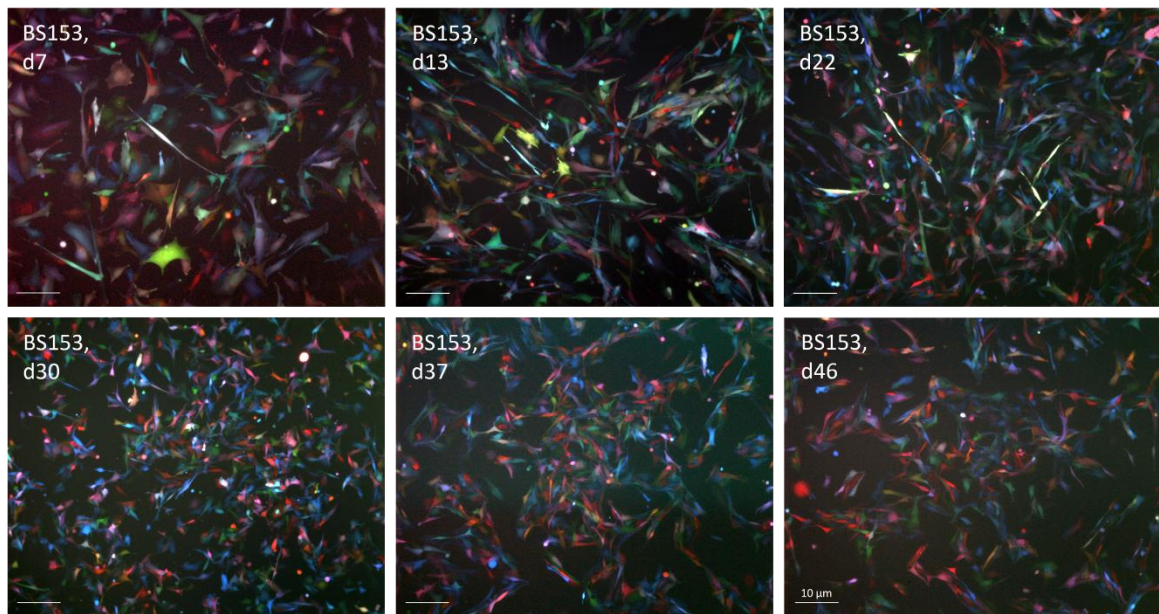
mit unbehandelten RGB-markierten BS153-Zellen verglichen (Abbildung 33 C, D).

B

BS153 Zellen + Erlotinib (10µg/ml), d50



C



D

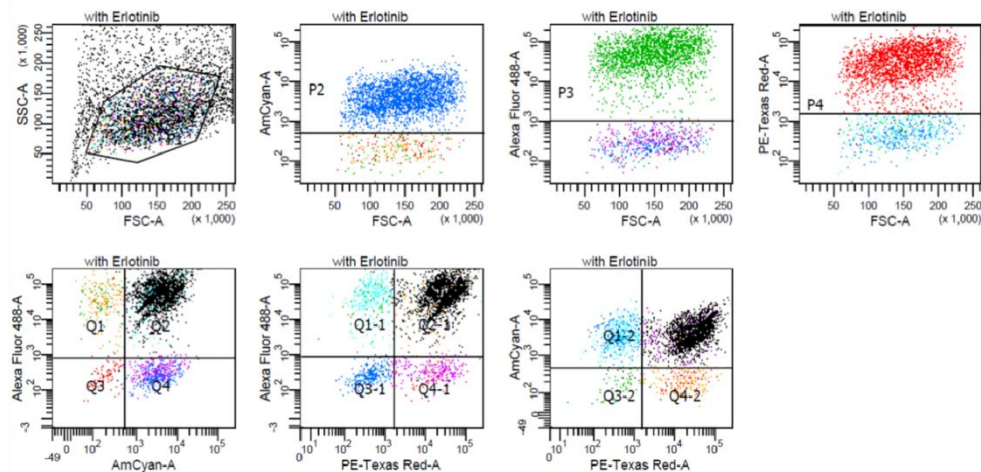
BS153 Zellen, d50 (Kontrolle)

Abbildung 33 **Permanente Behandlung von BS153-RGB-Zellen mit Erlotinib.** (A), (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme und (B), (D) FACS-Diagramme von BS153-RGB-Zellen welche teilweise (A), (B) mit Erlotinib behandelt wurden (10 µg/ml). [Beobachtungszeitraum: 50 d]

Mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von permanent Erlotinib-behandelten, RGB-markierten BS153-Zellen (46 Tage, 10 µg/ml Erlotinib), konnten keine Veränderung in der farblichen Zusammensetzung der Zellpopulation beobachtet werden. Zudem bildeten sich zu keiner Phase Areale mit Zellen einer Farbe aus (Abbildung 33 A). Ein Vergleich unbehandelter und Erlotinib-behandelter BS153-RGB-Zellen zeigte hinsichtlich der Farbvielfalt keine Unterschiede zwischen den Zellpopulationen. Gleiches gilt für die durchflusszytometrische Analyse von Erlotinib-behandelten (Abbildung 33 B) und unbehandelten BS153-RGB-Zellen (Abbildung 33 D) 50 Tage nach dem Beginn der Erlotinibbehandlung. Auch mit dieser

Untersuchungsmethode konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Farbverteilung zwischen den beiden Zellpopulationen aufgezeigt werden.

4.5.3 BS153-RGB- und U87MG-RGB-Xenograft-Maus-Modelle

Um die Bedeutung des wtEGFR/EGFRvIII-Status für die GBM-Initiierung zu untersuchen, wurde die *in vivo*-Tumorinitiierungskapazität von RGB-markierten BS153- und U87MG-Zellen (Abschnitt 4.5.1) mit Hilfe von Xenograft-Maus-Versuchen miteinander verglichen. Im Gegensatz zu BS153-Zellen weisen U87MG-Zellen keine EGFR-Amplifikation auf und exprimieren zudem kein EGFRvIII (Abbildung 34 C). Frühere *in vivo*-Versuche zeigten bereits, dass durch U87MG-induzierte Tumore klar umgrenzt sind (Abbildung 34 B), wohingegen BS153-induzierte Tumore das Hirngewebe diffus infiltrieren (Abbildung 34 A, vergleiche auch 4.4.2).

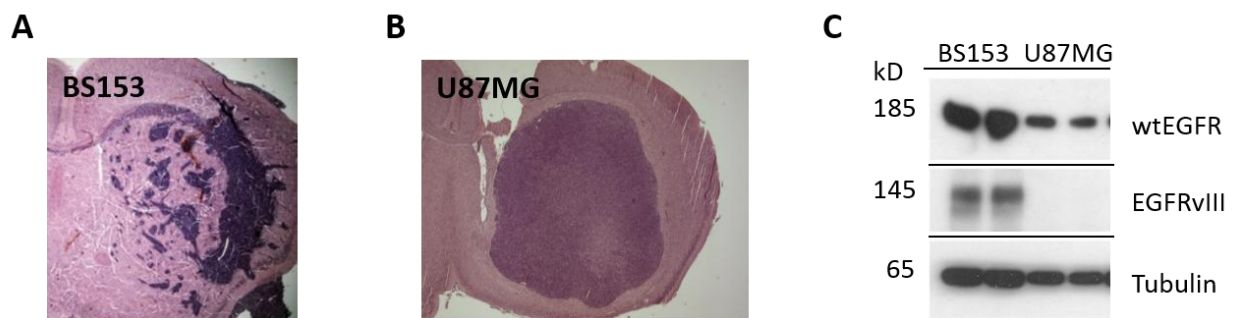


Abbildung 34 **BS153- und U87MG-Zellen in Xenograft-Mausmodellen.** H&E-Färbung von NMRI/Foxn1^{nu} Maus-Gehirnen nach der Implantation von (A) BS153-Zellen oder (B) U87MG-Zellen. (C) Western Blot von BS153- und U87MG-Zellen. U87MG-Zellen exprimieren kein EGFRvIII und deutlich weniger wtEGFR als BS153-Zellen. (Ladekontrolle: Tubulin)

Um die Rolle des EGFR/EGFRvIII während der GMB-Initiierung zu untersuchen, wurden jeweils 150.000 BS153-RGB- oder U87MG-RGB-Zellen (RGB-Markierung siehe Abschnitt 4.5.1, Abbildung 31 A, B) intrakraniell in das Caudatum/Putamen (Striatum) von immundefizienten NMRI/Foxn1^{nu} Mäusen implantiert. Sobald die Mäuse symptomatisch wurden (Gewichtsabnahme > 10 % oder neurologische Symptome), wurden die Tumore entnommen und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Abbildung 35).

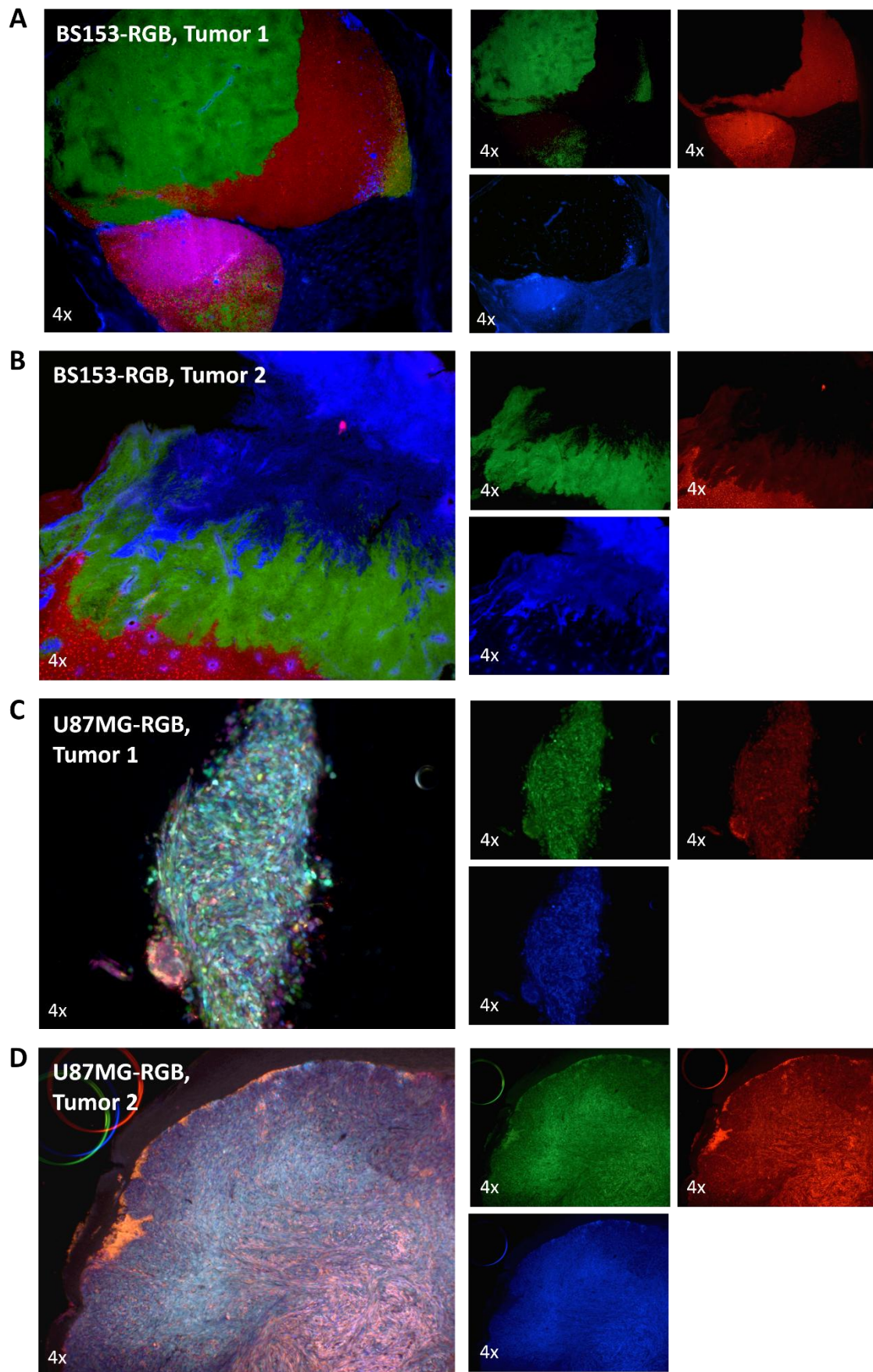


Abbildung 35 **BS153-RGB und U87MG-RGB-Maus-Xenograft-Tumore**. (A)-(D) Es wurden jeweils 150.000 BS153-RGB- oder U87MG-RGB-Zellen in das Caudatum/Putamen (Striatum) von NMRI/Foxn1^{nu} Mäusen implantiert (BS153-RGB, n = 16; U87MG-RGB, n = 6). (A) (B) BS153-RGB-Tumore zeigten große, klar begrenzte Areale die nur aus einer Farbe bestanden und somit vermutlich von einem Klon gebildet wurden. (C) (D) U87MG-RGB-Tumore zeigten keine Aufteilung in voneinander abgegrenzte Farbareale.

BS153-RGB-Zellen bildeten Tumore aus, welche überraschender Weise aus nur wenigen unterschiedlich gefärbten Arealen bestanden (Abbildung 35 A, B), die lediglich kleine unterschied hinsichtlich der Farbintensität aufwiesen. Da die Farben zudem klar voneinander getrennt waren, deutet dies darauf hin, dass jedes Farbareal aus nur einem Klon hervorgegangen ist.

Die durch U87MG-RGB-Zellen induzierten Tumore wiesen derartige, deutlich voneinander abgegrenzte Farbareale hingegen nicht auf (Abbildung 35 C, D). Die Tumore setzten sich in allen Fällen aus vielen unterschiedlichen Farben zusammen, welche stark gemischt und nicht voneinander getrennt waren. Dies spricht dafür, dass durch U87MG-RGB-Zellen induzierte Tumore aus vielen unterschiedlichen Klonen hervorgegangen sind.

4.6 Aktivität von Signalproteinen der EGFR-vermittelten Signaltransduktion in BS153- und BS153^{resE}-Zellen

Da gezeigt werden konnte, dass die Expression von EGFRvIII in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu BS153-Zellen stark hochreguliert ist, wohingegen die Expression des wtEGFR durch die chronische Behandlung mit Erlotinib herunterreguliert wurde, sollten im Folgenden mögliche Auswirkungen des veränderten wtEGFR/EGFRvIII-Status auf die EGFR-abhängige Signaltransduktion in BS153^{resE}-Zellen untersucht werden. Hierzu wurde sowohl die Expression als auch die Aktivität von Schlüsselproteinen des EGFR-vermittelten Ras-Raf-MEK-Erk und des PI3K-Akt-Signalwegs in BS153- und BS153^{resE}-Zellen ermittelt und miteinander verglichen.

4.6.1 Aktivität des PI3K-Akt und des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs in BS153^{resE}-Zellen

Um die Aktivität des PI3K-Akt-Signalwegs in BS153^{resE}-Zellen zu untersuchen, wurde die Expression und Aktivität von Akt und mTor sowie von der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85 und der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 im Western Blot untersucht. Sowohl bei PI3K als auch bei Akt und mTor handelt es sich um Schlüsselproteine des PI3K-Akt-Signalwegs, wobei PI3K sowohl durch den konstitutiv aktiven EGFRvIII als auch durch die Stimulation des wtEGFR aktiviert werden kann. Die aktive PI3K phosphoryliert PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃, an welches Akt bindet. Infolge der PDK1- und mTor-vermittelten Phosphorylierung von Akt, wird wiederum die Signalkaskade des PI3K-Akt-Signalwegs induziert (siehe auch Abschnitt 1.2.2.2, Abbildung 5).

Da wtEGFR und EGFRvIII ferner in der Lage sind den Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg zu aktivieren, wurde mit Erk1/2 zudem auch ein Schlüsselproteinen des zweiten Hauptsignalwegs der wtEGFR/EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion untersucht. Bei Erk1/2 handelt es sich um ein Signalprotein, welches am Ende der für diesen Signalweg namensgebenden Signalkaskade steht,

die sich aus der GTPase Ras, sowie aus Raf, MEK und Erk zusammensetzt (siehe auch Abschnitt 1.2.2.2, Abbildung 5).

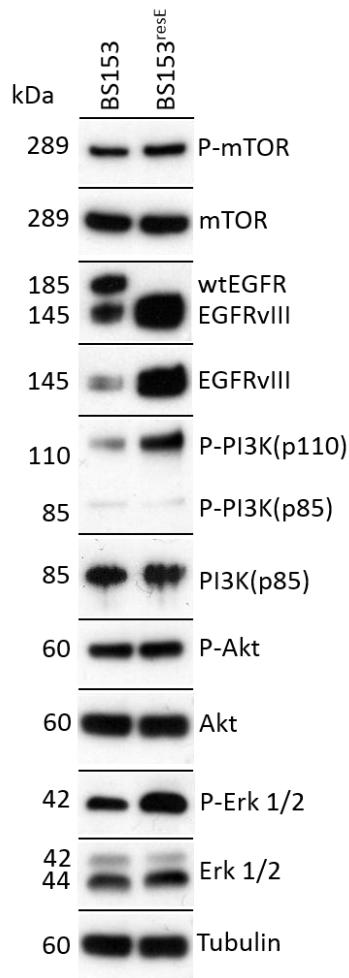


Abbildung 36 Expression von Signalproteinen des PI3K-Akt- und des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs in BS153- und BS153^{resE}-Zellen. Western Blot von parentalen BS153-Zellen und BS153^{resE}-Zellen. Die Expression von Erk1/2, mTor und Akt war in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu BS153-Zellen unverändert. Die Expression von P-Erk1/2, P-mTor und P-Akt war in BS153^{resE}-Zellen hingegen erhöht. Während die Menge der PI3K(p85) in BS153^{resE}- und BS153-Zellen gleich war, war die Konzentration der PI3K(p110) in BS153^{resE}-Zellen stark erhöht.

Die Gesamtmenge an Erk1/2 war in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu parentalen BS153-Zellen nicht verändert, die Menge an phosphoryliertem (P-) Erk war in den resistenten Zellen hingegen leicht erhöht (Abbildung 36). Gleiches gilt für mTor und Akt, wohingegen P-mTor nur leicht und P-Akt in BS153^{resE}-Zellen kaum erhöht war. Ein anderes Bild zeigte sich bei PI3K. Während die Expressionsmenge sowie die Aktivität der regulatorischen Untereinheit (PI3K(p85)) unverändert waren, zeigten BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu BS153-Zellen einen drastischen Anstieg der PI3K(p110)-Aktivierung (P-PI3K(p110)).

4.6.2 Aktivität der PI3K in BS153^{resE}-Zellen

Aufgrund der Ergebnisse des Abschnitts 4.6.1, welcher gezeigt hat, dass die Phosphorylierung und somit die Aktivität der katalytischen PI3K(p110)-Untereinheit in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu parentalen BS153-Zellen stark erhöht ist, wurde im Folgenden die Expression der PI3K(p110)-Isoformen α , β und δ im Western Blot und mittels quantitativer PCR untersucht.

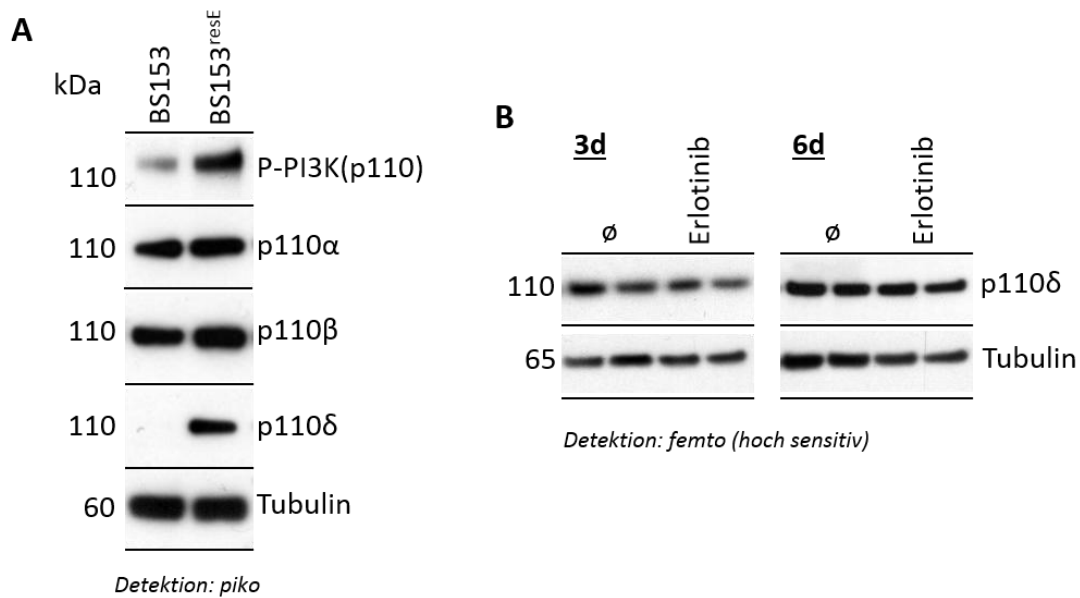


Abbildung 37 Expression der Isoformen α , β und δ der katalytischen Untereinheit der PI3K (PI3K(p110)). (A) Western Blot von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. PI3K(p110 α) und PI3K(p110 β) wurden in BS153^{resE}- und BS153-Zellen gleich stark exprimiert. Die Menge der PI3K(p110 δ) war in BS153^{resE}-Zellen hingegen stark erhöht. [entwickelt mit SuperSignal West piko, Thermo Scientific] (B) Western Blot von Erlotinib (10 μ g/ml) behandelten BS153-Zellen nach 3 und 6 Tagen. Die Expression der p110 δ veränderte sich in dem Beobachtungszeitraum nicht [p110 δ entwickelt mit SuperSignal West femto, Thermo Scientific entwickelt (hoch sensitiv)].

Während die Proteinmenge der Isoformen α und β der katalytischen p110 Untereinheit der PI3K in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu BS153-Zellen nicht verändert war, konnte gezeigt werden, dass die Menge der Isoform δ in BS153^{resE}-Zellen drastisch erhöht war (Abbildung 36 A). Dieser Effekt zeigte sich jedoch lediglich in der Erlotinib-resistenten Zelllinie, nicht aber in temporär mit Erlotinib behandelten parental BS153-Zellen (10 μ g/ml Erlotinib für 3 bzw. 6 Tage) (Abbildung 36 B).

Die mRNA-Analyse der PI3K(p110)-Isoformen mittels quantitativer PCR zeigte verglichen mit BS153-Zellen, einen extrem starken Anstieg der PI3K(p110 δ)-mRNA in BS153^{resE}-Zellen (Abbildung 38). Die mRNA-Level der PI3K(p110 α), der PI3K(p110 β) sowie der PI3K(p110 γ) waren

in den resistenten und den parental BS153-Zellen hingegen nahezu identisch.

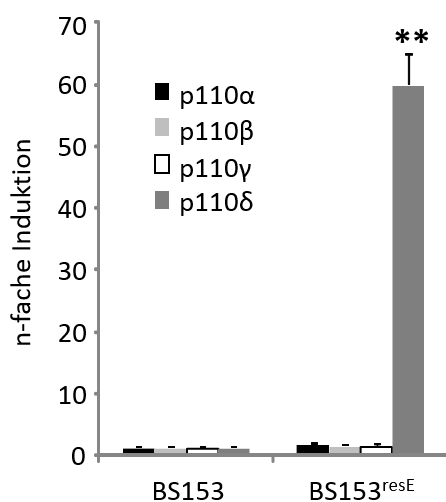


Abbildung 38 mRNA-Analyse der Isoformen der katalytischen PI3K-Untereinheit. Quantitative PCR der Isoformen α , β , γ und δ von PI3K(p110) in BS153- und BS153^{resE}-Zellen. Die mRNA-Mengen der PI3K(p110)-Isoformen α , β und γ waren in BS153- und BS153^{resE}-Zellen nahezu identisch, während die PI3K(p110 δ)-mRNA-Menge in BS153^{resE}-Zellen stark erhöht war. [***P < 0.005, t-test; Mittelwerte einer vierfach-Bestimmung $\pm$ SA; dargestellt wurde eines von drei unabhängigen Experimenten]

4.6.3 Expression und Aktivität von PTEN in BS153^{resE}-Zellen

Da die Versuche des Abschnitts 4.6.1 und 4.6.2 zeigten, dass PI3K(p110 δ) in BS153^{resE}-Zellen verglichen mit parentalen BS153-Zellen stark hochreguliert ist, wurde im nächsten Schritt der Status von PTEN, einem wichtigen negativen Regulator des PI3K-Akt-Signalwegs (siehe auch Abschnitt 1.2.2.2, Abbildung 39) untersucht.

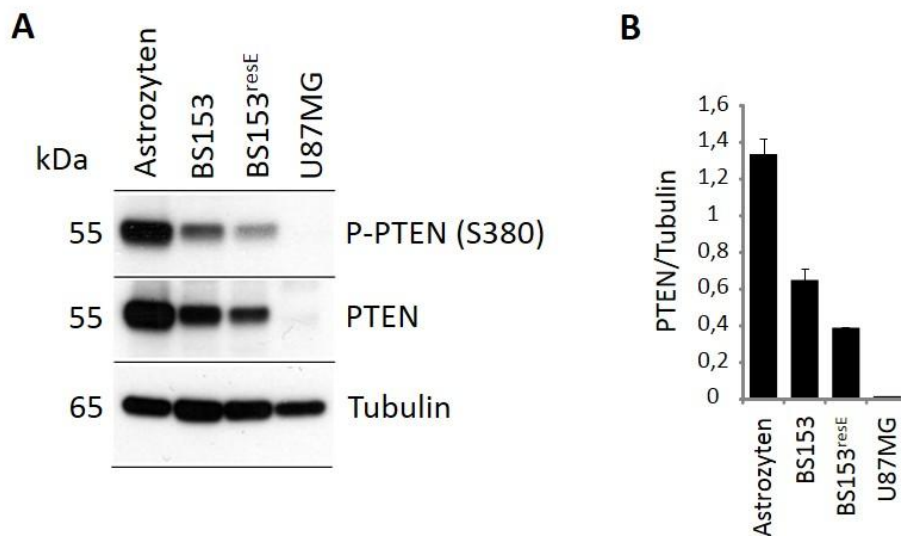


Abbildung 39 **Expression und Aktivität von PTEN.** (A) Western Blot und (B) densitometrische Quantifizierung (PTEN-Tubulin-Verhältnis) von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. Sowohl die Gesamtexpressionsmenge als auch die Aktivität von PTEN war in BS153^{resE}-Zellen geringer als in BS153-Zellen. [(A) Ladekontrolle: Tubulin, (B) Standardisiert an Astrozyten; Negativkontrolle U87MG]

Western Blot-Analysen von BS153- und BS153^{resE}-Zellen zeigten, dass nicht nur die Gesamtproteinmenge von PTEN, sondern auch die Phosphorylierung und somit die Aktivität des negativen Regulators des PI3K-Akt-Signalwegs, in BS153^{resE}-Zellen geringer war als in parentalen BS153-Zellen.

4.7 Die funktionelle Rolle von EGFRvIII und PI3Kp110 δ für BS153^{resE}-Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur die EGFRvIII-Expression, sondern auch die Expression von PI3K(p110 δ), in BS153^{resE}-Zellen deutlich höher ist als in parentalen BS153-Zellen (Abschnitt 4.3 und 4.6). Da es sich bei PI3K(p110 δ) um ein Schlüsselprotein des PI3K-Akt-Signalwegs handelt, welcher der Hauptsignalwegs der EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion ist, sollte in den folgenden Versuchen die Bedeutung

dieser beiden Proteine für den Erlotinib resistenten Phänotyp von BS153^{resE}-Zellen weiter validiert werden.

4.7.1 Die Bedeutung von EGFRvIII für die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen

Um die Bedeutung von EGFRvIII für BS153^{resE}-Zellen zu genauer zu untersuchen, wurden die Auswirkungen eines EGFRvIII-Knockdowns auf die Proliferation von parentalen und Erlotinib-resistenten BS153-Zellen in An- und in Abwesenheit von Erlotinib ermittelt. Hierzu wurden BS153- und BS153^{resE}-Zellen mit einer EGFRvIII-spezifischen siRNA (small interfering RNA (siRNA), 20 pmol) transfiziert und für 6 Tage mit Erlotinib (10 µg/ml) behandelt, bevor die Proliferation der verschiedenen Zellpopulationen ermittelt wurde. Um einen vollständigen Knockdown des EGFRvIII sicherzustellen, wurde die EGFRvIII-Expression im Western Blot überprüft.

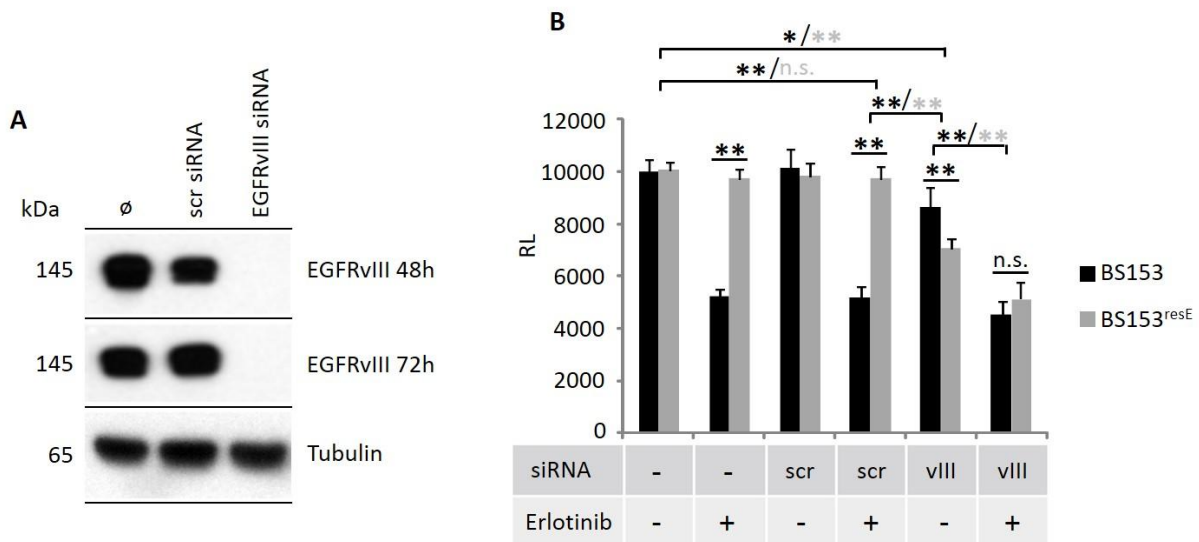


Abbildung 40 Die Rolle von EGFRvIII für die Proliferation von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. Transfektion von BS153- und BS153^{resE}-Zellen mit EGFRvIII-spezifischer- (vIII) oder Scrambled- (scr) siRNA (Kontrolle), je 20 pmol. (A) Western Blot von BS153^{resE}-Zellen, 48 und 72 h nach der siRNA-Transfektion (Ladekontrolle: Tubulin). Die Transfektion mit EGFRvIII-spezifischer siRNA führte zu einer Unterbindung der EGFRvIII-Expression. (B) Proliferations-Assay, 6 d nach siRNA-Transfektion und Behandlung mit Erlotinib (10 µg/ml). Die Proliferation von BS153-Zellen und BS153^{resE}-Zellen wurde durch den Knockdown von EGFRvIII reduziert. Eine zusätzliche Behandlung mit Erlotinib führte zu einer gesteigerten Inhibition der Proliferations von BS153^{resE}-Zellen. [***P < 0.005, *P = 0.05, t-test, n.s. = nicht signifikant; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung ± SA; dargestellt wurde eines von drei unabhängigen Experimenten]

Die Transfektion von BS153^{resE}-Zellen mit EGFRvIII-spezifischer siRNA führte nach 48 Stunden und 72 Stunden zu einer Unterbindung der EGFRvIII-Expression. Die Transfektion der Zellen mit der Kontroll-siRNA (Scrambled- (scr) siRNA) beeinflusste hingegen weder die Proteinexpression (Abbildung 40 A) noch die Proliferation von BS153- und BS153^{resE}-Zellen (Abbildung 40 B). Der Knockdown von EGFRvIII führte bei BS153-Zellen zu einer leichten und bei BS153^{resE}-Zellen zu einer etwa 25 %igen Inhibition der Proliferation. Die Behandlung von BS153-Zellen mit Erlotinib

bewirkte eine starke Hemmung der Proliferation um mehr als 50 %, wobei ein zusätzlicher EGFRvIII-Knockdown nicht in einer Steigerung der Inhibition resultierte. Anders als bei BS153-Zellen bewirkte die Transfektion von BS153^{resE}-Zellen mit EGFRvIII-spezifischer siRNA, bei gleichzeitiger Behandlung mit Erlotinib, eine zusätzliche Inhibition der Proliferation um insgesamt etwa 50 %. Zusammenfassend resultierte der Knockdown von EGFRvIII in einer Inhibition der Proliferation, wobei eine gleichzeitige Behandlung mit Erlotinib lediglich bei BS153^{resE}-Zellen zu einer gesteigerten Reduktion der Proliferation führte und somit in einer Sensitivierung gegenüber dem TKI resultierte.

4.7.2 Die Bedeutung von EGFRvIII für die EGFR/EGFRvIII-vermittelte Signaltransduktion auf Proteinebene

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von EGFRvIII auf die Expression und Aktivität von zentralen Signalproteinen der EGFR/EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion untersucht. Hierzu wurden BS153^{resE}-Zellen zunächst mit EGFRvIII-spezifischer oder scr-siRNA transfiziert (je 20 pmol). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde die Gesamtexpressionsmenge sowie die Menge an aktivem (phosphoryliertem) PI3K, Akt und Erk im Western Blot untersucht.

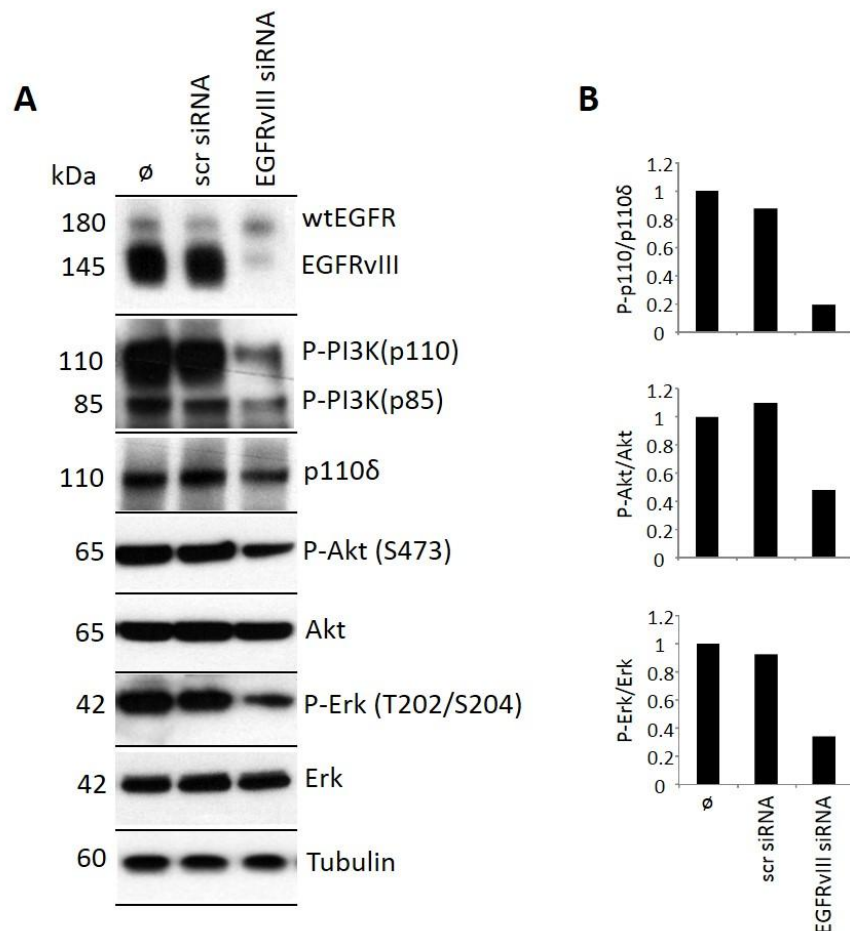


Abbildung 41 Einfluss von EGFRvIII auf die Expression und Aktivität von Signalproteinen der EGFR/EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion in BS153^{resE}-Zellen. (A) Western Blot von BS153^{resE}-Zellen, 72 h nach der Transfektion mit EGFRvIII-spezifischer- oder scr-siRNA (je 20 pmol). (B) Densitometrische Quantifizierung des Verhältnisses Gesamtproteinmenge/phosphorylierte Proteinmenge. Der Knockdown von EGFRvIII beeinflusste die Expression von PI3K, Akt und Erk nicht, führte aber zu einer Reduktion der PI3K(p85)-, PI3K(p110δ)-, Akt- und Erk-Phosphorylierung.

Die Transfektion von BS153^{resE}-Zellen mit scr-siRNA beeinflusste weder die Expression noch die Aktivierung von PI3K, Akt oder Erk (Abbildung 41). Der Knockdown von EGFRvIII führte zu einer Reduktion der PI3K(p110)-, der PI3K(p85)-, der PI3K(p110δ)-, der Akt- und der Erk-Phosphorylierung. Auf die Gesamtexpressionsmenge der genannten Proteine hatte die Transfektion mit EGFRvIII-spezifischer siRNA hingegen keinen Einfluss.

4.7.3 Die Bedeutung von PI3K für die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen

Da die Versuche des Abschnitts 4.6 gezeigt haben, dass PI3K für die EGFRvIII-abhängige Signaltransduktion in BS153^{resE}-Zellen von zentraler Bedeutung ist, sollte im nächsten Schritt getestet werden, ob eine Inhibition der PI3K die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen signifikant beeinflusst. Hierzu wurde die Proliferation von parentalen und Erlotinib-resistenten BS153-Zellen, welche über einen Zeitraum von 6 Tagen mit unterschiedlichen Konzentration PX-866 (0,25-10 µM) behandelt wurden, ermittelt. Bei PX-866 handelt es sich um ein

Wortmannin-Analog, welches alle vier Isoformen der PI3K inhibiert. Zudem befindet sich PX-866 derzeit in einer Phase II-Studie zur Behandlung von GBM-Rezidiven und sekundären GBM (241).

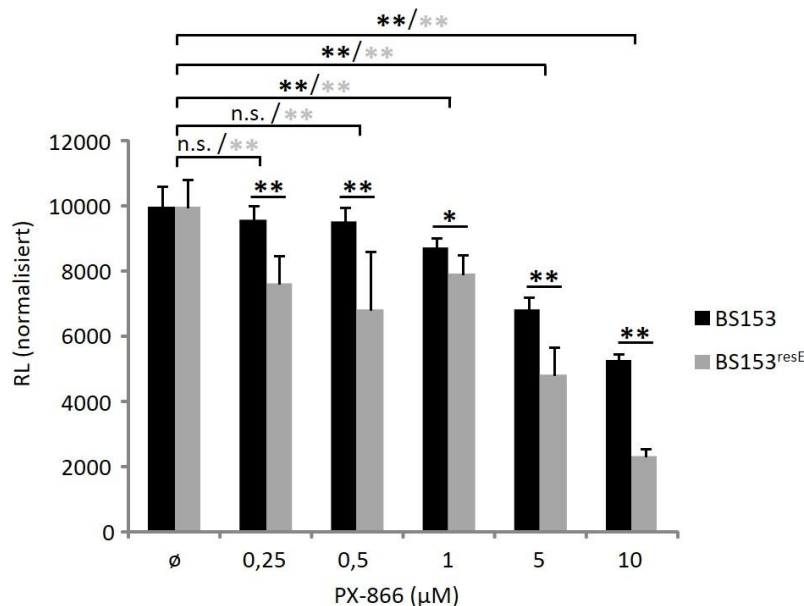


Abbildung 42 **Einfluss von PI3K auf die Proliferation von BS153- und BS153^{resE}-Zellen.** Proliferations-Assay von BS153- und BS153^{resE}-Zellen welche für 6 d mit unterschiedlichen Konzentrationen des PI3K-Inhibitors PX-866 (0,25-10 µM) behandelt wurden. PX-866 inhibierte die Proliferation von BS153- und BS153^{resE}-Zellen ab einer Konzentration von 1 µM bzw. 0,25 µM, wobei PX-866 die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen signifikant stärker inhibierte als die Proliferation parentaler BS153-Zellen. [RL=relative Lumineszenz, **P < 0.005, t-test, n.s. = nicht signifikant; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung ± SA ; dargestellt wurde eines von drei unabhängigen Experimenten]

Die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen wurde bereits bei einer PX-866-Konzentration von 0,25 µM signifikant inhibiert (Abbildung 42). Die Behandlung von BS153-Zellen mit PX-866 führte hingegen erst ab einer Inhibitorkonzentration von 1 µM zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation. Ein Vergleich der beiden Zelllinien zeigte, dass PX-866 die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen über die gesamte Konzentrationsreihe signifikant stärker inhibierte als die Proliferation parentaler BS153-Zellen, was auf eine besonders starke Abhängigkeit von BS153^{resE}-Zellen vom PI3K-Akt-Signalweg hindeutet.

4.7.4 Die Bedeutung der PI3K(p110δ)-Aktivität für die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen

In den Abschnitten 4.7.2 und 4.7.3 konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der PI3K(p110δ) in BS153^{resE}-Zellen hochreguliert ist und dass PI3K für die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen von zentraler Bedeutung ist. Um den spezifischen Einfluss der PI3K(p110δ) auf die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen zu ermitteln, wurden die Auswirkungen eines PI3K(p110δ)-Knockdowns (PI3K(p110δ)-siRNA) auf die Proliferation von parentalen und Erlotinib-resistenten BS153-Zellen in An- und in Abwesenheit von Erlotinib untersucht. Hierzu wurden BS153- und BS153^{resE}-Zellen

entweder mit einer PI3K(p110 δ)-spezifischen- oder einer scr-siRNA (je 20 pmol) transfiziert und mit Erlotinib (10 μ g/ml) behandelt. Die Proliferation der verschiedenen Zellpopulationen wurde nach 6 Tagen gemessen.

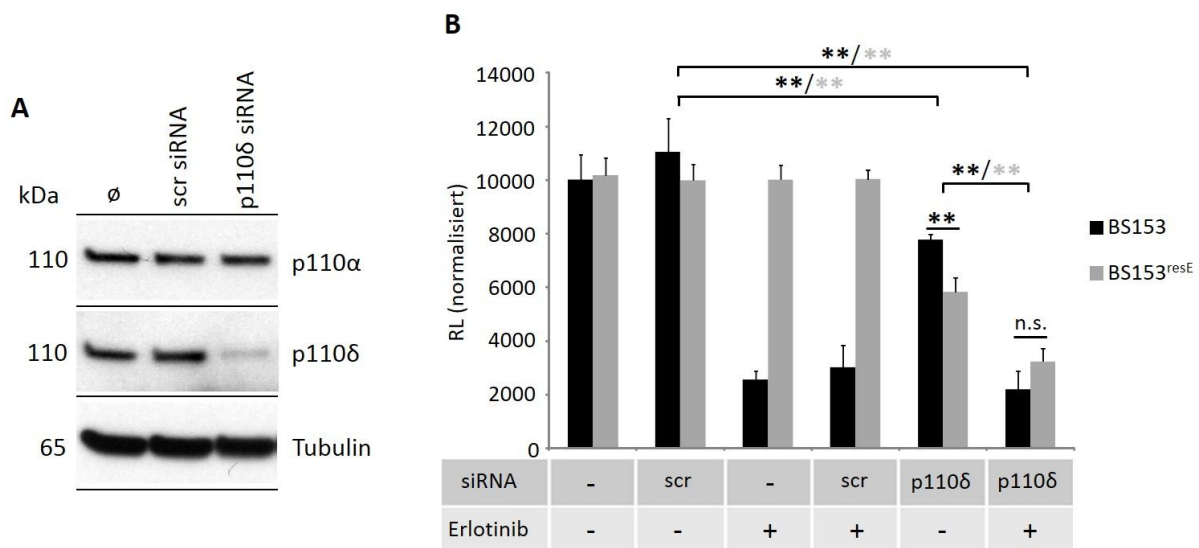


Abbildung 43 Einfluss von PI3K(p110 δ) auf die Proliferation von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. Transfektion von BS153- und BS153^{resE}-Zellen mit PI3K(p110 δ)-spezifischer- oder scr-siRNA (je 20 pmol). (A) Western Blot 72 h nach der siRNA-Transfektion: Die Transfektion mit PI3K(p110 δ)-siRNA führte zu einer fast vollständigen Inhibition der PI3K(p110 δ)-Expression. (B) Proliferations Assay, 6 d nach der siRNA-Transfektion und Behandlung mit Erlotinib (10 μ g/ml): Der PI3K(p110 δ)-Knockdown reduzierte die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen signifikant stärker als von BS153-Zellen. Die gleichzeitige Behandlung von BS153-Zellen mit Erlotinib hatte, verglichen mit lediglich Erlotinib-behandelten Zellen, keinen additiven Effekt. Die Erlotinib-Behandlung von BS153^{resE}-PI3K(p110 δ)-Knockdown-Zellen führte, verglichen zu nicht Erlotinib-behandelten Knockdown-Zellen zu einer zusätzlichen Inhibition der Proliferation. [RL=relative Lumineszenz, ** $P < 0.005$, t-test, n.s.=nicht signifikant; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung $\pm$ SA ; dargestellt wurde eines von drei unabhängigen Experimenten]

Die Transfektion von BS153^{resE}-Zellen mit PI3K(p110 δ)-spezifischer-siRNA führte zu einer fast vollständigen Inhibition der PI3K(p110 δ)-Expression, wohingegen die Expression der PI3K(p110 α)-Isoform nicht beeinflusst wurde (Abbildung 43 A). Proliferationsanalysen von BS153- und BS153^{resE}-Zellen zeigten, dass die Transfektion mit PI3K(p110 δ)-spezifischer-siRNA zu einer mäßigen aber signifikanten Inhibition der Proliferation von BS153-Zellen und zu einer etwa 40 %igen Reduktion der BS153^{resE}-Proliferation führte (Abbildung 43 B). Die Behandlung mit Erlotinib beeinflusste die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen nicht, führte aber zu einer starken Reduktion der Proliferation von BS153-Zellen. Interessanterweise konnte durch den Knockdown von PI3K(p110 δ) bei gleichzeitiger Behandlung mit Erlotinib eine etwa 70 %ige Reduktion der Proliferation von BS153^{resE}-Zellen erzielt werden. Auf die Proliferation von parentalen BS153-Zellen hatte eine Behandlung mit Erlotinib bei gleichzeitigem PI3K(p110 δ)-Knockdown, hingegen keinen zusätzlichen Effekt. Durch die Transfektion mit scr-siRNA wurde weder die Proliferation von parentalen, noch von Erlotinib resistenten Zellen beeinflusst. Somit resultierte der Knockdown von PI3K(p110 δ) in einer Reduktion der BS153- und BS153^{resE}-Zellproliferation.

Da dieser Effekt durch die gleichzeitige Behandlung mit Erlotinib gesteigert werden konnte führte der Knockdown von PI3K(p110 δ) zu einer Sensitivierung von BS153^{resE}-Zellen gegenüber dem TKI.

4.8 Die Bedeutung von HDAC für die Proliferation, Migration und den wtEGFR/EGFRvIII-Status von GBM-Zellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die Auswirkungen einer Inhibition der HDAC-Aktivität, durch die Behandlung mit spezifische Inhibitoren, auf die Proliferation, Migration und den wtEGFR/EGFRvIII-Status von GBM-Zellen untersucht werden. Hierzu wurde eine Reihe repräsentativer *in vitro*-GBM-Modellsysteme, sowie zwei Erlotinib-resistente GBM-Zelllinien (BS153^{resE}, DK-MG^{resE}) mit verschiedenen HDACi (SAHA, Scriptaid, MS275, TSA), sowie mit dem kombinierten EGFR-HDAC-Inhibitor CUDC-101 behandelt. Die untersuchten GBM-Modellsysteme umfassten sowohl EGFR-amplifizierte und nicht-amplifizierte-Zelllinien welche teilweise zudem EGFRvIII exprimierten, als auch Erlotinib-resistente GBM-Zellen (Tabelle 17).

Zelllinie	Zellart	EGFR Amplifikation	EGFRvIII Protein	wtEGFR Protein
U87MG	konventionell	n.v.	-	wenig
g55t2	konventionell	n.v.	-	wenig
0306	GS	hoch	-	mittel
0627	GS	mittel	-	mittel
GS-27	GS	hoch	+	mittel
GS-30	GS	hoch	-	hoch
BS153	konventionell	hoch	+	mittel
*BS153 ^{resE}	konventionell	hoch	+	wenig
DK-MG	konventionell	hoch	+	wenig
*DK-MG ^{resE}	konventionell	hoch	+	mittel

Tabelle 17 Zusammenfassung der in Abschnitt 4.8 verwendeten Zelllinien. Angegeben wurde die Zellart [Konventionelle Zelllinien wachsen in vitro in Anwesenheit von 10 % FCS als adhärenter Monolayer; GS-Zelllinien (Gliom-Stammzellen-ähnliche Zellen) wachsen unter Kulturbedingungen für neurale Stammzellen als Neurosphären], die EGFR-Amplifikation [qPCR; n.v. (nicht vorhanden) ≤ 3, mittel ≤ 10, hoch > 10] sowie die Proteinmenge des wtEGFR und des EGFRvIII (Western Blot). Herkunft der Zelllinien siehe Abschnitt 3.1.1. [Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Zellen]*

Bei DK-MG-Zellen handelt es sich um eine GBM-Zelllinie, welche adhären wächst, EGFRvIII-exprimiert und eine moderate wtEGFR-Amplifikation zeigt (Tabelle 17). Ebenso wie BS153-Zellen, konnte durch die chronische Behandlung mit Erlotinib (10 µg/ml, > 15 Passagen) eine Erlotinib-resistente Zelllinie generiert werden, welche im Folgenden als DK-MG^{resE} bezeichnet wird.

4.8.1 Einfluss von HDACi auf die Proliferation von GBM-Zellen

Um den Einfluss eines veränderten Acetylierungsstatus auf die Proliferation von GBM-Zellen zu untersuchen, wurden alle in Tabelle 17 (Abschnitt 4.8) aufgeführten Zelllinien mit den HDACi SAHA, Scriptaid, MS275 und TSA behandelt, welche unterschiedliche HDAC-Klassen inhibieren (Tabelle 18).

HDACi	Synonym	Klasse	Spezifität	Quelle
TSA	Trichostatin A	Hydroxamate	Klasse I, IIa, IIb, IV (nicht HDAC8)	(338)
SAHA	Vorinostat; Zolinza; Octanedioic acid hydroxyamide phenylamide	Hydroxamate	Klasse I, IIa, IIb, IV	(339)
Scriptaid		Hydroxamate	Klasse I	(340)
MS-275	Etinostat, SNDX-275, MS-27-275	Benzamidine	HDAC 1,3 (HDAC 8 marginal)	(341)
CUDC-101			Klasse I, IIa, IIb und EGFR, HER2	(342)

Tabelle 18 Synonyme und Spezifität spezifischer HDACi. (Quellen wie angegeben)

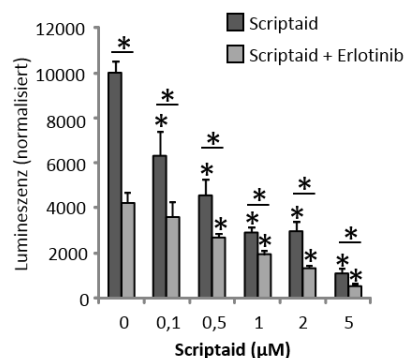
Durch die gleichzeitige Behandlung mit Erlotinib bzw. durch eine Behandlung mit dem EGFR/HER2-HDACi CUDC-101 sollte ferner untersucht werden, ob die simultane Inhibition von HDAC und EGFR zu einer gesteigerten Reduktion der Proliferation führt. Um zu untersuchen, ob es möglich ist, eine erworbene Erlotinibresistenz durch eine Veränderung des Acetylierungsstatus der Zellen zu überwinden, wurden alle Experimente zudem mit Erlotinib-resistenten BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zellen durchgeführt.

4.8.1.1 Einfluss von HDACi auf die Proliferation von wtEGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen

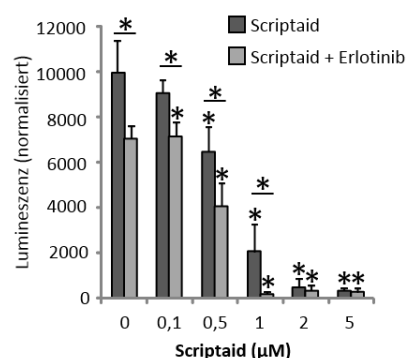
Im ersten Schritt sollte der Einfluss einer HDACi- sowie einer kombinierten HDACi-Erlotinib-Behandlung auf die Proliferation von wtEGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden Zellen untersucht werden. Hierzu wurden BS153/BS153^{resE}-Zellen und DK-MG/DK-MG^{resE}-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der HDACi Scriptaid, SAHA, MS275 und TSA (0,1, 0,5, 1, 2 und 5 μ M) alleine, sowie in Kombination mit Erlotinib (10 μ M) oder mit CUDC-101 (0,1, 0,5, 1, 2 und 5 μ M) behandelt. Die Messung der Proliferation erfolgte nach 6 Tagen.

A

BS153

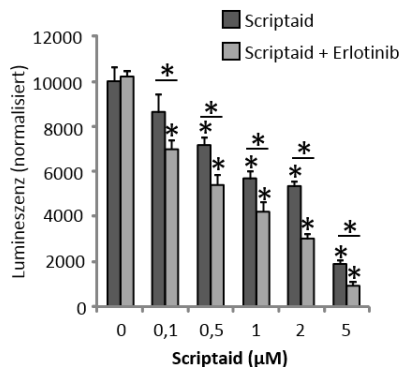


DK-MG

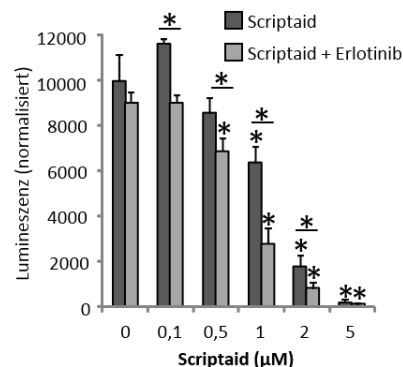


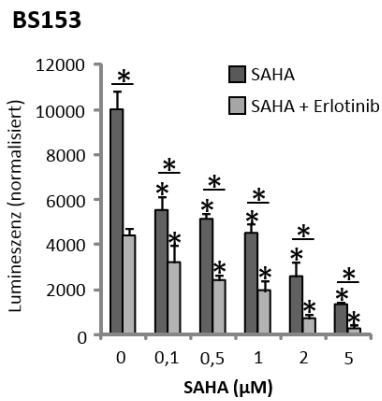
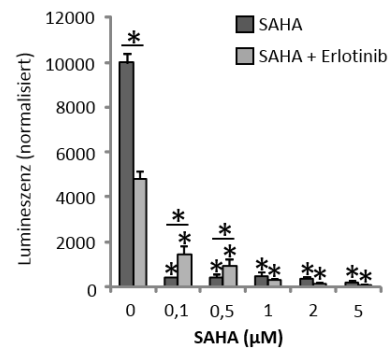
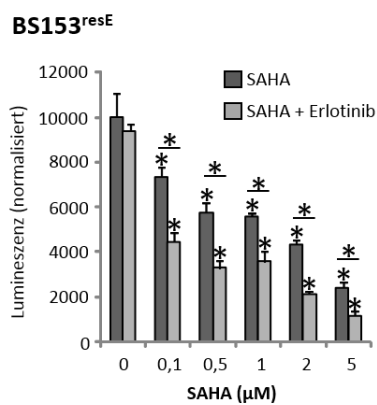
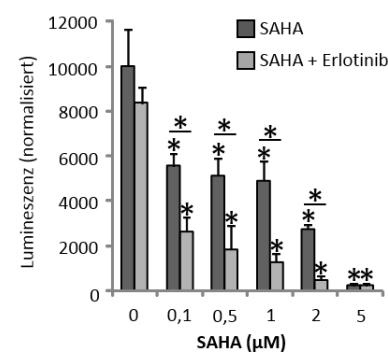
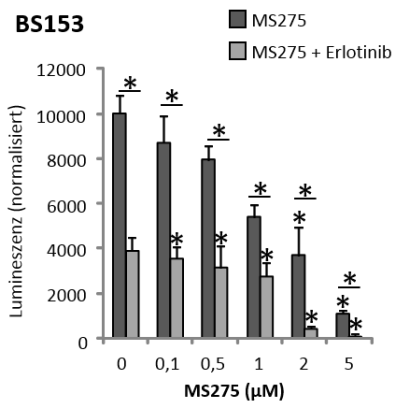
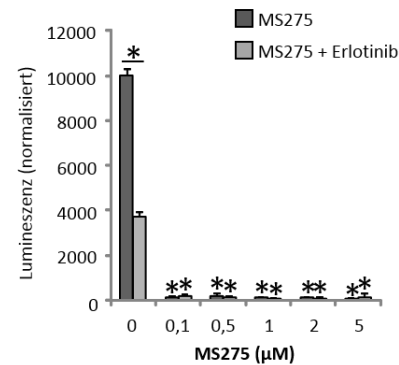
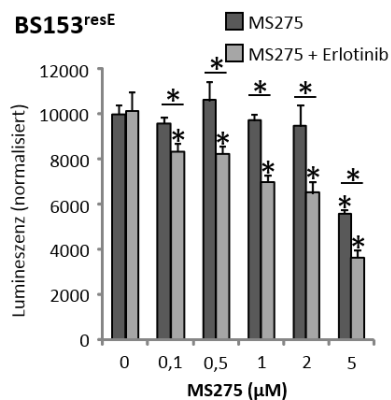
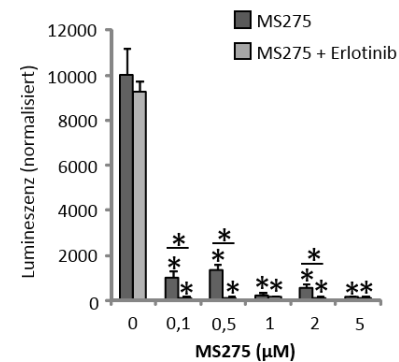
B

BS153^{resE}



DK-MG^{resE}



C**DK-MG****D****DK-MG^{resE}****E****DK-MG****F****DK-MG^{resE}**

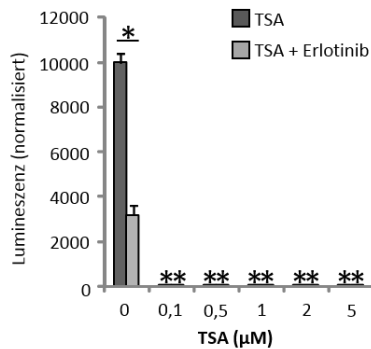
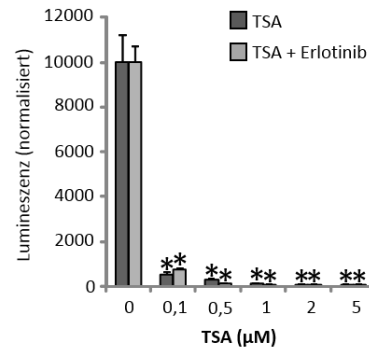
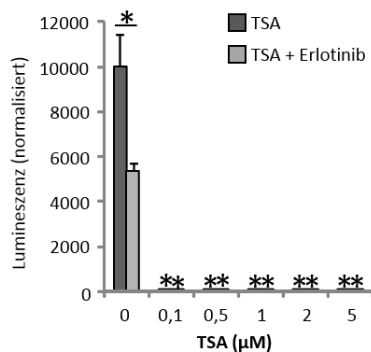
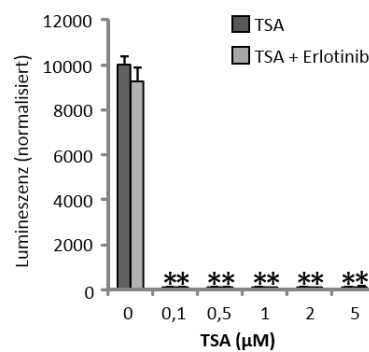
G**BS153****BS153^{resE}****H****DK-MG****DK-MG^{resE}**

Abbildung 44 Einfluss einer HDACi-Behandlung auf die Proliferation von BS153/BS153^{resE}- und DK-MG/DK-MG^{resE}-Zellen. BS153/BS153^{resE}- und DK-MG/DK-MG^{resE}-Zellen wurden mit je 0,1-5 μM der HDACi Scriptaid, SAHA, MS275, TSA sowie parallel zusätzlich mit Erlotinib (10 μM) behandelt. Nach 6 d wurde die Proliferationsaktivität der Zellen ermittelt (CellTiter-Glo®-Assay). (A, B) Scriptaid, (C, D) SAHA und (E, F) MS275, reduzierten die Proliferation von BS153/BS153^{resE}- und DK-MG/DK-MG^{resE}-Zellen konzentrationsabhängig, wohingegen (D) TSA die Proliferation vollständig inhibierte. (A)-(H) Die parallele Behandlung mit HDACi und Erlotinib führte bei allen parentalen und bemerkenswerter Weise auch bei allen Erlotinib-resistenten Zelllinien zu einer gesteigerten Inhibition der Proliferation. [$*P < 0.05$, (* oberhalb jeder Säule) im Vergleich zur Kontrolle ohne HDACi; $*P < 0.05$, (* unterstrichen, oberhalb von Säulenpaaren) Additiver Effekt von Erlotinib; t-test; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung $\pm$ SA; Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten]

Die Erlotinib-Behandlung parentaler und Erlotinib-resistenter BS153- und DK-MG-Zellen führte wie erwartet zu einer Reduktion der Proliferation der parentalen Zelllinien, nicht aber der Erlotinib-toleranten Zelllinien (Abbildung 44 A-H). Die Behandlung der Zellen mit den HDACi Scriptaid, SAHA und MS275 bewirkte hingegen in allen Fällen eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation (Abbildung 44 A-F). Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Erlotinib und dem jeweiligem HDACi resultierte verglichen mit lediglich HDACi-behandelten Zellen, nicht nur bei den parentalen Zelllinien sondern bemerkenswerter Weise auch bei Erlotinib-resistenten Zelllinien BS153^{resE} und DK-MG^{resE}, in einer additiven Reduktion der Proliferation (Abbildung 44 A-H).

Ein Vergleich der inhibitorischen Wirkung von SAHA, Scriptaid und MS275 zeigte, dass MS275 im Gegensatz zu den beiden anderen HDACi (Abbildung 44 C, D) in der Lage war, die Proliferation von DK-MG/DK-MG^{resE}-Zellen bereits ab einer Konzentration von 0,1 μM fast vollständig zu

inhibieren (Abbildung 44 E, F). Insgesamt konnte bei MS275-behandelten BS153^{resE}-Zellen jedoch der geringste Proliferationsrückgang beobachtet werden (Abbildung 44 F).

Ein anderes Bild zeigte sich bei TSA behandelten Zellen (Abbildung 44 G, H). Dieser HDACi konnte die Proliferation parentaler und Erlotinib-resistenter BS153- und DK-MG-Zellen, unabhängig von einer zusätzlichen Erlotinib-Behandlung, bereits ab einer Konzentration von 0,1 μ M nahezu vollständig unterbinden.

Zusammenfassend inhibierten alle HDACi die Proliferation von parentalen und Erlotinib-resistenten Zellen, wobei durch eine zusätzliche Behandlung mit Erlotinib eine gesteigerte Inhibition der Proliferation von Erlotinib-resistenter Zellen und somit eine Sensitivierung der Zellen gegenüber dem TKI erzielt werden konnte.

Durch die Behandlung mit dem kombinierten EGFR/HER2-HDACi CUDC-101 konnte die Proliferation parentaler BS153-Zellen (Abbildung 45 A) sowie parentaler und Erlotinib-resistenter DK-MG-Zellen (Abbildung 45 B), bereits ab einer Konzentration von 0,1 μ M nahezu vollständig inhibiert werden. Die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen wurde bei einer CUDC-101-Konzentration von 0,1 - 1 μ M konzentrationsabhängig inhibiert und eine Inhibitorkonzentration von 2 μ M bewirkte eine nahezu vollständige Unterbindung der Proliferation (Abbildung 45 A). Bei allen Zelllinien war die Proliferationsreduktion durch CUDC-101 signifikant stärker als durch Erlotinib (Abbildung 45).

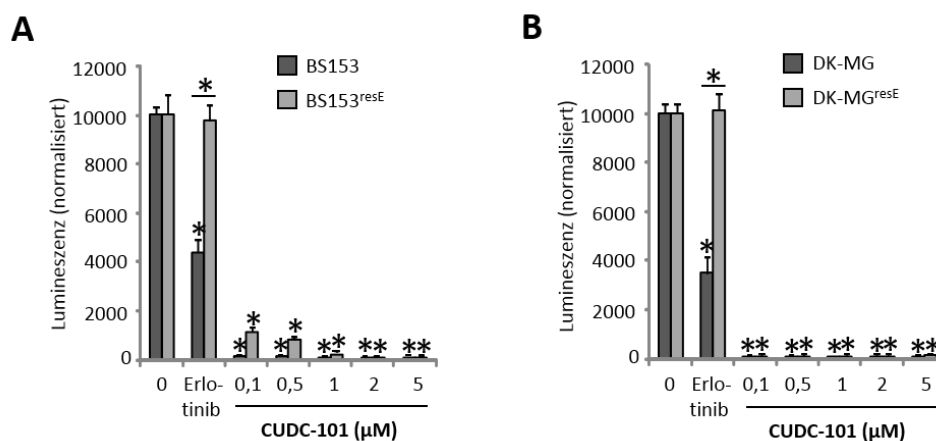


Abbildung 45 Einfluss einer CUDC-101-Behandlung auf die Proliferation von BS153/BS153^{resE}- und DK-MG/DK-MG^{resE}-Zellen.

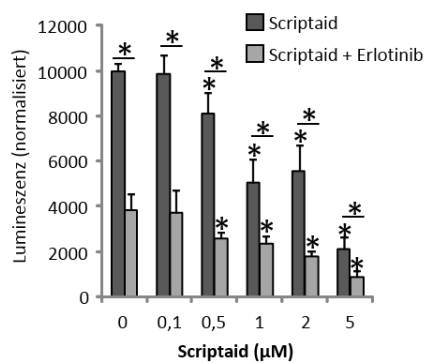
BS153/BS153^{resE}- und DK-MG/DK-MG^{resE}-Zellen wurden mit je 0,1-5 μ M des EGFR/HER2-HDACi CUDC-101 oder mit Erlotinib (10 μ M) behandelt. Die Messung der Proliferationsaktivität erfolgte nach 6 d. CUDC-101 inhibierte die Proliferation von (A) BS153 und (B) DK-MG/DK-MG^{resE} Zellen bereits ab einer Konzentration von 0,1 μ M und von (A) BS153^{resE} ab einer Konzentration von 2 μ M nahezu vollständig. Die Reduktion der Proliferation war in allen Fällen signifikant stärker als durch Erlotinib. [*P < 0.05, t-test; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung $\pm$ SA; Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten]

4.8.1.2 Einfluss von HDACi auf die Proliferation von GBM-Zelllinien mit unterschiedlichem wtEGFR/EGFRvIII-Status

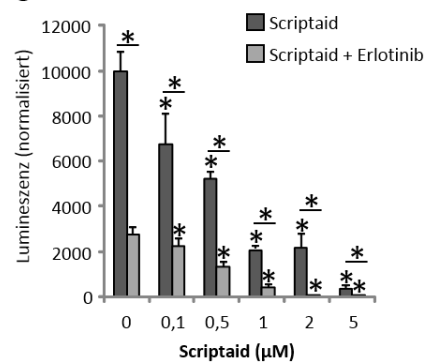
Um zu überprüfen, ob die in Abschnitt 4.8.1.1 beobachteten Resultate vom wtEGFR/EGFRvIII-Status der Zellen abhängig waren, wurden alle im Abschnitt 4.8.1.1 beschriebenen Versuche zusätzlich mit U87MG-, g55t2- und 0627-Zellen (nicht wtEGFR-amplifiziert, keine EGFRvIII-Expression), sowie mit 0306- und GS-30-Zellen (wtEGFR-amplifiziert, keine EGFRvIII-Expression) bzw. mit GS-27-Zellen (wtEGFR-amplifiziert, EGFRvIII-positiv) durchgeführt (Abschnitt 4.8.1, Tabelle 17).

A

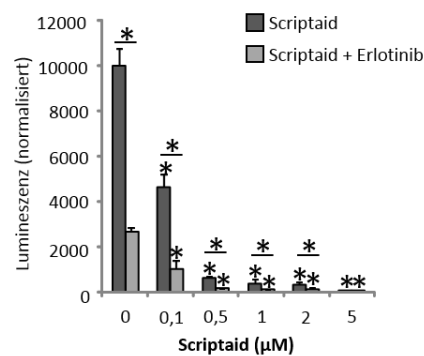
U87MG



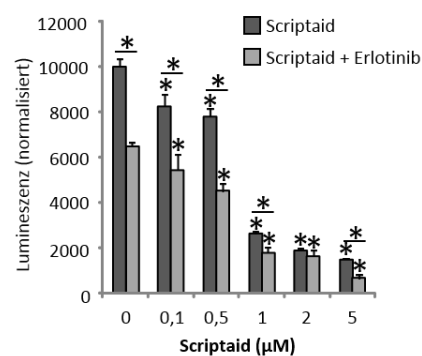
g55t2



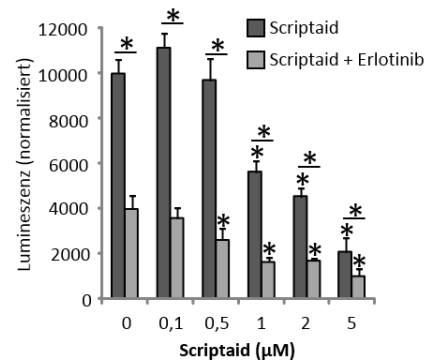
0306



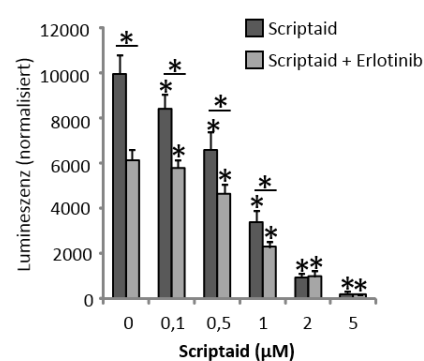
0627

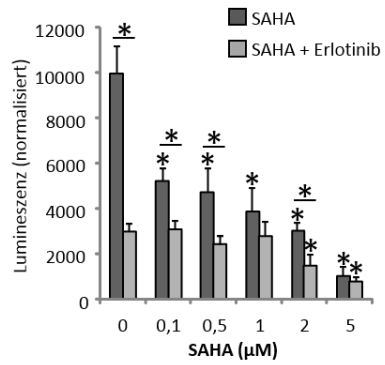
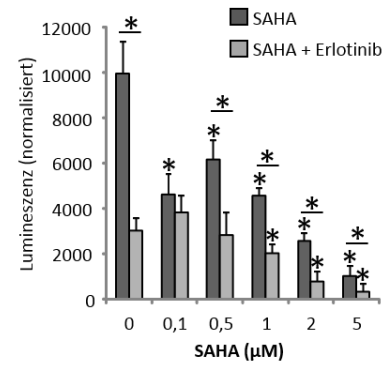
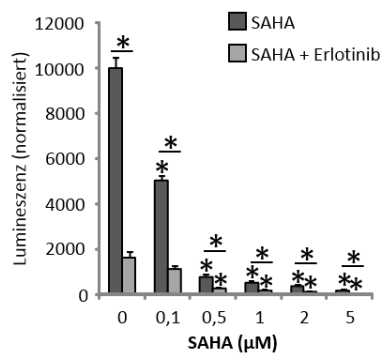
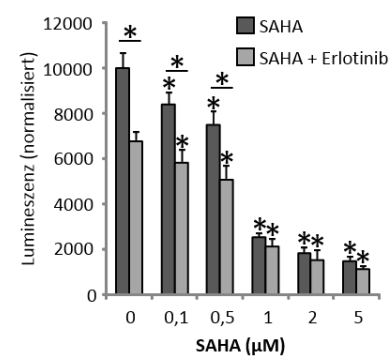
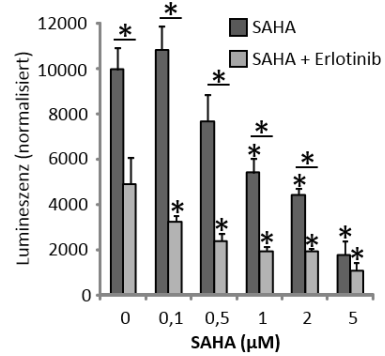
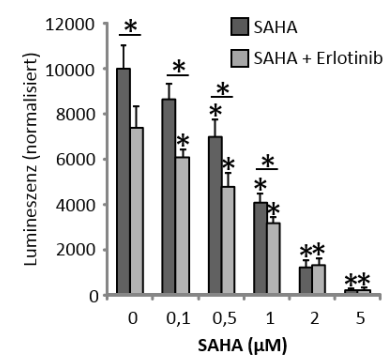


GS-27



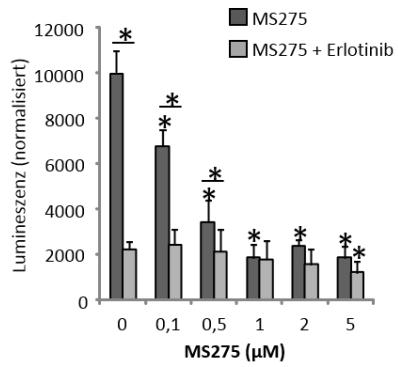
GS-30



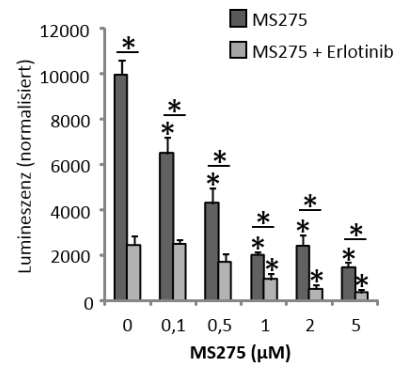
B**U87MG****g55t2****0306****0627****GS-27****GS-30**

C

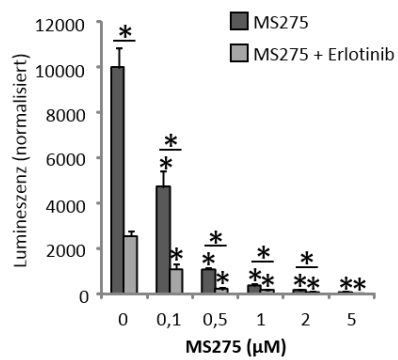
U87MG



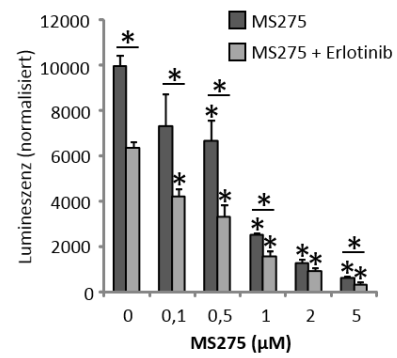
g55t2



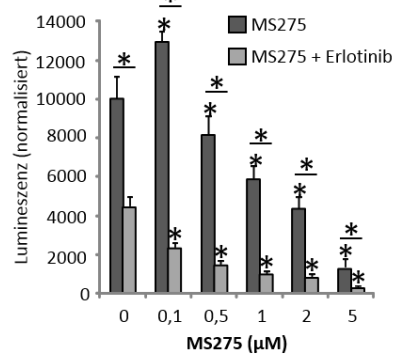
0306



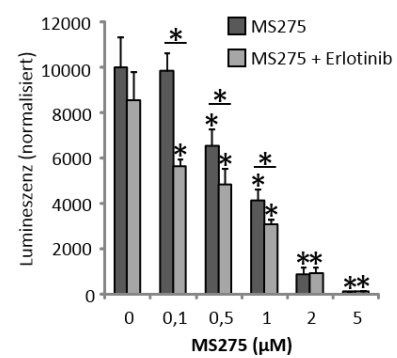
0627



GS-27



GS-30



D

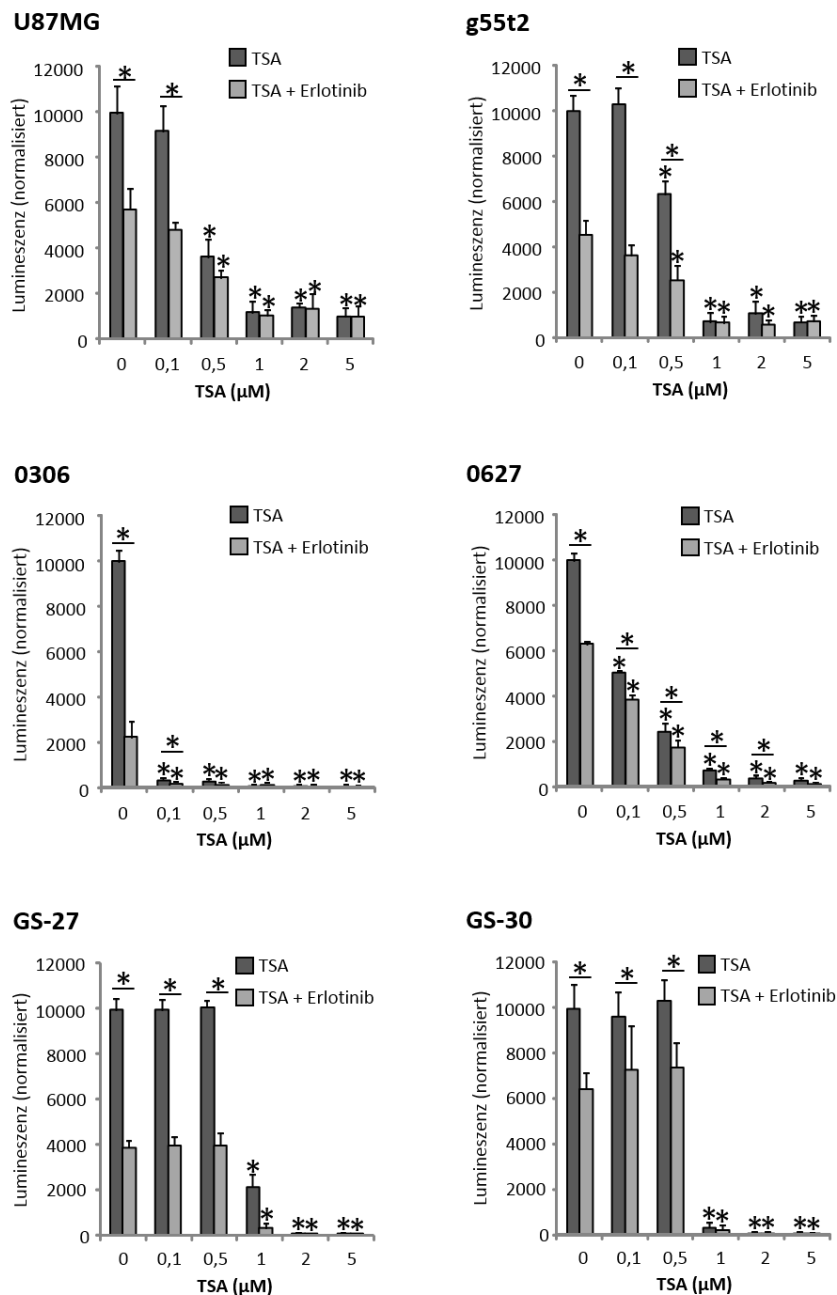


Abbildung 46 Einfluss einer HDACi-Behandlung auf die Proliferation von GBM-Zellen. U87MG-, g55t2-, 0627-, 0306-, GS-27- und GS-30-Zellen wurden den HDACi Scriptaid, SAHA, MS275, TSA (je 0,1-5 μM) sowie in einem weiteren Versuchsansatz zusätzlich mit Erlotinib (10 μM) behandelt. Nach 6 d wurde die Proliferationsaktivität der Zellen ermittelt (CellTiter-Glo®-Assay). (A)-(D) Alle HDACi reduzierten die Proliferation der untersuchten GBM-Zellen, unabhängig von ihrem wtEGFR/EGFRvIII-Status, zudem führte die parallele Behandlung mit Erlotinib zu einer gesteigerten Inhibition der Proliferation. [*P < 0.05, t-test; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung ± SA; Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten]

Unabhängig von ihrem wtEGFR/EGFRvIII-Status und der Zellart (konventionelle-/GS-Zelllinien) führte die Behandlung mit Erlotinib bei allen Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation (Abbildung 46). Ebenso wie bereits im Abschnitt 4.8.1.1 (Abbildung 45) für BS153/BS153^{resE}- und DK-MG/DK-MG^{resE}-Zellen (alle wtEGFR-amplifiziert und EGFRvIII-positiv) beschrieben, führte auch hier die Behandlung mit Scriptaid (Abbildung 46 A), SAHA (Abbildung

46 B) und MS275 (Abbildung 46 C) zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Proliferation von U87MG-, g55t2- und 0627-Zellen (alle wtEGFR-amplifiziert und EGFRvIII-negativ), sowie von 0306- und GS-30-Zellen (wtEGFR-amplifiziert und EGFRvIII-negativ) bzw. von GS-27-Zellen (wtEGFR-amplifiziert und EGFRvIII-positiv). Ein Vergleich der einzelnen Versuche zeigte, dass der inhibitorische Effekt von allen drei HDACi bei 0306-Zellen am deutlichsten war (Abbildung 46). Eine zusätzliche Behandlung mit Erlotinib führte, verglichen mit lediglich Erlotinib oder HDACi behandelten Zellen, immer zu einer additiven Steigerung der Proliferationsinhibition (Abbildung 46). Im Gegensatz zu Scriptaid, SAHA und MS275, führte die Behandlung mit TSA lediglich bei den konventionell wachsenden Zelllinien U87MG, g55t2 sowie bei den GS-Zelllinie 0627 und 0306-Zellen zu einer relativ gleichmäßigen, konzentrationsabhängigen Inhibition der Proliferationsaktivität (Abbildung 46 D). Die Proliferation von GS-30- und GS-27-Zellen wurde hingegen erst ab einer TSA-Konzentration von 1 μM beeinflusst, wobei in beiden Fällen die Proliferation nicht nur reduziert sondern fast vollständig unterbunden wurde. Eine zusätzliche Behandlung mit dem TKI Erlotinib führte auch bei GS-27- und GS-30-Zellen zu einer additiven Inhibition der Proliferation.

Insgesamt konnten alle HDACi die Proliferation der untersuchten GBM-Zellen inhibieren, und wirkten somit unabhängig vom wtEGFR/EGFRvIII-Status der Zellen. Eine zusätzliche Behandlung mit Erlotinib führte in allen Fällen zu einer gesteigerten Inhibition der Proliferation.

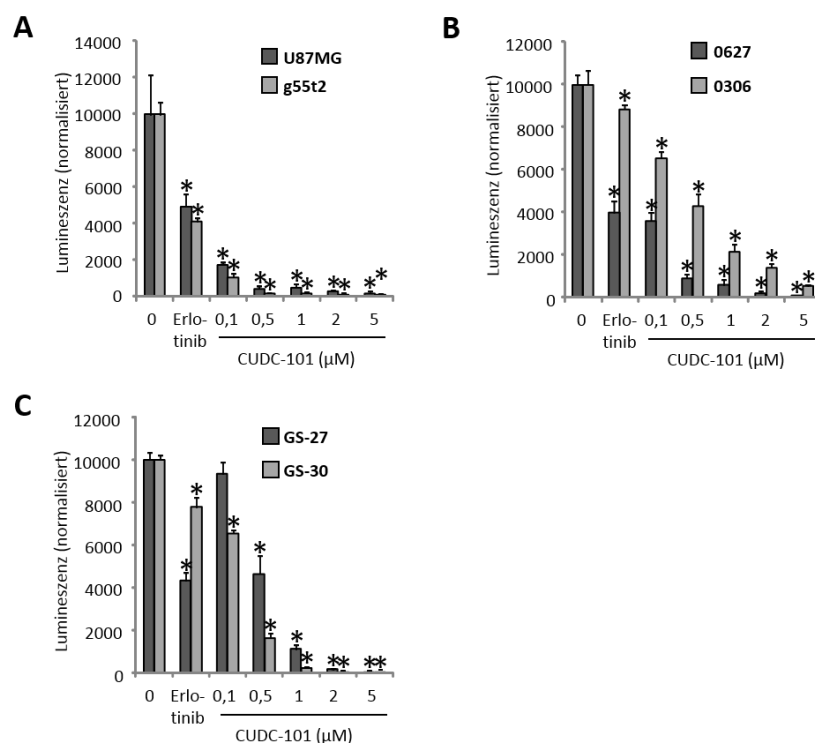


Abbildung 47 Einfluss einer CUDC-101-Behandlung auf die Proliferation von GBM-Zellen. U87MG-, g55t2-, 0627-, 0306-, GS-27- und GS-30 Zellen wurden mit je 0,1-5 μM des EGFR/HER2-HDACi CUDC-101 oder mit Erlotinib (10 μM) behandelt. Die Messung der Proliferationsaktivität erfolgte nach 6 d. CUDC-101 inhibierte die Proliferation aller GBM-Zellen unabhängig

*vom wtEGFR/EGFRvIII-Status der Zellen. Die Reduktion der Proliferation war immer signifikant stärker als durch Erlotinib. [*P < 0.05, t-test; Mittelwerte einer achtfach-Bestimmung $\pm$ SA; Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten]*

Die Behandlung mit dem kombinierten EGFR/HER2-HDAC-Inhibitor CUDC-101 führt bei allen Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Proliferation (Abbildung 47). Zudem war der inhibitorische Effekt von CUDC-101 bei den konventionell wachsenden Zelllinien U87MG, g55t2 (Abbildung 47 A) sowie bei den GS-Zelllinien 0627 (alle wtEGFR-amplifiziert und EGFRvIII-negativ), 0306 (wtEGFR-amplifiziert und EGFRvIII-negativ) (Abbildung 47 B) und GS-30 (wtEGFR-amplifiziert und EGFRvIII-negativ) (Abbildung 47 C), stets stärker als die Wirkung von Erlotinib. Lediglich bei einer CUDC-101 Konzentration 0,1 und 0,5 μ M war die Reduktion der Proliferation von GS-27-Zellen (wtEGFR-amplifiziert und EGFRvIII-positiv) im Vergleich zu Erlotinib-behandelten GS-27-Zellen, geringer (Abbildung 47 C). Somit führt eine Behandlung mit CUDC-101 bei allen Zelllinien und somit unabhängig vom wtEGFR/EGFRvIII-Status oder der Zellart (konventionell/GS) zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Proliferation.

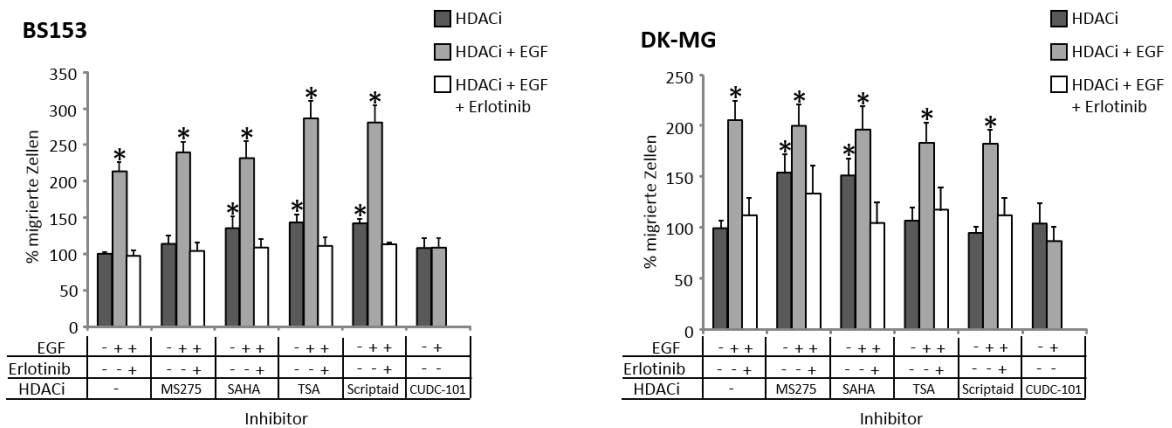
4.8.2 Einfluss von HDACi auf die Migration von GBM-Zellen

Da bekannt ist, dass die Überexpression von wtEGFR und EGFRvIII mit einem besonders invasiven und hoch migratorischen GBM-Phänotyp assoziiert ist (343, 344), sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine Behandlung mit den HDACi SAHA, Scriptaid, MS274 und TSA nicht nur zu einer Reduktion der Proliferation, sondern auch zu einer Inhibition der Migration führt.

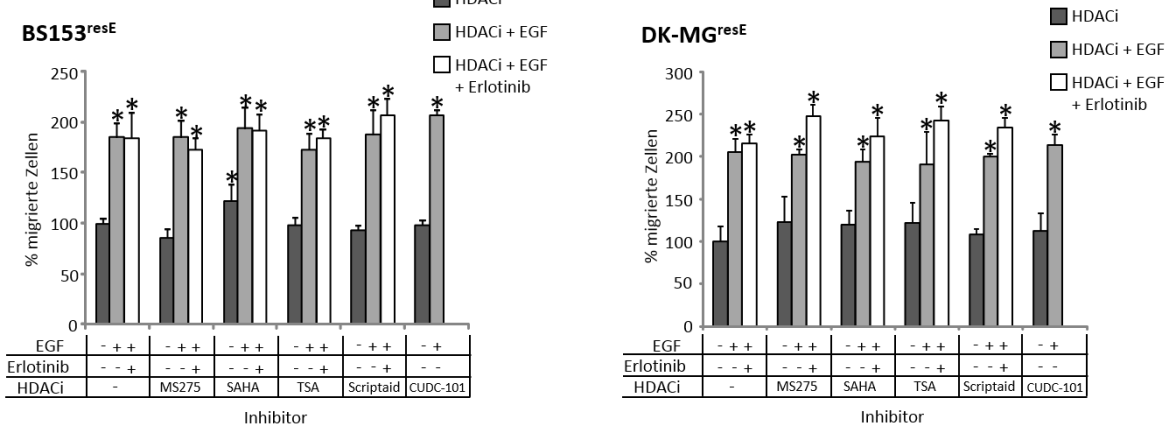
Weil BS153- und DK-MG-Zellen eine hohe bzw. eine moderate wtEGFR-Amplifikation zeigen und zudem EGFRvIII-exprimieren (Tabelle 17), wurden sie als GBM-Modellsystem für diesen Versuch gewählt. Um den Einfluss der wtEGFR-Amplifikation und der EGFRvIII-Expression auf die Versuchsergebnisse besser bestimmen zu können, wurden die folgenden Versuche zusätzlich mit U87MG- und 0627-Zellen (beide zeigen keine wtEGFR-Amplifikation oder EGFRvIII-Expression; vergleiche auch 4.8, Tabelle 17) durchgeführt. Vor dem Hintergrund der Versuche des Abschnitts 4.8.1, welche bereits zeigten, dass die Behandlung von BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zellen mit HDACi zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Erlotinib führte, sollte in einem weiteren Versuchsansatz zudem untersucht werden, ob sich dieser Effekt auch auf die Migration der Zellen übertragen lässt. Bei allen Versuchsansätzen wurde die Migrationsaktivität mit einem modifizierten Boyden Chamber Assay ermittelt, wobei die Messung der Migration über einen Zeitraum von 6 Stunden erfolgte. Es wurde sowohl die ungerichtete Migrationsaktivität der Zellen als auch die gerichtete Migration in Richtung des EGFR-Liganden

EGF (20 nM), sowie in An- und Abwesenheit von Erlotinib (10 μ M) bzw. von den HDACi Scriptaid, SAHA, MS275 und TSA oder dem kombinierten Inhibitor CUDC-101 (je 2 μ M) ermittelt.

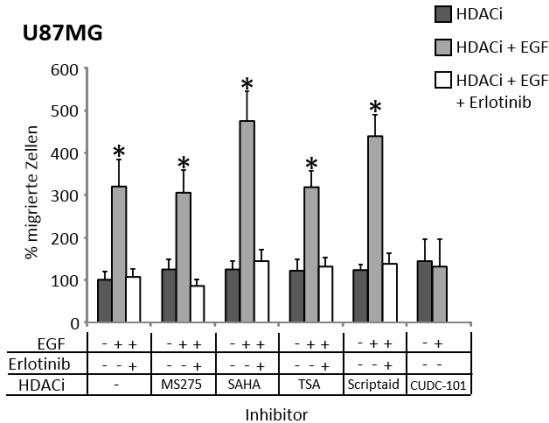
A



B



C



D

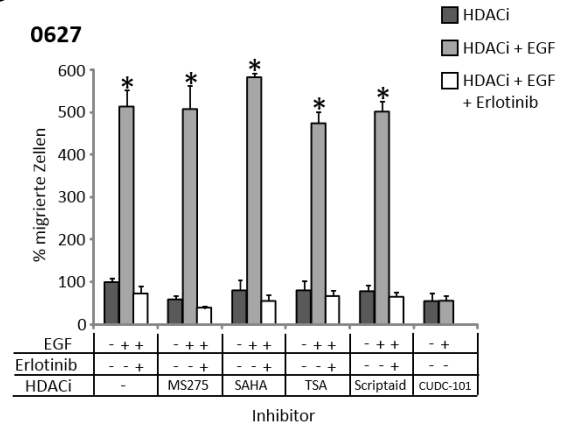


Abbildung 48 Einfluss einer HDACi-Behandlung auf die Migration von GBM-Zellen. BS153/BS153^{resE}-, DK-MG/DK-MG^{resE}-, U87MG- und 0627-Zellen wurden jeweils mit 2 μ M der HDACi MS275, SAHA, TSA oder Scriptaid, bzw. mit dem EGFR/HER2-HDACi CUDC-101 oder mit 10 μ M Erlotinib behandelt. Die Messung der EGF-gerichteten (20 nM) und der ungerichteten Migration erfolgte mit Hilfe eines modifizierten Boyden Chamber Assays und über einen Zeitraum von 6 h. (A)-(D) Die Behandlung mit HDACi hatte keinen Effekt auf die gerichtete- und ungerichtete-Migration parentaler und Erlotinib-resistenter GBM-Zellen. [Die Anzahl migrierter Zellen/10 high power field (hpf), *P < 0.05, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; Mittelwerte einer vierfach-Bestimmung Dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten]

Insgesamt zeigten alle untersuchten Zelllinien sowohl in An- als auch in Abwesenheit von HDACi eine starke EGF-gerichtete Migration (BS153- und DK-MG-Zellen, Abbildung 48 A; U87MG- und 0627-Zellen, Abbildung 48 C, D; BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zellen, Abbildung 48 B). Durch die Behandlung mit Erlotinib konnte die Migration aller parentalen Zelllinien jedoch wieder auf ein basales Niveau gesenkt werden ((BS-, DK-MG, U87MG- und 0627-Zellen; Abbildung 48 A, C, D). Die EGF-gerichtete Migration von BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zellen wurde durch Erlotinib hingegen nicht beeinträchtigt (Abbildung 48 B).

Die Behandlung mit MS275 führte bei gleichzeitiger Behandlung mit Erlotinib, verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen, überraschenderweise zu einer Steigerung der ungerichteten Migration von DK-MG-Zellen (Abbildung 48 A) sowie zu einem Anstieg der EGF-gerichteten Migration von DK-MG^{resE}-Zellen (Abbildung 48 B). Bei allen anderen Zelllinien führt die Behandlung mit MS275 zu keiner Beeinflussung der Migration.

Unerwarteterweise führte die Behandlung mit SAHA ebenfalls zu einer Stimulation der ungerichteten Migration von BS153- und DK-MG-Zellen (Abbildung 48 A) sowie von BS153^{resE}-Zellen (Abbildung 48 B). Auf die Migration von DK-MG^{resE}- (Abbildung 48 B), U87MG- (Abbildung 48 C) und 0627-Zellen (Abbildung 48 D) hatte SAHA hingegen keinen Einfluss.

Ein Ähnliches Bild zeigte sich für TSA und Scriptaid, welche die Migration von parental BS153-Zellen (Abbildung 48 A) stimulierten. Auf die Migration aller anderen Zelllinien, hatten TSA und Scriptaid hingegen keinen Einfluss (Abbildung 48 A-D).

Während die Behandlung mit dem kombinierten EGFR/HER2-HDACi CUDC-101 die ungerichtete Migration der untersuchten Zelllinien nicht beeinflusste (Abbildung 48 A-D), führte die Behandlung mit CUDC-101 zu einer signifikanten Reduktion der EGF-gerichteten Migration von BS153- und DK-MG-Zellen (Abbildung 48 A) sowie von U87MG- (Abbildung 48 C) und 0627-Zellen (Abbildung 48 D). Auf die gerichtete Migration von BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zellen, hatte CUDC-101 hingegen keinen Einfluss (Abbildung 48 B).

4.8.3 Einfluss von HDACi auf den wtEGFR/EGFRvIII- und den Histonacetylierungs-Status von GBM-Zellen

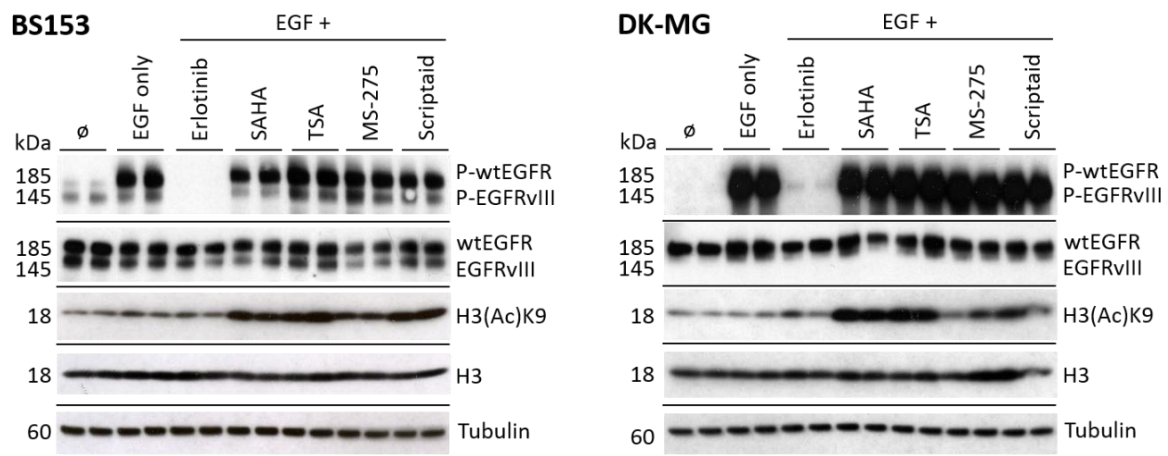
In den Abschnitten 4.8.1 und 4.8.2 konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von GBM-Zellen mit HDACi zu einer Inhibition der Proliferation, nicht aber zur einer Reduktion der Migration führte. Um den Einfluss der HDACi auch den EGFR-Status der Zellen zu bestimmen, sollten im Folgenden sollten die akuten und langfristigen Auswirkungen einer HDACi-Behandlung auf die Expression und Aktivität von wtEGFR und EGFRvIII (Phosphorylierung von Y1068), sowie auf die

Acetylierung von Histonen 3 [Histon 3 (H3)/Acetylierter Lysinrest 9 des Histons 3 (H3(Ac)K9)] im Western Blot untersucht werden.

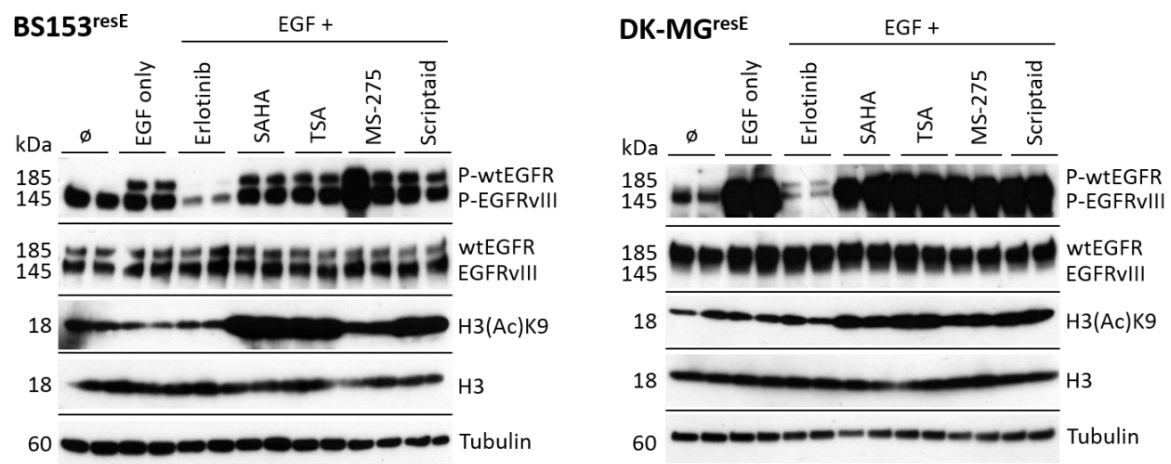
4.8.3.1 Akute Auswirkungen einer HDACi-Behandlung auf den wtEGFR/EGFRvIII- und den Histonacetylierungs-Status von GBM-Zellen

Um den Einfluss einer akuten HDACi-Behandlung auf die Expression und die Aktivität von wtEGFR und EGFRvIII sowie auf die Acetylierung des Histons 3 an Position K9 zu untersuchen, wurden BS153/BS153^{resE}-, DK-MG/DK-MG^{resE}- sowie U87MG- und 0627-Zellen für 4 Stunden mit den HDACi SAHA, Scriptaid, TSA oder MS275, bzw. mit der TKI Erlotinib oder dem kombinierten EGFR/HER2-HDACi CUDC-101 behandelt (10 μ M). 15 min vor der Zelllyse wurden die Zellen zudem mit EGF (20 nM) stimuliert.

A



B



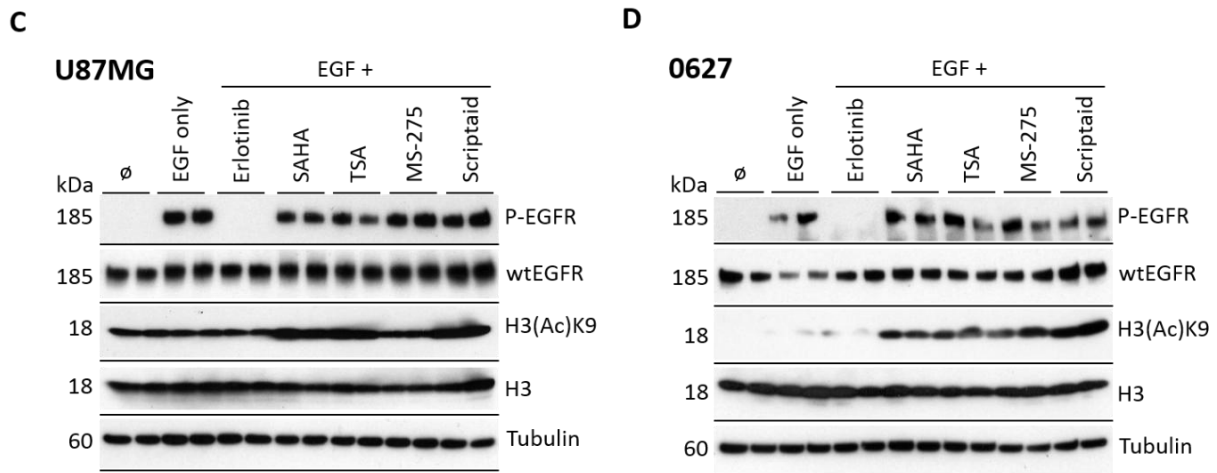


Abbildung 49 Effekt einer HDACi-Behandlung auf den wtEGFR/EGFRvIII-Status und die Histon-Acetylierung von GBM-Zellen. BS153/BS153^{resE}-, DK-MG/DK-MG^{resE}-, U87MG- und 0627-Zellen wurden für 4 h mit den HDACi SAHA, TSA, MS275 oder Scriptaid (je 10 µM) und EGF (20 nM, 15 min) behandelt. (A)-(D) Alle HDACi induzierten die Acetylierung von H3K9 (H3(Ac)K9), beeinflussten aber weder die Expression noch die Phosphorylierung des wtEGFR oder des EGFRvIII (P-wtEGFR: Position Y1068, P-EGFRvIII: Position Y1068). Der Effekt von MS275 war bei allen Zelllinien am geringsten. [Ladekontrolle: Tubulin, dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten]

Es konnte gezeigt werden, dass alle HDACi in der Lage waren eine gesteigerte Acetylierung des Lysinrests 9 von Histon 3 (H3K9) zu induzieren (Abbildung 49 A-D). Auffällig war hierbei, dass der durch MS275-induzierte Effekt bei allen Zelllinien geringer war, als die durch SAHA, Scriptaid oder TSA bewirkte Histonacetylierung (Abbildung 49 A-D). Die Untersuchung des wtEGFR/EGFRvIII-Status zeigte jedoch, dass keiner der getesteten HDACi die Expression der Rezeptoren oder ihre Aktivität in dem untersuchten Versuchszeitraum beeinflusste (Abbildung 49 A-D).

Ebenso wie die HDACi konnte CUDC-101 die Expression von wtEGFR und EGFRvIII nicht beeinflussen. Eine Behandlung mit dem Kombinierten Inhibitor führte hingegen in allen Fällen zu einer signifikanten Induktion der H3 Acetylierung (H3K9) (Abbildung 50 A-D) und bemerkenswerterweise auch zu einer vollständigen Unterbindung der wtEGFR und EGFRvIII Phosphorylierung (Abbildung 50 A-D). Einzig in DK-MG^{resE}-Zellen konnte nach erfolgter CUDC-101-Behandlung eine geringe Menge an phosphoryliertem wtEGFR und EGFRvIII detektiert werden (Abbildung 50 B). Dennoch war die Inhibition der wtEGFR/EGFRvIII-Aktivität in diesen Zellen durch CUDC-101 effektiver als durch den Erlotinib, was sich auch bei einem Vergleich von Erlotinib- und CUDC-101-behandelten BS153^{resE}-Zellen zeigte (Abbildung 50 B).

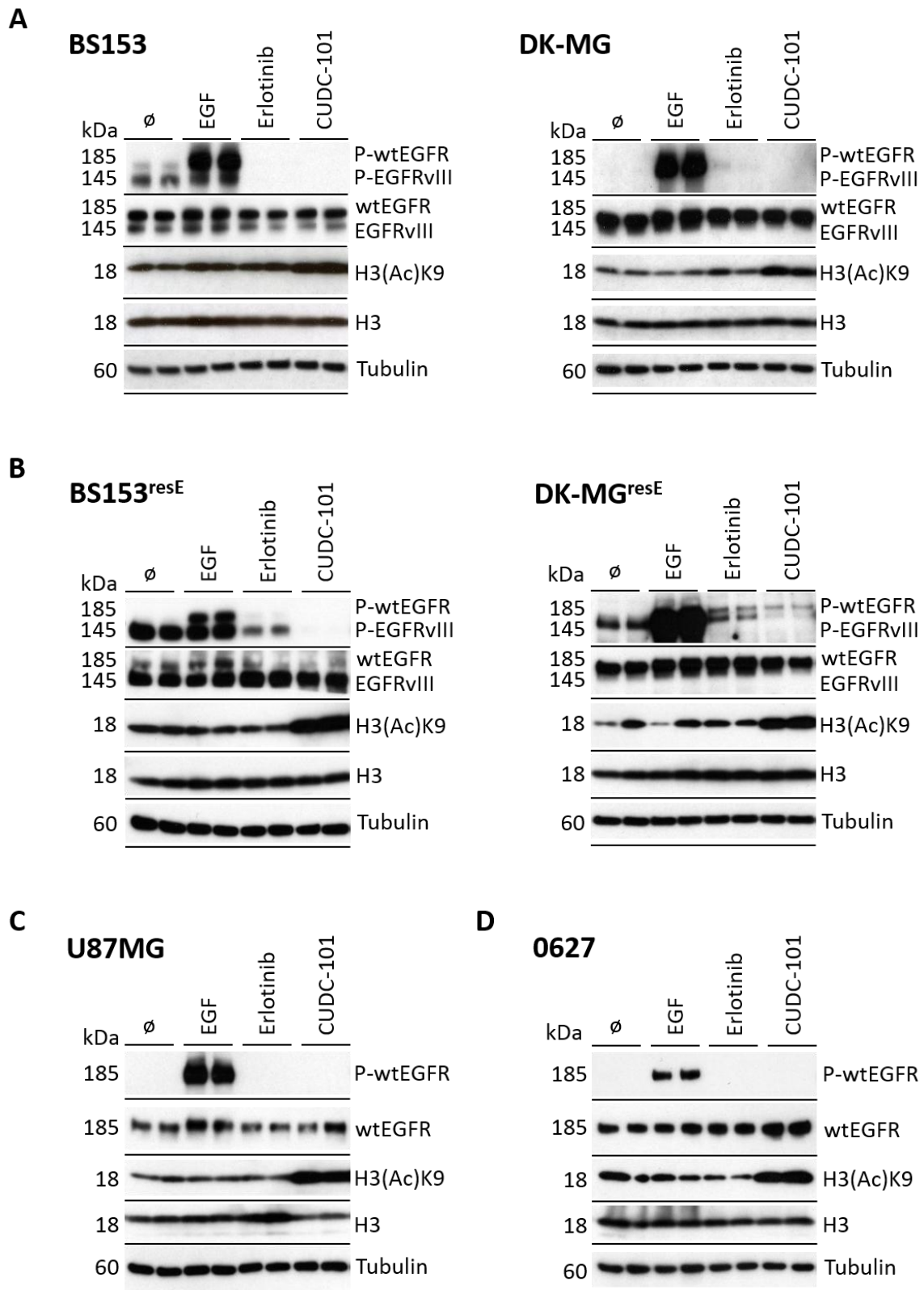


Abbildung 50 Effekt einer CUDC-101-Behandlung auf den wtEGFR/EGFRvIII-Status und die Histon-Acetylierung von GBM-Zellen. BS153/BS153^{resE}-, DK-MG/DK-MG^{resE}-, U87MG- und 0627-Zellen wurden für 4 h mit dem EGFR/HER2-HDACi CUDC-101, Erlotinib (10 μ M) oder EGF (20 nM, 15 min) behandelt. (A)-(D) CUDC-101 inhibierte die Aktivierung von wtEGFR und EGFRvIII in BS153/BS153^{resE}-, DK-MG-, U87MG- und 0627-Zellen. Lediglich in DK-MG^{resE} Zellen konnte eine geringe wtEGFR/EGFRvIII-Phosphorylierung (P-wtEGFR: Position Y1068, P-EGFRvIII: Position Y1086) nachgewiesen werden. In allen Fällen war CUDC-101 effektiver als Erlotinib. Zudem induzierte CUDC-101 in allen Zelllinien die Acetylierung von H3K9. [Ladekontrolle: Tubulin, dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten]

4.8.3.2 Langfristige Auswirkungen einer HDACi-Behandlung auf den wtEGFR/EGFRvIII- und den Histonacetylierungs-Status von GBM-Zellen

Im zweiten Teil des Abschnitts 4.8.3 sollten die langfristigen Auswirkungen einer HDACi-Behandlung auf die Transkription und Translation sowie auf Aktivität von wtEGFR/EGFRvIII und den Acetylierungsstatus von Histon untersucht werden. Da eine 3 bzw. 6tägige Behandlung mit dem HDACi SAHA zwar zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation führte, jedoch immer noch genügend vitale Zellen vorhanden waren um eine Proliferationsaktivität zu messen (Abschnitt 4.8.1) wurden die folgenden Versuche exemplarisch mit dem HDACi SAHA durchgeführt. Neben BS153- und BS153^{resE}-Zellen wurden auch GS-27- und GS-30-Zellen für 144 Stunden mit SAHA behandelt. Um möglichst viele Informationen über den zeitlichen Verlauf zu erhalten, wurden alle Zellen 24, 48, 72 und 144 Stunden nach der Stimulation mit dem HDACi untersucht (Abbildung 51).

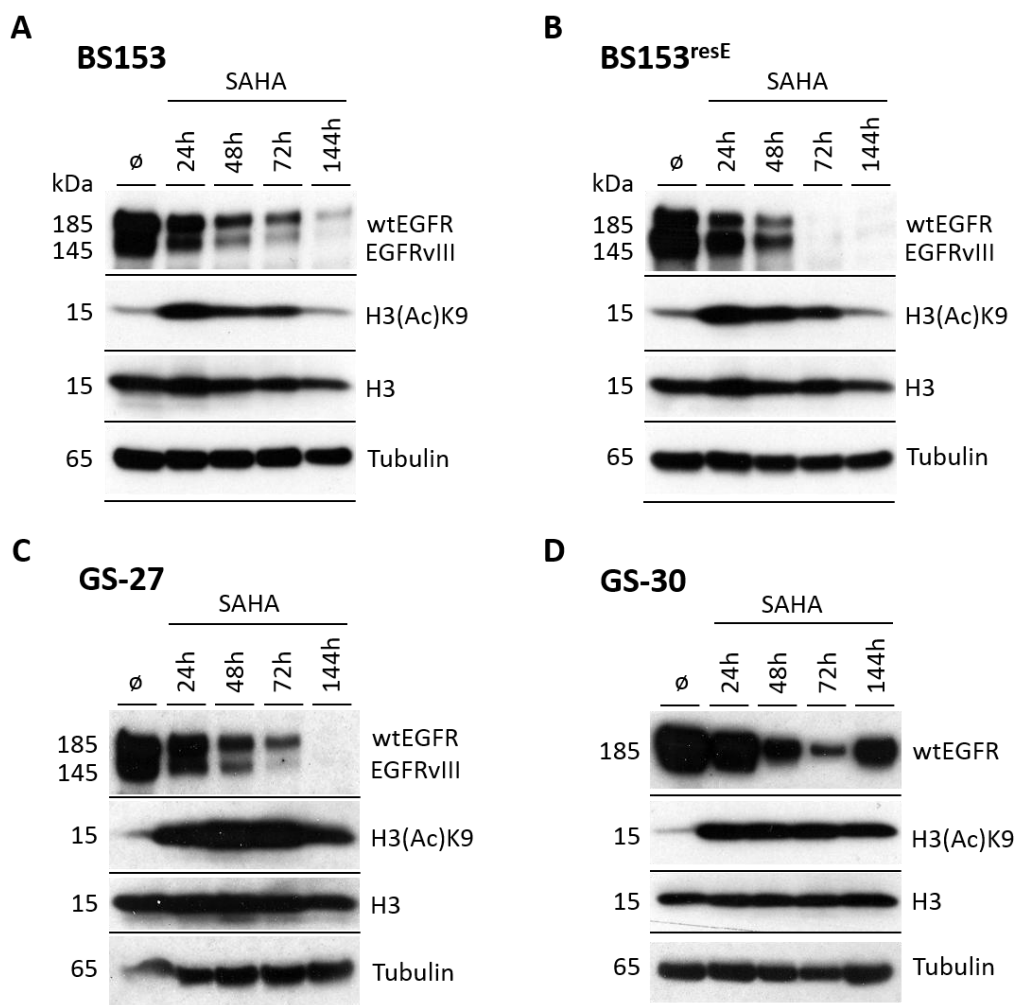


Abbildung 51 Langfristige Auswirkungen einer SAHA-Behandlung auf den wtEGFR/EGFRvIII-Status und die Histon-Acetylierung von GBM-Zellen. Western Blot von BS153/BS153^{resE}-, GS-27- und GS-30-Zellen welche für 24, 48, 72 und 144 h mit SAHA (2 µM) behandelt wurden. (A)-(D) SAHA induzierte die Acetylierung von H3(Ac)K9 bereits nach 24 h und führte zu einer deutlichen Herunterregulation der wtEGFR- und EGFRvIII-Expression. [Ladekontrolle: Tubulin, dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten]

Wie bereits im Abschnitt 4.8.3.1 (Abbildung 49) für einen Behandlungszeitraum von 4 Stunden gezeigt, induzierte SAHA auch über einen Zeitraum von 6 Tagen in allen Zelllinien die Acetylierung von Histon 3 [H3(Ac)K9, Abbildung 51]. Mit Ausnahme von GS-30-Zellen (Abbildung 51 D) konnte nach 144 Stunden jedoch eine Abnahme der H3K9 Acetylierung, und somit der inhibitorischen Wirkung von SAHA beobachtet werden (Abbildung 51 A-C). Interessanterweise wurde die Expression des wtEGFR und des EGFRvIII bereits 24 Stunden nach Behandlungsbeginn deutlich herunterreguliert (Abbildung 51 A-D). In BS153^{resE}-Zellen (Abbildung 51 B) konnten die Expression der beiden EGF-Rezeptoren durch SAHA nach 72 Stunden und in BS153- (Abbildung 51 A) und GS-27-Zellen (Abbildung 51 C) nach 144 Stunden nahezu vollständig unterbunden werden. Ein anderes Bild zeigte sich hingegen bei GS-30-Zellen (Abbildung 51 D). Hier nahm die Menge des wtEGFR ebenfalls bereits nach 24 Stunden deutlich ab, erreichte jedoch nach 72 Stunden ihr Minimum bevor sie nach 144 Stunden wieder deutlich zunahm.

Um zu untersuchen ob die beobachtete Herunterregulation der wtEGFR- und EGFRvIII-Expression auf translationalen oder aber auf transkriptionalen Regulationsmechanismen beruhte, wurde die wtEGFR- und EGFRvIII-RNA-Menge von SAHA-behandelten BS153- und BS153^{resE}-Zellen mittels quantitativer PCR-Analysen ermittelt. Es konnte gezeigt, dass die Menge der wtEGFR- und der EGFRvIII-RNA infolge einer Behandlung mit SAHA (24 Stunden 5 μ M) in parentalen (Abbildung 52 A) und Erlotinib-resistenten BS153-Zellen (Abbildung 52 B) signifikant abnahm. Während in BS153-Zellen die Menge der EGFRvIII-RNA stärker Herunterreguliert wurde, führte die Behandlung mit SAHA in BS153^{resE}-Zellen zu einer stärkeren Reduktion der wtEGFR-RNA Menge.

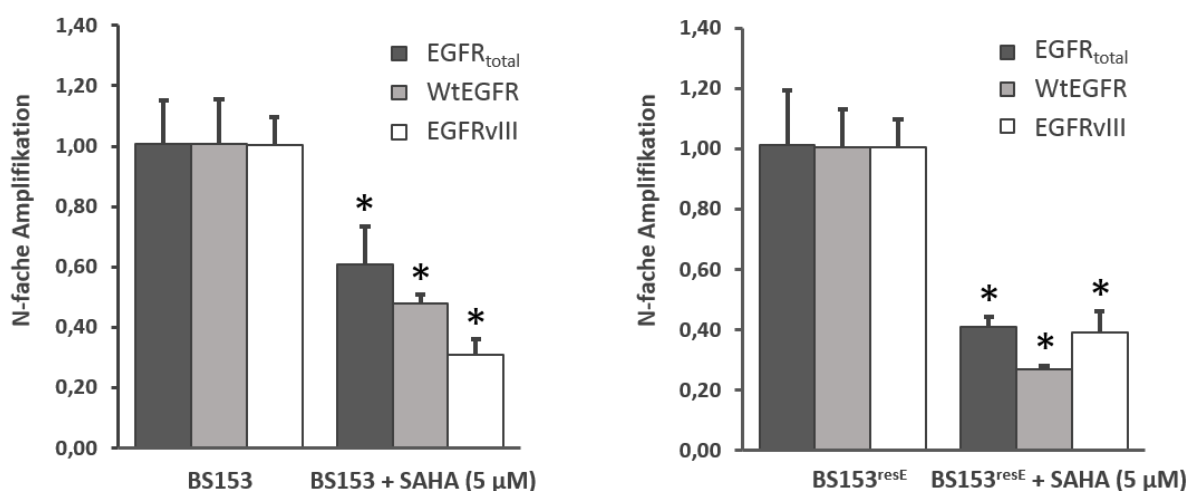


Abbildung 52 Auswirkungen einer SAHA-Behandlung auf die wtEGFR- und EGFRvIII-mRNA Menge in BS153- und BS153^{resE}-Zellen. PCR-Analyse der wtEGFR- und EGFRvIII-mRNA Menge von SAHA-behandelten (24 h, 5 μ M) BS153- und BS153^{resE}-Zellen. (A) Die Behandlung mit SAHA führte sowohl in BS153-Zellen als auch in (B) BS153^{resE}-Zellen zu einer Reduktion der wtEGFR- und EGFRvIII-mRNA Menge. [t-test, *P < 0.05; Mittelwerte einer vierfach-Bestimmung $\pm$ SA; dargestellt ist eines von drei unabhängigen Experimenten]

5 Diskussion

5.1 Wirkung von Erlotinib, Gefitinib und Cetuximab auf BS153-Zellen

Der Signalweg des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) ist an der Steuerung unterschiedlichster zellulärer Prozesse wie der Migration und der Proliferation beteiligt und insbesondere für die Pathogenese von EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden GBM von zentraler Bedeutung. Vor diesem Hintergrund stellen wtEGFR und EGFRvIII sowie die Signalproteine der EGFR-vermittelten Signaltransduktion, vielversprechende Ziele bei der Entwicklung neuer GBM-Therapien dar. In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe unterschiedlichster EGFR-gerichteter Therapien entwickelt und bereits in klinischen Studien zur Behandlung von GBM getestet. Zu den bekanntesten Therapeutika zählen EGFR- bzw. EGFRvIII-spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) wie Erlotinib und Gefitinib, oder monoklonale Antikörper (mAK) wie Cetuximab. Leider führte die Behandlung von Patienten mit den genannten Therapeutika aufgrund der intra- und intermolekulare Heterogenität von GBM, der Entwicklung von Resistenzen und des mangelhaften Penetrationsvermögens der Therapeutika, bisher nicht zu dem erwarteten Erfolg (198, 200, 336).

Im Gegensatz zu enttäuschenden klinischen Daten, lieferten präklinische Studien mit EGFR-spezifischen TKI und mAK vielversprechende Ergebnisse. Ein Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte die Wahl inadäquater *in vitro*-Modellsysteme sein. Da primäre GBM-Zellen in der Regel sobald sie *in vitro* kultiviert werden, ihre EGFR-Amplifikation und somit auch ihre EGFRvIII-Expression verlieren (337), wurden in der Vergangenheit die meisten *in vitro*-Studien mit ektopisch EGFR-überexprimierenden GBM-Modellsystemen (z.B. transfizierte U87MG-Zellen) durchgeführt. In jüngster Zeit konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Effekte einer ektopischen EGFR-Überexpression (z.B. durch Expressionsplasmide), von denen einer endogenen EGFR-Überexpression unterscheiden (323). Daher ist es wahrscheinlich, dass die positiven *in vitro*-Ergebnisse von EGFR-gerichteten Therapien, welche durch Versuche mit ektopisch EGFR-überexprimierenden GBM-Modellsystemen erlangt wurden, nicht repräsentativ für den ursprünglichen Tumor sind. Eine Möglichkeit, diese Problematik zu umgehen, stellt die direkte Verwendung von humanem GBM-Resektionsmaterial für Xenograft-Versuche in immundefizienten Mäusen oder Ratten dar. Hierbei bleibt die natürliche EGFR-Amplifikation und die Expression von EGFRvIII *in vivo* erhalten, allerdings ist diese Methode mit einem hohem Aufwand verbunden und nur schwer zu standardisieren (231, 337). Anders als die meisten GBM-Zelllinien, welche ihre EGFR-Amplifikation in der Regel *in vitro* verlieren, weist die gut charakterisierte Gliomzelllinie SMKG-3 eine mäßig starke Amplifikation (8fach) des EGFR-Gens

auf. Da SMKG-3-Zellen jedoch kein EGFRvIII exprimieren (345) und in Nacktmäusen nicht tumorigen sind (323), eignen sie sich nur bedingt als Modellsystem für EGFR-amplifizierte GBM. Im Gegensatz zu SMKG-3-Zellen weist die ursprünglich von Jones et al. beschriebenen BS153-Zelllinie (324) weisen eine etwa 50fache EGFR-Amplifikation auf. Da BS153-Zellen zudem EGFRvIII exprimieren, und in Nacktmäusen tumorigen sind, eignen sie sich hervorragend als Modellsystem für EGFR-amplifizierte und EGFRvIII-exprimierende GBM.

Zu Beginn dieser Arbeit sollten die Auswirkungen einer Behandlung mit den EGFR-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) Erlotinib und Gefitinib sowie mit dem ebenfalls EGFR-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAK) Cetuximab, auf die Proliferation, Migration und die EGFR-vermittelte Signaltransduktion endogen EGFR-überexprimierender GBM-Zellen untersucht werden. Hierzu wurde die GBM-Zelllinie BS153 verwendet, welche erst in jüngster Zeit in den Fokus der Forschung gerückt ist (253, 346). Die Behandlung von BS153-Zellen mit den TKI Erlotinib und Gefitinib führte nicht nur zu einer konzentrationsabhängig Inhibition der Proliferation (Abschnitten 4.1.1, Abbildung 15), sondern auch zu einer signifikanten Reduktion der Migration (Abschnitten 4.1.2, Abbildung 16), wobei sich Gefitinib in beiden Fällen als effizienter erwies als Erlotinib. Interessanterweise zeigten BS153-Zellen bei einer Behandlung mit 0,5 µg/ml Erlotinib nach 144 Stunden einen leichten Anstieg der Proliferation (Abbildung 15 A). Dies deutet auf einen adaptiven Mechanismus von BS153-Zellen gegenüber dem TKI hin, welcher es ihnen erlaubt, auch in Anwesenheit von Erlotinib zu proliferieren. Dieses Phänomen konnte bei Gefitinib-behandelten Zellen nicht beobachtet werden.

Ein Grund für die nicht vollständige Inhibition der Zellmigration durch die beiden TKI zeigte sich bei der Untersuchung der Auswirkungen einer Erlotinib- und Gefitinib-Behandlung auf die Aktivierung von wtEGFR und EGFRvIII (Abschnitt 4.1.3, Abbildung 17). Beide Inhibitoren waren zwar in der Lage, die Phosphorylierung von wtEGFR zu inhibieren, die Phosphorylierung von EGFRvIII wurde durch die beiden TKI hingegen nur marginal beeinflusst. Diese Ergebnisse bestätigten frühere Beobachtungen von Erlotinib-behandelten stammzellähnlichen Gliomzellen, bei welchen ebenfalls eine Inhibition der wtEGFR-Phosphorylierung, nicht aber der EGFRvIII-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (323). Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu Beobachtungen von Learn et al. welche zeigen konnte, dass eine Behandlung mit Gefitinib in einer Inhibition der EGFRvIII-Phosphorylierung resultiert (347). Da diese jedoch auf Experimenten mit ektopisch EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen beruhen, verdeutlichen sie einmal mehr, dass sich die Effekte einer ektopischen EGFR-Überexpression von denen einer endogenen Überexpression signifikant unterscheiden können und stellt die

Bedeutung von Gliom-Modellsystemen, welche auf einer ektopischen EGFR- oder EGFRvIII-Expression beruhen in Frage.

Neben der Wirkung von Erlotinib und Gefitinib auf die Phosphorylierung von wtEGFR und EGFRvIII wurden auch die Auswirkungen einer Behandlung mit den beiden TKI auf die wtEGFR/EGFRvIII-vermittelte Signaltransduktion untersucht (Abschnitt 4.1.3, Abbildung 17). Es zeigte sich, dass Erlotinib und Gefitinib die wtEGFR/EGFRvIII-vermittelte Signaltransduktion lediglich reduzierten. Dies ist vermutlich zum einen auf die nur marginale Beeinflussung des EGFRvIII-Phosphorylierungsstatus durch die beiden TKI und zum anderen auf die Aktivierung der Signalproteine durch andere RTK zurückzuführen. Interessanterweise zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Spezifität der inhibitorischen Wirkung von Erlotinib und Gefitinib. Während Erlotinib die Phosphorylierung von Erk stärker reduzierte als Gefitinib, inhibierte dieses im Gegenzug die Aktivierung von Akt deutlich effektiver als Erlotinib. Der große Einfluss von Gefitinib auf die Phosphorylierung von Akt konnte bereits in verschiedenen Lungenkrebs-Zelllinien beobachtet werden, deren Sensitivität gegenüber Gefitinib stark mit der Abhängigkeit vom PI3k-Akt-Signalweg korrelierte (348). Vermutlich ist die im Vergleich zu Erlotinib, stärkere inhibitorische Wirkung von Gefitinib auf die Phosphorylierung von Akt auch verantwortlich für die effizientere Inhibition der Proliferation und Migration durch Gefitinib (Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2). Diese Beobachtung ist zudem ein Indiz dafür, dass der PI3K-Akt-Signalweg vermutlich einen stärkeren Einfluss auf die Proliferation und Migration von EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-positiven GBM-Zellen ausübt als der Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg.

Neben den Auswirkungen einer TKI-Behandlung, wurden auch die Folgen einer Cetuximab-Behandlung auf die Proliferation, Migration und die EGFR-vermittelte Signaltransduktion von BS153-Zellen untersucht (Abschnitt 4.1). Anders als Erlotinib und Gefitinib inhibiert der mAK Cetuximab kompetitiv die Bindung von EGFR-Liganden an den Rezeptor. Im Gegensatz zu den TKI konnte Cetuximab die Proliferation von BS153-Zellen jedoch nicht inhibieren (Abschnitt 4.1.1, Abbildung 15) und führte in Abwesenheit von EGF sogar zu einer leichten Stimulation der Migration (Abschnitt 4.1.2, Abbildung 16). Die Untersuchung der wtEGFR/EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion zeigte ferner, dass Cetuximab die Phosphorylierung von wtEGFR nicht inhibierte sondern vielmehr eine gesteigerte EGFRvIII, Akt und Erk Phosphorylierung *in vitro* bewirkte (Abschnitt 4.1.3, Abbildung 17).

Da Cetuximab nicht in der Lage war die Proliferation von BS153-Zellen zu inhibieren und sogar zu einer Stimulation der Migration führte, scheint die Behandlung mit Cetuximab eine

Rezeptoraktivierung und infolgedessen eine gesteigerte EGFR-Signaltransduktion zu bewirken. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Beobachtungen welche zeigten, dass die Akt-abhängige Signaltransduktion in Cetuximab behandelten SKMG-3-Zellen weiterhin aktiv ist (116). Zudem führte eine Cetuximab Behandlung der NSCLC-Zelllinie H292 zu einer gesteigerten Phosphorylierung von wtEGFR (349). Die erhöhte Phosphorylierung von EGFRvIII in Cetuximab-behandelten BS153-Zellen deckt sich zudem mit der Beobachtung, dass Cetuximab in EGFRvIII-transfizierten U373-Gliomzellen an EGFRvIII bindet und eine gesteigerte Phosphorylierung des Rezeptors bewirkt (350). Ein weiterer möglicher Grund für die erhöhte Phosphorylierung von EGFRvIII könnte eine Phosphorylierung des Rezeptors durch den wtEGFR sein, welche von Fan et al. in wtEGFR/EGFRvIII-Heterodimeren in ektopisch EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen beobachtet werden konnte (185). *In vivo*-Xenograft-Versuche mit humanem GBM-Resektionsmaterial zeigten ferner, dass Cetuximab die Proliferation von EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden Xenografttumoren, nicht aber die Proliferation von Tumoren ohne EGFR-Amplifikation inhibierte (351-353). Somit scheint die Mikroumgebung *in vivo* für den anti-Tumor-Effekt von Cetuximab von entscheidender Bedeutung zu sein. Zudem legen die beschriebenen Beobachtungen nahe, dass eine Cetuximab vermittelte, Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) und nicht die direkte Unterbindung der EGF-EGFR-Interaktion für die Wirkung von Cetuximab in Xenograft-Versuchen verantwortlich sein könnte (354, 355).

5.2 Chronische Behandlung von BS153-Zellen mit TKI: Etablierung einer Erlotinib-resistenten Zelllinie

Ein großes Problem bei der Behandlung von GBM stellt die Entwicklung von Resistenzen dar. Um festzustellen, ob es sich bei der zuvor beobachteten inhibitorischen Wirkung von Erlotinib auf Proliferation und Migration der EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden BS153-GBM-Zelllinie (Abschnitt 4.1) um einen temporäreren oder permanenten Effekt handelt, wurden BS153-Zellen dauerhaft mit dem TKI behandelt (Abschnitt 4.2). Da BS153-Zellen auch nach mehreren Passagen in Gegenwart von Erlotinib stabil proliferierten, bildete sich durch die permanente Behandlung mit dem TKI eine Erlotinib-resistente Zelllinie (BS153^{resE}) aus. Eine Gefitinib-tolerante Zelllinie konnte hingegen selbst bei deutlich niedrigeren Konzentrationen des Inhibitors (0,5 µg/ml) nicht generiert werden. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen

Effekte der beiden TKI könnte die unzureichende Inhibition der Akt-Phosphorylierung durch Erlotinib sein (Abschnitt 4.1.3, Abbildung 17).

Interessanterweise zeigte die Behandlung von BS153^{resE}-Zellen mit Gefitinib, dass die Erlotinib-resistenten Zellen sensitiv gegenüber einer Gefitinib-Therapie waren (Abschnitt 4.2, Abbildung 18). Obwohl Erlotinib und Gefitinib eine ähnliche chemischen Struktur besitzen und kompetitiv in der ATP-Bindungstasche der Tyrosinkinase-Domäne des EGFR binden (127, 356), deuten die beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass Erlotinib und Gefitinib in EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus haben. Belegt wird dies auch durch die Beobachtung, dass durch die Behandlung mit Gefitinib eine stärkere Inhibition der Proliferation und Migration von BS153-Zellen induziert werden konnte als durch eine Erlotinib-Behandlung (Abschnitts 4.1). Zudem konnte gezeigt werden, dass Gefitinib die Phosphorylierung von Akt stärker inhibierte als Erlotinib, wohingegen Erlotinib einen größeren Einfluss auf die Reduktion der Erk-Phosphorylierung hatte. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Beobachtung, dass Gefitinib, nicht aber Erlotinib in der Lage ist, die Proliferation von wtEGFR/EGFRvIII-negativen Kolorektalkrebszellen zu inhibieren (357). Ein weiteres Beispiel für die Unterschiedliche Wirkung von Erlotinib und Gefitinib zeigt sich bei der Behandlung von Lungenkebspatienten mit aktivierender EGFR-Mutation. Die Erstlinientherapie dieser Patienten sieht zunächst eine Behandlung mit Gefitinib vor. Sollte es jedoch zu einem erneuten relevanten Wachstum des Tumors oder dem Auftreten von nicht akzeptablen Nebenwirkungen kommen, wird die Therapie der Patienten in der Regel auf Erlotinib umgestellt (358). Da zudem, gezeigt werden konnte, dass Gefitinib auch an andere RTK wie RIPK2 (Receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2), BLK (B-cell lymphocyte tyrosine kinase) oder JNK2 (c-Jun n-terminal protein kinase 2) bindet (359), spielen weitere EGFR-unspezifische Zielrezeptoren der TKI, vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der unterschiedlichen Wirkung von Erlotinib und Gefitinib. Ein weiterer Grund für die stärkere Inhibition durch Gefitinib könnte zudem eine Veränderung des Zielproteins sein. Ein Beispiel hierfür sind Lungenkrebspatienten mit einer aktivierenden Mutation in der EGFR-Tyrosinkinasedomäne, welche besonders gut auf eine Behandlung mit Gefitinib ansprechen (360). Da solch eine Mutation in GBM bisher jedoch nicht beobachtet werden konnte (361), scheidet diese als Ursache für die unterschiedliche Wirkweise von Erlotinib und Gefitinib vermutlich aus.

5.3 Charakterisierung des wtEGFR- und EGFRvIII-Status in Erlotinib-resistenten BS153-Zellen (BS153^{resE})

Um die molekularen Mechanismen der Erlotinib-Resistenz von BS153^{resE}-Zellen besser zu verstehen, wurde sowohl die Morphologie, als auch der wtEGFR/EGFRvIII-Status von BS153- und BS153^{resE}-Zellen untersucht und miteinander verglichen (Abschnitt 4.3). Bei der lichtmikroskopischen Analyse der Zellmorphologie konnten keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien beobachtet werden (Abschnitt 4.3.1, Abbildung 19).

Die Untersuchung der RTK-Aktivität der ErbB-Familie mittels RTK-Array zeigte, dass lediglich die Aktivierung von ErbB3 in BS153^{resE}-Zellen geringer war als in BS153-Zellen, wohingegen sich die Aktivität von ErbB1, ErbB2 und ErbB4 in den beiden Zelllinien nicht signifikant voneinander unterschied. Insgesamt war die Signalstärke von keinem getesteten RTK in BS153^{resE}-Zellen signifikant höher als in BS153-Zellen (Abschnitt 4.3.1, Abbildung 20). Somit führte die permanente Erlotinib Behandlung von BS153-Zellen zu keiner kompensatorischen Hochregulation der allgemeinen RTK-Aktivität.

Ein anderes Bild zeigte sich bei einem Vergleich der HER-Familien-Proteinexpression und -Phosphorylierung im Western Blot. Mit dieser Methode konnte in BS153^{resE}-Zellen verglichen mit BS153-Zellen insgesamt eine Herunterregulation der Expression und der Aktivität von Proteinen der HER-Familie (HER1- (wtEGFR), HER2- und HER3-Protein) beobachtet werden (Abschnitt 4.3.2, Abbildung 21). Die Diskrepanz zwischen den RTK-Array-Daten und der Western Blot Analyse sind vermutlich auf unterschiedliche Antikörper und eine geringere Spezifität des Arrays zurückzuführen.

Die Ergebnisse des RTK-Arrays und des Western Blots stehen im Widerspruch zu Beobachtungen von TKI-behandelten Tumorzellen anderer Tumorentitäten. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Behandlung von Kolorektalkrebszellen mit TKI zu einer gesteigerten Expression und Aktivität von HER2 führte (362). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für EGFR-spezifische mAK beobachtet werden. Clark et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Behandlung von GBM-Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften mit Cetuximab, eine kompensatorische Hochregulation der HER2- und HER3-Expression bewirkte (363). Wu et al. konnte ferner nachweisen, dass eine Behandlung von Kolorektalkrebszellen (DiFi) mit dem EGFR-spezifischen mAK Cetuximab (mAB 225) zu einer kompensatorischen Hochregulation von IGF-1 (insulin-like growth factor) und infolge dessen zu einer erhöhten Aktivität des IGF-1R (insulin-like growth factor-receptor) führte (364).

Im nächsten Schritt sollte der wtEGFR/EGFRvIII-Status der parentalen und Erlotinib-resistenten Zellen näher untersucht und miteinander verglichen werden. Während keine Unterschiede hinsichtlich der EGFR-Amplifikation (Abschnitt 4.3.3, Abbildung 22) und der EGFRvIII-mRNA in BS153- und BS153^{resE}-Zellen gemessen werden konnten, war die Menge an wtEGFR-mRNA in BS153^{resE}-Zellen signifikant geringer als in BS153-Zellen (Abschnitt 4.3.4, Abbildung 23) (Abbildung 53). Weitere Unterschiede zeigten sich bei einem Vergleich der Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie. Die permanente Behandlung von BS153-Zellen mit Erlotinib bewirkte nicht nur eine Abnahme der wtEGFR-Konzentration, sondern auch einen drastischen Anstieg der EGFRvIII-Expression (Abschnitt 4.3.5, Abbildung 24) (Abbildung 53). Somit ist die EGFRvIII-mRNA Menge in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu BS153-Zellen zwar unverändert, die EGFRvIII-Proteinexpression ist hingegen signifikant erhöht. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf eine translationale Regulation der EGFRvIII-Expression zurückzuführen. Die Analyse der wtEGFR/EGFRvIII-Expression mittels Durchflusszytometrie zeigte ferner, dass nur eine Subpopulation der parentalen BS153-Zellen EGFRvIII exprimiert, wohingegen nahezu alle wtEGFR-positiven BS153^{resE}-Zellen auch EGFRvIII exprimierten (Abschnitt 4.3.5, Abbildung 24). Die starke Hochregulation der EGFRvIII-Expression von BS153^{resE}-Zellen konnte im Western Blot bestätigt werden. Im Gegensatz zu den durchflusszytometrischen Analysen, zeigten sich bei einem Vergleich der wtEGFR-Expression von BS153- und BS153^{resE}-Zellen im Western Blot jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. (Abschnitt 4.3.5, Abbildung 25). Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass mittels Durchflusszytometrie lediglich alle membranständigen Proteine detektiert werden, wohingegen im Western Blot die Proteinmenge von Zelllysaten untersucht wird. Auf diese Weise werden im Western Blot nicht nur membranständige Proteine sondern auch die Gesamtproteinmenge von Zellen und somit beispielsweise auch in Vesikeln internalisierte Rezeptoren erfasst.

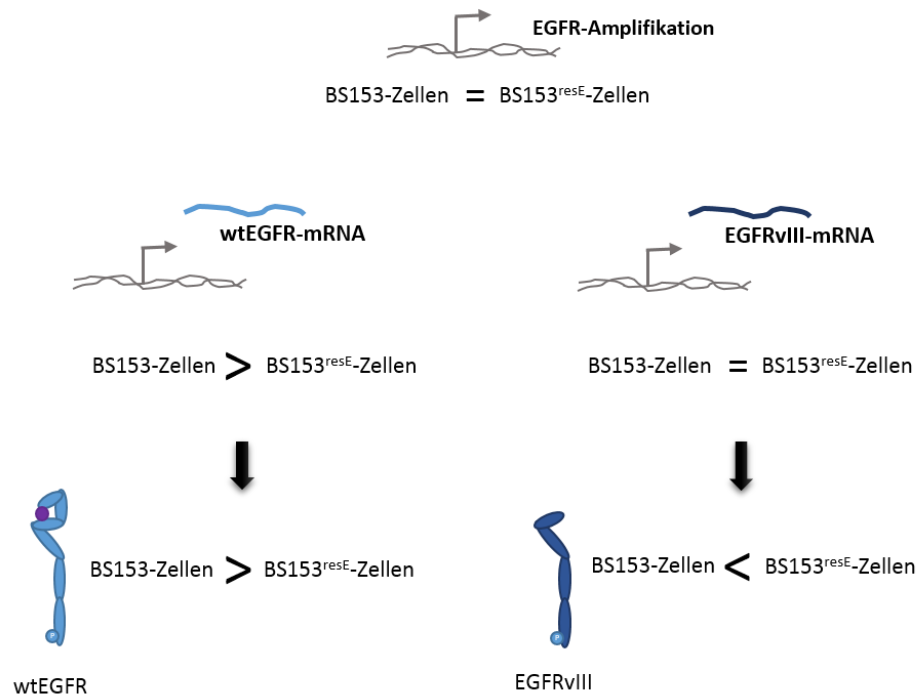


Abbildung 53 **wtEGFR/EGFRvIII mRNA- und Protein in BS153- und BS153^{resE}-Zellen.** Sowohl die mRNA-Menge als auch die Expression des wtEGFR ist in BS153^{resE}-Zellen geringer als in BS153-Zellen. Während die EGFRvIII-mRNA-Menge in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie unverändert ist, die Menge an aktivem EGFRvIII-Proteinen in BS153^{resE}-Zellen deutlich erhöht.

MACS-Experimente mit BS153^{resE}-Zellen und wtEGFR- bzw. EGFRvIII-Antikörpern zeigten, dass EGFRvIII in der Lage ist, mit wtEGFR-Heterodimere zu bilden (Abschnitt 4.3.5, Abbildung 26). EGFRvIII- oder wtEGFR-Homodimere können mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Somit konnte erstmals eine Heterodimerisierung von wtEGFR und EGFRvIII in einem endogen EGFR-amplifizierten, EGFRvIII-exprimierenden GBM-Modellsystem nachgewiesen werden. Die Bildung von wtEGFR-EGFRvIII-Heterodimeren in einem ektopisch wtEGFR und EGFRvIII exprimierenden System, konnte bereits von Luwor et al. in transfizierten BaF/3 (murine IL-3 dependent pro-B-cell line) Zellen beobachtet werden (184). Fan et al. konnte ferner in ektopisch wtEGFR- und EGFRvIII-exprimierenden LN-229 zeigen, dass der Liganden aktivierte wtEGFR in der Lage ist EGFRvIII zu phosphorylieren und auf diese Weise dessen Internalisierung und Translokalisierung in den Nukleus zu induzieren (185). Anders als Luwor konnte Fan jedoch keine physikalische Interaktion der beiden Rezeptoren nachweisen.

Insgesamt ist die Bedeutung von EGFRvIII hinsichtlich der Wirksamkeit einer Erlotinib-Therapie von Gliom-Patienten weiterhin umstritten. Einerseits konnte in einer Studie mit Erlotinib- oder Gefitinib-behandelten Gliomrezidiv-Patienten gezeigt werden, dass die Coexpression von EGFRvIII und PTEN ein positiver Indikator für den Therapieerfolg ist (167). Andererseits zeigte eine groß angelegte Phase II-Studie mit Erlotinib-behandelten GBM-Rezidiv-Patienten, dass keine positive Korrelation zwischen der Überlebensprognose und der Coexpression von EGFRvIII und

PTEN besteht (198). In einer weiteren Phase I-Studie mit Erlotinib-behandelten Gliomrezidiv-Patienten konnte ferner gezeigt werden, dass die Amplifikation und Überexpression des wtEGFR kombiniert mit einer geringen Akt-Phosphorylierung den Therapieerfolg positiv beeinflusst und ein hoher Phospho-Akt-Anteil folglich ein negativer Indikator für den Erfolg einer Erlotinib-Therapie EGFR-amplifizierter GBM ist. Da jedoch keiner der Studienteilnehmer EGFRvIII exprimierte, bleibt die Bedeutung der Beobachtungen für EGFRvIII-positive GBM weiterhin offen (365). Nathanson et al. konnten hingegen zeigen, dass die Behandlung von *in vitro*-GBM-Modellsystemen mit den EGFR-spezifischen TKI Erlotinib und Lapatinib sowie die Behandlung von GBM-Patienten mit Lapatinib, anders als bei BS153^{resE}-Zellen zu einem Verlust extrachromosomaler EGFRvIII-DNA und infolge dessen zu einer Abnahme EGFRvIII-exprimierender GBM-Zellen führte. Interessanterweise bewirkte die erneute Erlotinib-Behandlung der GBM-Zelllinien nach einer Behandlungspause, einen starken Anstieg der EGFRvIII-Expression und eine Erhöhung extrachromosomaler EGFRvIII-DNA (366).

5.4 Tumorinitiierungskapazität von BS153^{resE}-Zellen

Zur Evaluation der Tumorinitiierungskapazität von BS153^{resE}-Zellen *in vitro* und *in vivo*, wurden Kolonieformations-Assays und Xenograft-Experimente mit NMRI/Fox1^{nu} Nacktmäusen durchgeführt. Da die Kolonienbildung von BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu BS153-Zellen deutlich verzögert war, spricht dies für einen weniger aggressiven Phänotyp von BS153^{resE}-Zellen (Abschnitt 4.4.1, Abbildung 27). Diese Beobachtung bestätigte sich in Xenograft-Experimenten (Abschnitt 4.4.2). Auch hier bildeten Mäuse mit implantierten BS153^{resE}-Zellen signifikant später Tumore aus, als Mäuse mit BS153-Zellen (Abbildung 28). Histopathologisch unterschieden sich die Tumore resistenter und parentaler BS153-Zellen hingegen nicht (Abbildung 29). Die Untersuchung des wtEGFR- und EGFRvIII-Status zeigte, dass die Xenografttumorzellen alle Eigenschaften der ursprünglichen BS153- und BS153^{resE}-Zellen aufwiesen und somit den Phänotyp der Ursprungszellpopulation *in vivo* widerspiegeln. Dies belegt die Eignung von BS153-Zellen als Modellsystem für EGFR-amplifizierte und EGFRvIII-exprimierende GBM.

Ein Grund für die verzögerte Kolonien und Tumorbildung von BS153^{resE}-Zellen könnte in der verminderten Expression des wtEGFR liegen, dessen Expression eng mit der Aufrechterhaltung eines stammzellähnlichen Phänotyps verbunden ist. Mazzoleni et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Expression von wtEGFR eine Voraussetzung für die *in vitro*- und

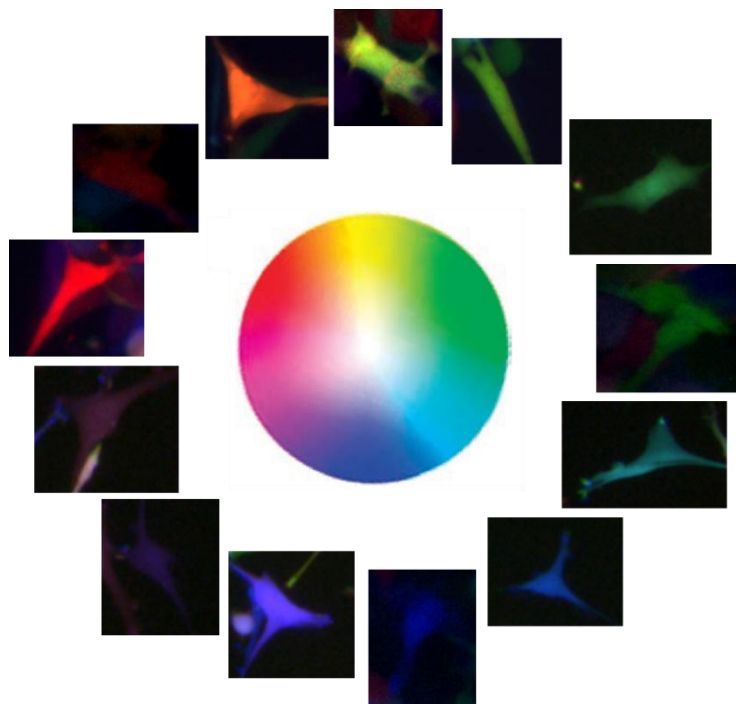
in vivo-Tumorigenität von primären GBM-Zelllinien und Tumorstammzelllinien (CSC) ist. Zudem konnte die Tumorigenität der untersuchten Zelllinien durch eine gesteigerte wtEGFR-Expression erhöht und durch eine verminderte Expression oder Inhibition der Rezeptoraktivität reduziert werden (322). Im Gegensatz zum wtEGFR erhöht EGFRvIII alleine die Tumorigenitätskapazität von Zellen nicht, sondern scheint vielmehr mit einer erhöhten Tumordinvasivität assoziiert zu sein. Lal et al. konnten in immunhistologischen Untersuchungen von humanem GBM-Resektionsschnitten beispielsweise zeigen, dass die Expression von EGFRvIII stark mit der Expression von extrazellulären Matrix-Bestandteilen (Fibrillin-1), Metalloproteasen (matrix metalloproteinase 1, MMP1) und Serinproteasen (Fibroblast activation protein α , FAP) korreliert, welche mit einem besonders invasiven Zellphänotyp verbunden sind. *In vitro*-Versuche mit stabil transfizierten GBM-Zellen bestätigten, dass die Expression von EGFRvIII eine Steigerung der Invasivität von GBM-Zellen bewirkt (343). Diese Ergebnisse konnten von Feng et al. und Zheng et al. welche ebenfalls einen direkten Zusammenhang zwischen der *in vitro* Invasivität und der Expression von EGFRvIII in ektopisch EGFRvIII-exprimierenden GBM-Modellsystem nachweisen konnten, bestätigt werden (367, 368). EGFRvIII scheint somit mit einer erhöhten Tumordinvasivität assoziiert zu sein und die Expression des Rezeptors könnte ein wesentlicher Grund für die das ungewöhnlich invasive Wachstum von BS153- und BS153^{resE}-Zellen *in vivo* sein.

5.5 Bedeutung des EGFR-Status für die Bildung von GBM und für die Ausbildung von BS153^{resE}-Zellen

Neben einem äußerst diffusen und invasiven Wachstum ist vor allem ein hohes Maß an intratumoraler Heterogenität charakteristisch für GBM. Ein Beispiel hierfür ist die heterogene Expression von wtEGFR und EGFRvIII innerhalb eines Tumors. Da sich die GBM-Zelllinien BS153 und BS153^{resE} durch eine heterogene wtEGFR- und EGFRvIII-Expression auszeichnen, stellen sie ein besonders geeignetes GBM-Modellsystem dar um die Bedeutung des wtEGFR/EGFRvIII-Status für die GBM-Initiierung zu untersuchen. Eine elegante Möglichkeit die Heterogenität und Klonalität von Tumoren *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen, bietet die RGB-Markierung von Zellen. Durch individuelle und stabile Fluoreszenzmarkierung aller Zellen einer Zellpopulation, ist es möglich, das Schicksal einzelner Zellen anhand ihres Farbcodes *in vitro* und *in vivo* zu verfolgen (4) (Abschnitt 3.1.9).

Um die Bedeutung von wtEGFR und EGFRvIII für die Bildung von GBM und für die Ausbildung von Erlotinib-resistenten BS153-Zellen zu untersuchen wurden neben BS153-Zellen auch

U87MG-Zellen, welche keine EGFR-Amplifikation und EGFRvIII-Expression aufweisen, RGB-markiert (Abschnitt 4.5.1). Hierbei zeigte sich, dass ein 10x RGB-Vektor Titer für die Transduktion von BS153-Zellen optimal war, wohingegen sich ein 3x RGB-Vektor Titer für die Transduktion von U87MG-Zellen als geeignet erwies (Abbildung 31). Der Grund für die unterschiedlichen Vektor-Titer der beiden Zelllinien sind zellspezifische Eigenschaften wie beispielsweise eine unterschiedliche Transduktionsrate.



*Abbildung 54 **RGB-markierte BS153-Zellen.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von RGB-markierten BS153-Zellen des Abschnitts 4.5.14.5.1 (10x Vektor-Titer). Mit der RGB-Markierungsmethode ist es möglich Zellen individuell mit nahezu allen Spektralfarben fluoreszent zu markieren.*

Aufgrund der individuellen Fluoreszenzmarkierung der Zellen, können anhand der Farbverteilung innerhalb der adhärent wachsenden Zellpopulation ferner Schlussfolgerungen hinsichtlich Proliferations-Aktivität und der Klonalität der Zellen gezogen werden. Die Ausbildung einzelner Farbareale, bestehend aus Zellen einer Farbe, spricht beispielsweise dafür, dass die Zellen eines solchen Farbareals ursprünglich von einem Klon mit erhöhter Proliferations-Aktivität ausgegangen sind. Da jedoch weder Erlotinib-behandelte noch unbehandelte BS153-RGB-Zellen derartige Farbareale ausbildeten, spricht dies dafür, dass die Proliferationsaktivität aller Zellen nahezu identisch war und durch den TKI nicht beeinflusst wurde. Dies ist wiederum ein eindeutiger Hinweis darauf, dass sich die Klonalität beider Zellpopulationen nicht verändert hat und die Ausbildung der Erlotinib-toleranten BS153-Zelllinie, nicht auf einer klonalen Selektion, sondern vielmehr auf einer Veränderung des Expressionsprofils der parentalen Zelllinie beruhte. Um den Einfluss des wtEGFR/EGFRvIII-Status auf die Tumorentstehung zu untersuchen, wurden immundefizienten Mäusen RGB-markierte BS153- oder U87MG-RGB Zellen in das Caudatum/Putamen (Striatum) implantiert (Abschnitt 4.5.3). Sowohl BS153-RGB als auch

U87MG-RGB-Zellen waren in der Lage Tumore zu induzieren, welche sich hinsichtlich ihrer Invasivität zum Zeitpunkt des Versuchsendes (auftreten von Symptomen), nicht von BS153- bzw. U87MG-induzierten Tumoren unterschieden. Während sich BS153-RGB-Tumore nur aus wenigen Farben zusammensetzten, welche zudem klar voneinander abgegrenzt waren (Abbildung 35 A, B), bestanden U87MG- Tumore aus einer Vielzahl unterschiedlicher Farben und wiesen keine Einteilung in definierte Farbareale auf (Abbildung 35 C, D).

Da gezeigt werden konnte, dass die RGB-Markierung von Zellen auch *in vivo* stabil ist (327), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die in BS153-RGB-Tumoren beobachteten Farbareale jeweils aus einem einzelnen, definierten Klon hervorgegangen sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Fluoreszenzfärbung einer Zelle bzw. die Fluoreszenzfärbung der Klone einer Ursprungszelle aufgrund einer chromosomalen Instabilität verändert. Der Verlust oder die Zunahme von Chromosomen könnte beispielsweise zu dem Verlust bzw. zu der Duplikation eines im Genom inserierten LeGO-Vektors und in Folge dessen zu einer Abweichung der Fluoreszenzfärbung führen (327). Zudem wäre es denkbar, dass LeGO-Vektoren aufgrund epigenetischer Veränderungen, wie der Methylierung von Promotoren, von einzelnen Zellen nicht länger exprimiert werden (329). Da die Differenzierung von Zellen zu einer Veränderung der Chromatinstruktur sowie des Transkriptions- und Translationsprofils führt, kann diese ebenfalls in einer Veränderung der LeGO-Vektoren-Expression resultieren (369). Derartige Veränderungen könnten die geringen Farbunterschiede innerhalb eines Farbareals bei BS153-RGB-Tumoren erklären (Abbildung 35 A, B). Es ist jedoch auch denkbar, dass diese beispielsweise auf einer unterschiedlichen Zellzyklusphase und somit auf einer individuellen Proteinexpressionsrate und einem unterschiedlichen Kern-Zytoplasma-Verhältnis der Zellen, oder schlicht auf der ungleichmäßigen Dicke der Schnitte beruhen. Daher ist es wahrscheinlich, dass die beschriebenen Farbareale in BS153-RGB-Tumoren jeweils auf einen einzigen Klon und somit auf eine einzelne Zelle mit Tumorinitiierungseigenschaften zurückzuführen ist, was die These der Tumorstammzellen (TSZ) untermauert.

Ähnlich den Stammzellen, welche in Abhängigkeit ihres Differenzierungspotentials durch asymmetrische Zellteilung unterschiedlichste Zellen ausbilden können, geht die TSZ-Theorie davon aus, dass Tumore Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften enthalten, welche ein hohes Tumorinitiierungspotential besitzen und maßgeblich am Tumorerhalt beteiligt sind (328, 370, 371). Bekräftigt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass GBM multipotente Zellen enthalten (370, 372, 373), welche nicht nur positiv für die neuronalen Stammzellenmarker CD133 (cluster of differentiation 133, Prominin) und Nestin sind (370), sondern zudem auch die embryonalen Stammzellenmarker Sox2 (sex determining region Y (SRY)- box 2) und Olig2

(Oligodendrocyte transcription factor 2) exprimieren (374). Im Gegensatz zu gewöhnlichen Tumorzellen sind ein erhöhtes Potential zur Proliferation, Selbsterneuerung sowie die Fähigkeit zur multilinearen Differenzierung charakteristisch für diese Subpopulation (375). Sie sind ferner in der Lage sich asymmetrisch zu teilen, Tumore zu induzieren (328, 370, 371) und zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie (370, 372, 373). *In vitro*-Versuche konnten zeigen, dass CD133-positive GBM-Zellen, wie beispielweise BS153-, GS27- und GS30-Zellen, im Gegensatz zu konventionellen GBM-Zelllinien unter serumfreien Bedingungen und bei gleichzeitiger Stimulation mit den Wachstumsfaktoren EGF und FGF2, ähnlich adulten neuronalen Stammzellen, Neurosphären ausbilden (374, 375).

Die These, dass EGFR für TSZ von Bedeutung sein könnte, wird durch die Beobachtungen von Galli et al. bestätigt, denen es gelungen ist zwei stabile, EGFR amplifizierte primäre GBM-Zelllinie zu generieren (0627 und 0306 siehe auch Abschnitt 3.1.1, Tabelle 1), welche als Neurosphären wachsen, *in vivo* invasive Tumore ausbilden und ihre Tumorigenität auch bei seriellen Transplantationen behalten (371). Es konnte ferner gezeigt werden, dass EGFR-amplifizierte und EGFRvIII-exprimierende primäre GBM-Zellen *in vivo* invasive Tumore bilden, wohingegen nicht amplifizierte Zellen entweder nicht tumorigen waren oder extrem langsam wachsende Tumore induzierten (323). Für Zellen des Plattenepithelkarzinom des Kopf und Nackens (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC; Zelllinie UMSCC22B) konnte beobachtet werden, dass die Expression und Stimulation von EGFR die Expression bekannter Stammzellmarker (CD44, Oct-4 u.a.) induzierte und zur Ausbildung eines TSZ-Phänotyps (z.B. erhöhte Tumorsphärenformation) führte. Wurde die EGFR-Aktivität der HNSCC-Zellen hingegen durch eine Behandlung mit Gefitinib inhibiert verloren sie alle Merkmale des TSZ-Phänotyps (376).

Neben GBM konnten Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften auch bei Patienten mit myeloischer Leukämie (AML) (377, 378) sowie bei Brustkrebs (379), Darmkrebs (380) und Prostatakrebspatienten (381) nachgewiesen werden. Der zelluläre Ursprung von TSZ konnte bisher jedoch nicht geklärt werden. Es wäre beispielsweise denkbar, dass differenzierte Zellen durch einzelne oder durch die Summe verschiedener mutagener Veränderungen stammzellähnliche Eigenschaften erlangen (370). Da differenzierte Zellen jedoch nur ein eingeschränktes Proliferationspotential besitzen und zudem relativ kurzlebig sind, ist es wahrscheinlicher, dass TSZ aus den langlebigeren, adulten neuronalen Stammzellen oder Progenitorzellen hervorgehen, welche sich durch ein deutlich höheres Proliferationspotential auszeichnen (378, 382-385). Bekräftigt wird diese These beispielsweise durch die Beobachtung, dass die somatische Inaktivierung der Tumorsuppressorgene TP53 und Nf1 ausschließlich bei neuronalen Stammzellen oder Progenitorzellen der subventrikulären Zone, nicht aber bei Zellen

außerhalb dieser Region, die Bildung von Astrozytomen in Mäusen induziert. Gleiches konnte für PTEN, dem negativen Regulator des PI3K-Akt Signalwegs, gezeigt werden (386), was die zentrale Stellung des EGFR-Signalwegs für die Tumorentstehung verdeutlicht. *In vivo*-Versuche konnten ferner zeigen, dass die EGFR-vermittelte Signaltransduktion die Proliferation von einigen Zellen des Striatums induzierte, welche Eigenschaften neuronaler Stammzellen aufwiesen (387). Ferner ist der EGFR-Signalweg einerseits maßgeblich an der Regulation der Proliferation und Selbsterneuerung von neuronalen Stammzellen beteiligt und kann andererseits die Differenzierungsrichtung dieser beeinflussen (388). Somit ist der EGFR-Signalweg in GBM-Zellen nicht nur häufig verändert sondern auch für neurale Stammzellen und Progenitorzellen von großer Bedeutung. Zusammenfassend sind diese Beobachtungen ein weiteres Indiz dafür, dass neuronale Stammzellen oder Progenitorzellen den zellulären Ursprung von GBM-Tumorstammzellen bilden und dass der EGFR-Signalweg nicht nur für neurale Stammzellen im Allgemeinen, sondern auch für GBM-TSZ im Speziellen von zentraler Bedeutung ist.

Die These, dass TSZ für die Initiierung von Tumoren verantwortlich sind, wird von dem hierarchischen Modell der Tumorentstehung zusammengefasst (Abbildung 55 B). Dieses Modell geht von einer strikten, hierarchischen Zellorganisation innerhalb eines Tumors aus und davon, dass lediglich eine Subpopulation von Tumorstammzellen tumorigen ist (375). Dieses Modell steht im Widerspruch zum älteren, stochastischen Tumormodell (Abbildung 55 A), nach welchem alle Zellen eines Tumors das gleiche Proliferationspotential besitzen und mit der gleichen stochastischen Wahrscheinlichkeit in der Lage sind Tumore zu induzieren (382). Die Beobachtung, dass U87MG-GBM-Tumore nicht von einzelnen wenigen Klonen abstammen scheinen, spricht eher gegen das hierarchische- und für das stochastische-Modell. Denkbar und wahrscheinlicher wäre jedoch ein drittes Modell, das Plastizitäts-Modell (Abbildung 55 C). Dieses basiert auf dem hierarchischen Modell der TSZ, geht aber davon aus, dass auch normale Tumorzellen, aufgrund von äußeren Einflüssen oder spontan, stammzellähnliche Eigenschaften erlangen können und somit eine bidirektionale Interversion zwischen TSZ und normalen Tumorzellen existiert (389). Für dieses Modell spricht die Beobachtung, dass die Klonalität von Tumorzellen stark von der Permissivität der gewählten Bedingungen abzuhängen scheint. Zeng et al. konnten beispielsweise beobachten, dass die Klonogenität von Rattengliomzellen unter serumfreien Bedingungen, im Vergleich zu Standardbedingungen um etwa 60 % abnimmt (390). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch CD133-negative GBM-Zellen sich selbst erneuern und differenzieren können (391, 392) und dass CD133-negative Zellen, anders als bisher angenommen in der Lage sind durch asymmetrische Teilung CD133-positive Zellen hervorzubringen (393) und überdies ebenfalls tumorigen sind (391, 392).

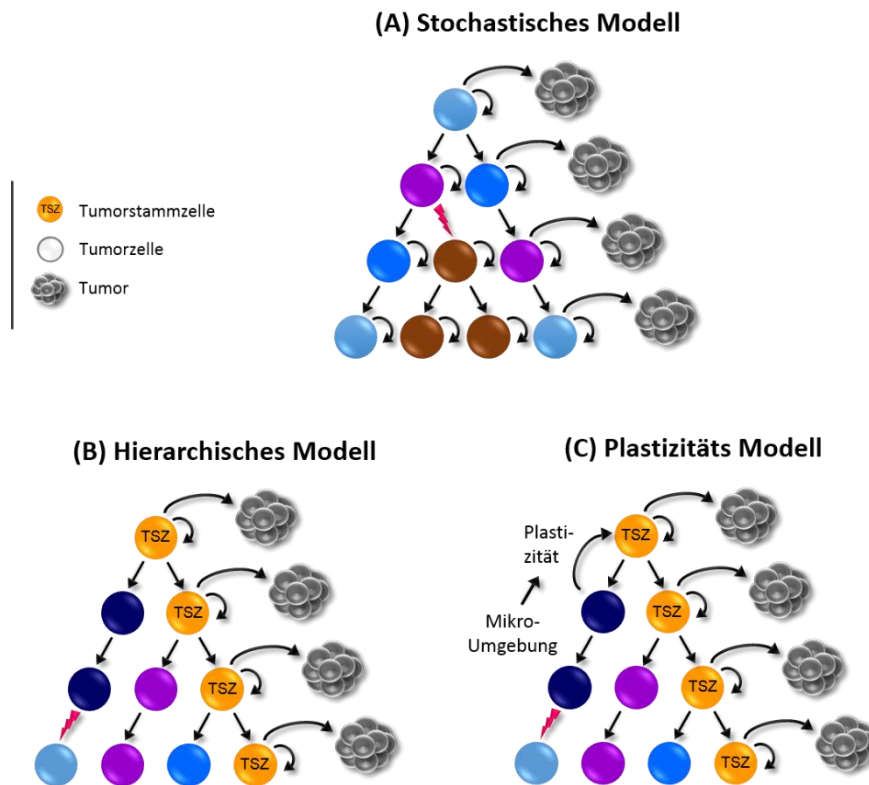


Abbildung 55 **Modelle der Tumorinitiation und Tumorphagenese.** (A) Stochastisches Modell: Tumore bestehen aus heterogenen Zellen, welche ein ähnliches proliferatives Potential besitzen und Tumore induzieren können. (B) Hierarchisches Modell: Die Zellen eines Tumors sind heterogen und lediglich eine kleine Subpopulation von Tumorstammzellen (TSZ) ist in der Lage Tumore zu induzieren. (C) Plastizitäts Modell: Dieses Modell basiert auf dem hierarchischem Modell. Es geht jedoch von einer bidirektionalen Intersion zwischen TSZ und nicht-TSZ aus, nach welcher nicht-TSZ aufgrund von äußeren Einflüssen oder spontan stammzellähnliche Eigenschaften erlangen und Tumore induzieren können.

5.6 Aktivität von Signalproteinen der EGFR-vermittelten Signaltransduktion in BS153- und BS153^{resE}-Zellen

Da die permanente Behandlung mit Erlotinib eine Veränderung des wtEGFR/EGFRvIII-Status von BS153-Zellen bewirkte (Abschnitt 4.3 und 4.4), wurde im Anschluss die Expression und Aktivität von Signalproteinen des EGFR-Signalwegs von BS153^{resE}-Zellen untersucht (Abschnitt 4.6). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Erk1/2, einem Schlüsselprotein des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs, in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu parentalen BS153-Zellen nur leicht erhöht war. Gleiches gilt für mTor und Akt, zwei zentralen Proteinen des PI3K-Akt-Signalwegs. Anders verhielt es sich bei einem weiteren Schlüsselprotein dieses Signalwegs, der PI3K. Im Gegensatz zur regulatorischen PI3K-Untereinheit p85 deren Expression unverändert war, war die Aktivität der katalytischen p110-Untereinheit in BS153^{resE}-Zellen drastisch erhöht (Abschnitt 4.6.1, Abbildung 36) (Abbildung 56). Ein Grund hierfür könnte die Hochregulation der EGFRvIII-Expression in BS153^{resE}-Zellen sein, welcher primär den

PI3K-Akt-Signalweg aktiviert (394, 395). Bekräftigt wird diese These durch die Beobachtung, dass EGFRvIII in NIH 3T3-Zellen (embryonale Mäusfibroblasten) die konstitutive Aktivierung der PI3K vermittelt (160).

Interessanterweise war einzig die mRNA-Menge und die Proteinexpression der p110 δ -Isoform der PI3Kp110, nicht aber die der α -, β - und γ -Isoformen, in chronisch Erlotinib-behandelten BS153^{resE}-Zellen erhöht (Abschnitts 4.6.2, Abbildung 37 und Abbildung 38). Eine akute Behandlung von BS153-Zellen mit Erlotinib wirkte sich hingegen nicht auf die Expression der PI3K(p110 δ) aus. Die Erhöhung der PI3K(p110 δ) ist insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass diese Isoform normalerweise nicht im Gehirn, sondern hauptsächlich vom hämatopoetischen System exprimiert wird interessant (396, 397). Neueste Forschungsergebnisse zeigten zudem, dass der Knock-Down von PI3K(p110 δ) in Gliomzellen (U-87MG, SW1783 und SK-MG3) zu einer Herunterregulation der Fak- und Cyclin42-Proteinmenge sowie zu einer Reduktion der Zellmigration und Invasion führte. Auf die Zellvitalität, den Zellzyklus sowie auf die Apoptoserate der Zellen, hatte der Knock-Down von PI3K(p110 δ) hingegen keinen Einfluss (398).

Zu Beginn dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die permanente Erlotinib-Behandlung von BS153-Zellen zu einer Herunterregulation der wtEGFR-Expression und im Gegenzug zu einer starken Hochregulation der EGFRvIII-Expression führte (Abschnitts 4.3.5). Obwohl BS153^{resE}-Zellen aufgrund dieses inversen wtEGFR/EGFRvIII-Verhältnisses vermutlich vermehrt auf die EGFRvIII-vermittelte Signaltransduktion angewiesen sind, weisen sie verglichen mit parental BS153-Zellen lediglich eine geringe Erhöhung der EGFRvIII-Phosphorylierung auf. Vor diesem Hintergrund ist es möglich, dass es sich bei der Hochregulation der PI3K(p110 δ)-Isoform um einen weiteren kompensatorischen Mechanismus der Zellen handelt, um die verringerte wtEGFR-vermittelte Signaltransduktion auszugleichen und die Aktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs zudem über einen wtEGFR/EGFRvIII-unabhängigen Weg zu gewährleisten.

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen wurden neben PI3K, Akt und mTor auch die Expression und der Phosphorylierungsstatus von PTEN, einem zentralem negativen Regulator des PI3K-Akt-Signalwegs, untersucht. Anders als PI3K, welche die Phosphorylierung von PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃ katalysiert, vermittelt PTEN die Dephosphorylierung von PIP(3,4,5)₃ zu PIP(4,5)₂ (162). Western Blot Analysen der PTEN-Expression und –Aktivität zeigten, dass die permanente, nicht aber die temporäre Behandlung von BS153-Zellen, zu einer Reduktion der PTEN-Expression und einer Verminderung der PTEN-Aktivität führte (Abbildung 56; Abschnitts 4.6.3, Abbildung 39).

Diese Ergebnisse werden durch Studien bestätigt, welche ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer verminderten PTEN-Expression und einer Resistenz gegenüber EGFR-spezifische

TKI nachweisen konnten. Bianco et al. konnten beispielsweise zeigen, dass Erlotinib zwar die EGFR-Phosphorylierung von PTEN-negativen Brustkrebszellen (MDA-468) inhibierte, jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt hatte und demnach die Aktivität des EGFR-vermittelten PI3K-Akt-Signalwegs nicht beeinflusste. Da die Expression von PTEN die Dephosphorylierung von Akt sowie eine gesteigerte Apoptoserate und somit eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Erlotinib induzierte, deuten diese Ergebnisse auf einen direkten Zusammenhang zwischen einem Verlust bzw. einer verminderten PTEN-Expression und einer Resistenz gegenüber Erlotinib hin (399).

Diese Beobachtungen konnten von Menninghoff et al. bestätigt werden, welche zeigen konnten, dass die Apoptoserate von Erlotinib- oder PKI-166- (EGFR-spezifischer TKI) behandelten, PTEN-negativen GBM-Zellen (SF295) durch die ektopische Expression von PTEN signifikant gesteigert werden konnte. Interessanterweise konnten Menninghoff et al. in einer Studie mit Gliom-Rezidiv-Patienten zudem nachweisen, dass 7 von 13 Patienten welche keine PTEN-Mutation aufwiesen, und 95 % aller Patienten welche zusätzlich EGFRvIII-exprimierten, positiv auf eine TKI-Therapie (Erlotinib oder Gefitinib) ansprachen (167).

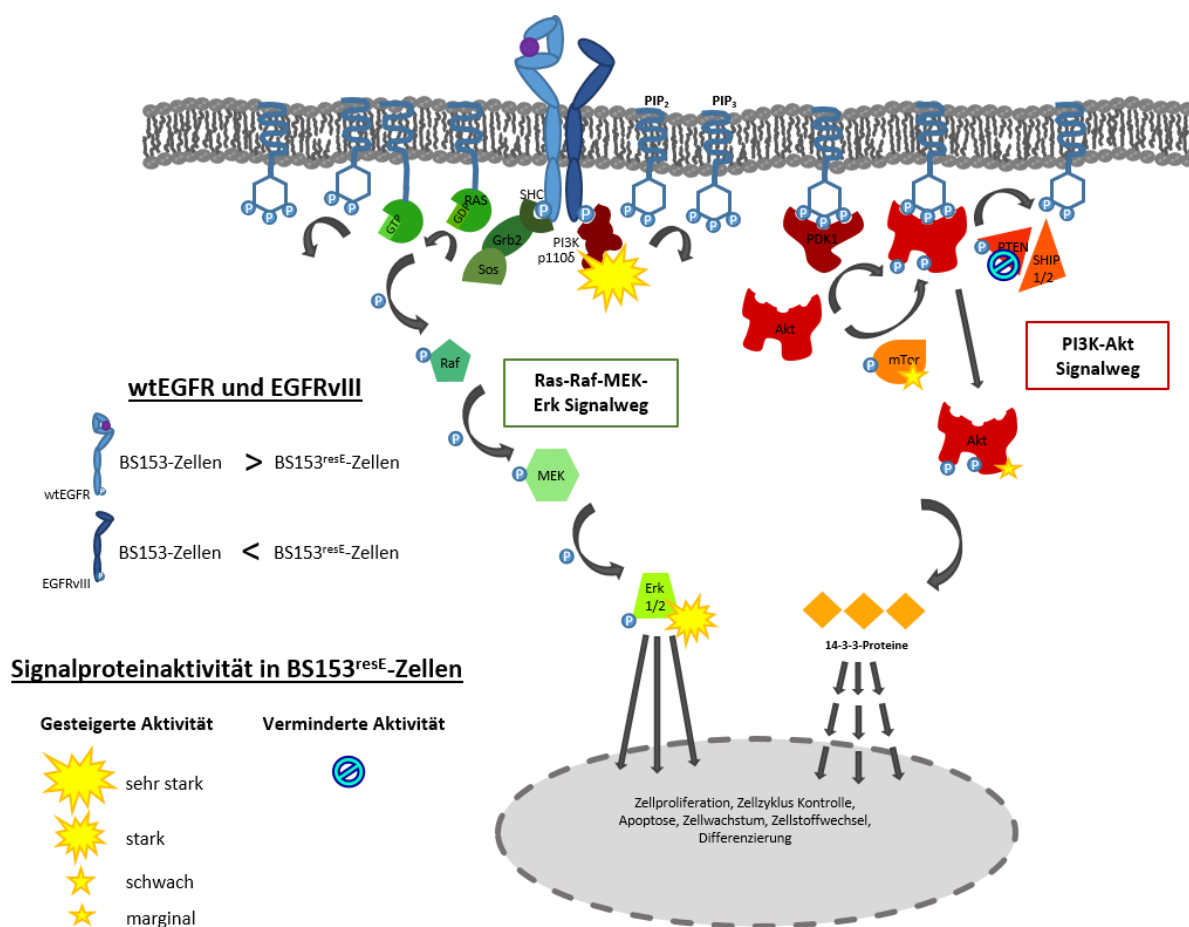


Abbildung 56 **Proteinaktivität der EGFR-vermittelten Signaltransduktion in BS153^{resE}-Zellen.** Schematische Darstellung der erhöhten Signalprotein-Aktivität in BS153^{resE}-Zellen verglichen mit der Aktivität in parental BS153-Zellen. Die Aktivität von

PI3Kp110δ, Erk1/2, mTor und Akt ist in BS153^{resE}-Zellen im Vergleich zu BS153-Zellen mit abnehmender Ausprägung erhöht.

Zusammenfassend scheint die permanente Behandlung von EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen mit Erlotinib auf drei unterschiedliche Art und Weisen zu einer erhöhten Aktivität des PI3K-Akt-Signalwegs zu führen. Zum einen induziert die chronische Erlotinibbehandlung die gesteigerte Expression des EGFRvIII. Da dieser primär den PI3K-Akt-Signalweg steuert, kommt es vermutlich infolgedessen zu einer erhöhten Phosphorylierung und somit einer erhöhten Aktivierung von Akt und mTor, zwei zentralen Proteinen des PI3K-Akt-Signalwegs. Zum anderen scheint die chronische Erlotinibbehandlung einerseits eine gesteigerte Expression der PI3K(p110δ) und somit eine erhöhte PI3K-Aktivität zu induzieren und andererseits zu einer Verminderung der PTEN-Expression, zu führen.

5.7 Die funktionelle Rolle von EGFRvIII und PI3Kp110δ für BS153^{resE}-Zellen

Vor dem Hintergrund, dass die Expression von EGFRvIII und PI3Kp110δ in permanent Erlotinib behandelten BS153-Zellen hochreguliert ist (Abschnitte 4.3-4.6). Um die Bedeutung dieser beiden Proteine für die erworbenen TKI-Resistenz zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt verschiedene EGFRvIII- und PI3K(p110δ)-Knockdown-Experimente durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen durch den Knockdown von EGFRvIII, deutlich stärker inhibiert wurde als die Proliferation von parental BS153-Zellen (Abschnitts 4.7.1., Abbildung 40). Die unterschiedlich starken Auswirkungen des EGFRvIII-Knockdowns sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass die chronische Behandlung von BS153-Zellen mit Erlotinib zu einer erhöhten EGFRvIII, sowie einer verminderten wtEGFR-Expression und somit zu einer gesteigerten Abhängigkeit dieser Zellen von der EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion führte.

Die Analyse der Protein-Expression zeigte ferner, dass der Knockdown von EGFRvIII in BS153^{resE}-Zellen eine signifikante Reduktion der Aktivität von PI3K(p110), PI3K(p85), PI3K(p110δ) sowie von Akt und Erk bewirkte. Die Gesamtproteinmenge und somit die Expression der entsprechenden Gene wurde durch den EGFRvIII-Knockdown von EGFRvIII hingegen nicht beeinflusst (Abschnitt 4.7.2, Abbildung 41). Die verminderte Phosphorylierung von Akt und Erk verdeutlicht, dass EGFRvIII in BS153^{resE}-Zellen nicht nur den PI3K-Akt- sondern auch den Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg aktiviert.

Die Behandlung von BS153-EGFRvIII-Knockdown-Zellen mit Erlotinib führte, verglichen mit unbehandelten Zellen, zu keiner weiterer Reduktion der Zellproliferation. Interessanterweise

führte jedoch die Behandlung von BS153^{resE}-EGFRvIII-Knockdown-Zellen mit Erlotinib, verglichen mit unbehandelten Zellen, zu einer signifikant gesteigerten Inhibition der Proliferation und somit zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber dem TKI (Abschnitts 4.7.1, Abbildung 40) (Abbildung 57). Eine Erklärung für die inhibitorische Wirkung von Erlotinib, könnte möglicherweise eine erhöhte Abhängigkeit von BS153^{resE}-EGFRvIII-Knockdown-Zellen von der wtEGFR-vermittelten Signaltransduktion sein. Infolge der hieraus resultierenden vermehrten Aktivierung des wtEGFR, kann Erlotinib die TKI-Aktivität des wtEGFR und somit die wtEGFR-vermittelten Signaltransduktion in BS153^{resE}-Zellen effektiv inhibieren. Die starke Wirkung von Erlotinib auf wtEGFR-exprimierende aber EGFRvIII-negative Zellen konnten von Schulte et al. bestätigt werden, welche zeigen konnten, dass Gliomzelllinien wie U87MG und G55 eine chronische Behandlung mit Erlotinib nicht überleben (357).

Die beschriebenen EGFRvIII-Knockdown-Experimente (Abschnitte 4.7.1 und 4.7.2) zeigen, dass EGFRvIII durch die Regulation des PI3K-Akt- und des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs vermutlich eine zentrale Rolle bei der Ausbildung einer Erlotinibresistenz von EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-positiven GBM-Zellen einnimmt. Da der Knockdown von EGFRvIII zu einer Sensitivierung von BS153^{resE}-Zellen gegenüber Erlotinib führte, scheint nicht die kompensatorische Aktivierung anderer RTK, sondern die Hochregulation von EGFRvIII und die hiermit assoziierte Herunterregulation von wtEGFR, für die beobachtete Erlotinib-Resistenz von BS153-Zellen verantwortlich zu sein.

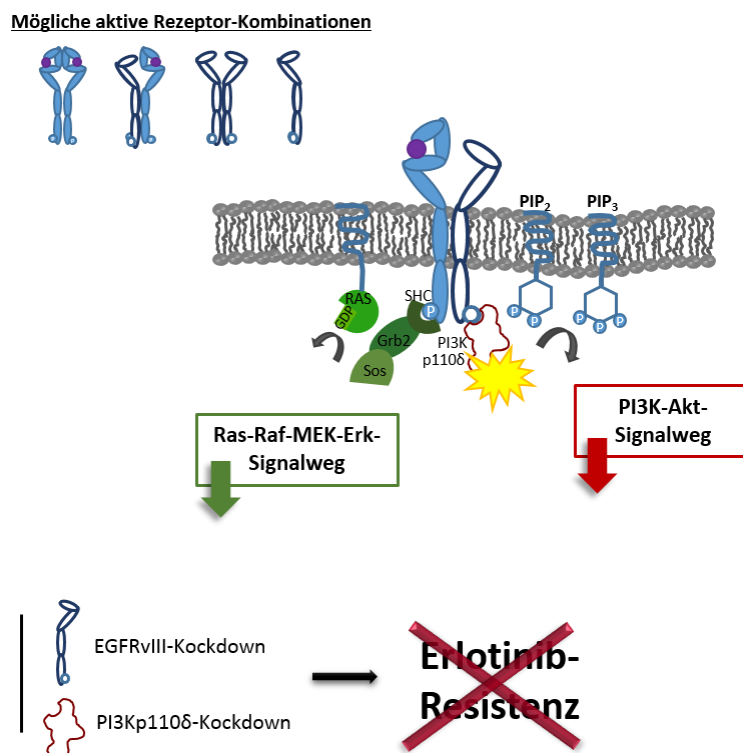


Abbildung 57 **Mechanismus der Erlotinib-Sensitivierung von BS153^{resE}-Zellen.** Durch den Knockdown von EGFRvIII oder PI3K(p110δ) führt zu einer verminderten Aktivität des Ras-Raf-MEK-Erk- und des PI3K-Akt-Signalwegs sowie zu einer Sensitivierung von BS153^{resE}-Zellen gegenüber Erlotinib.

Neben einer Veränderung des wtEGFR/EGFRvIII-Status, führte die chronische Erlotinib-Behandlung von BS153-Zellen auch zu einer Hochregulation der PI3K(p110δ)-Expression und infolgedessen zu einer gesteigerten Aktivität der PI3K (Abschnitt 4.6). Um die Bedeutung der PI3K für die BS153^{resE}-Zellen näher zu untersuchen, wurden die Auswirkungen einer PX-866-Behandlung auf die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen ermittelt (Abschnitt 4.7.3). Der PI3K-Inhibitor, reduzierte die Proliferation von BS153^{resE}-Zellen signifikant stärker und bereits bei niedrigeren Konzentration als die Proliferation parentaler Zellen (Abbildung 42). Dies zeigt, dass die chronische Behandlung von BS153-Zellen mit Erlotinib vermutlich zu einer gesteigerten Abhängigkeit von der PI3K führte. Ferner ist zu vermuten, dass eine gleichzeitige Behandlung von GBM-Zellen mit Erlotinib und PX-866 die Ausbildung einer Erlotinibresistenz unterbinden könnte. Da PI3K jedoch ubiquitär exprimiert wird und an der Steuerung einer Vielzahl fundamentaler zellulärer Prozesse beteiligt ist und PX-866 alle Isoformen der PI3K inhibiert, wären bei einer Behandlung mit diesem Medikament gravierende Nebenwirkungen zu erwarten. Dennoch befindet sich PX-866 derzeit in einer Phase II-Studie zur Behandlung von GBM-Rezidiven und sekundären GBM (400).

Da in BS153^{resE}-Zellen lediglich die Expression der p110δ Untereinheit, nicht aber die Expression der p110α-, β- und γ-Isoformen erhöht ist, wurden zudem PI3K(p110δ)-Knockdown-Experimente durchgeführt (Abschnitt 4.7.4). In parentalen BS153-Zellen führte der Knockdown der

PI3K(p110 δ) lediglich zu einer leichten, in BS153^{resE}-Zellen hingegen zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation (Abbildung 43). Die unterschiedlich starken Auswirkungen des PI3K(p110 δ)-Knockdowns sind vermutlich auf die gesteigerte Abhängigkeit von BS153^{resE}-Zellen vom PI3K-Akt-Signalweg im Allgemeinen und von der PI3K bzw. der PI3K(p110 δ) im Speziellen zurückzuführen (Abschnitt 4.6.2).

Die hervorstechende Bedeutung der PI3K(p110 δ) für den PI3K-Akt-Signalweg, dem Hauptweg der EGFRvIII-vermittelten Signaltransduktion in GBM, wird durch Beobachtung von Evangelia et al. verdeutlicht. Interessanterweise kann PI3K(p110 δ) über die indirekte Inhibition von RhoA (Ras homolog gene family, member A) und ROCK (Rho-associated protein kinase) die Aktivität von PTEN, dem wichtigsten negativen Regulator der PI3K(p110 δ) und der PI3K-Akt-Signalwegs, in BBM-Zellen (bone marrow-derived macrophages) inhibieren. Somit konnten Evangelia et al. eine reziproke Interaktion von PI3K(p110 δ) und PTEN nachweisen (401).

Bemerkenswerterweise führte die Behandlung von BS153^{resE}-PI3K(p110 δ)-Knockdown-Zellen mit Erlotinib, verglichen mit unbehandelten Zellen, zu einer abermals reduzierten Proliferation und somit zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber dem TKI (Abbildung 57). Die Behandlung von BS153-PI3K(p110 δ)-Knockdown-Zellen mit Erlotinib, führte verglichen mit lediglich Erlotinib behandelten Zellen, hingegen nicht zu einer Steigerung der inhibitorischen Wirkung des TKI (Abschnitt 4.7.4, Abbildung 43). Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der Hochregulation von EGFRvIII, vermutlich auch die gesteigerte Expression der PI3K(p110 δ) ein zentrales Element der Erlotinibresistenz von EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen ist. Da die erhöhte PI3K-Aktivität in BS153^{resE}-Zellen wahrscheinlich auf eine gesteigerte PI3K(p110 δ)-Expression zurückzuführen ist und die p110 δ -Isoform nicht von gesundem Gehirngewebe exprimiert wird, stellt die Inhibition dieser Isoform einen interessanten Ansatzpunkt für die Umgehung der erworbenen Erlotinibresistenz dar. Zu den bekanntesten PI3K(p110 δ)-Inhibitoren zählt CAL-101, welches in präklinischen Studien in vitro-Studien mit Lymphomzellen bereits erfolgreich vielversprechende Ergebnisse lieferte und sich derzeit in klinischen Studien befindet (396, 398, 402).

5.8 Die Bedeutung von HDAC für die Proliferation, Migration und den wtEGFR/EGFRvIII-Status von GBM-Zellen

Da die Entwicklung von Resistenzen gegenüber EGFR-spezifischen TKI ein Grund für die schlechte klinische Wirkung von EGFR-gerichteten Therapien ist, ist es von zentraler Bedeutung, die grundlegenden Mechanismen einer derartigen Resistenz zu verstehen und Wege zu finden um

diese zu überwinden. Sharma et al. konnten zeigen, dass humane PC9 Adenokarzinomzellen eine kleine Zellpopulation mit einer inhärenten Resistenz gegenüber EGFR-gerichteten TKI besitzen. Interessanterweise ist es gelungen, diese resistente Zellpopulation durch die Behandlung mit HDACi gegenüber EGFR-spezifischen TKI zu sensitivieren (403). Ferner konnte gezeigt werden, dass HDAC eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Transkription spielen (262, 276, 278, 279) und dass die HDAC-vermittelte Veränderung der Genexpression von zentraler Bedeutung für die Tumorprogression ist (404, 405). Interessanterweise konnten Kim et al. zeigen, dass die HDAC-Inhibitoren (HDACi) SAHA und TSA in Brustkrebszellen durch die Inhibition der RNA-Polymerase II-Elongation selektiv die Transkription des überexprimierten HER2-Proteins inhibieren (320). Um festzustellen, ob die Expression von EGFR in EGFR-amplifizierten GBM-Zellen durch eine HDACi-Behandlung inhibiert und eine erworbene TKI-Resistenz überwunden werden kann, wurde der Einfluss von HDACi auf parentale und Erlotinib-resistenten GBM-Zelllinien (BS153 und DK-MG bzw. BS153^{resE} und DK-MG^{resE}) untersucht (Abschnitt 4.8). Bei DK-MG-Zellen handelt es sich um eine EGFRvIII-exprimierende GBM-Zelllinie mit moderater EGFR-Amplifikation, von welcher durch die chronische Behandlung mit Erlotinib (10 µM Erlotinib, > 15 Passagen), ebenfalls eine Erlotinib-resistente Zelllinie generiert werden konnte (Abschnitt 4.8, Tabelle 17).

Um ein besonders breites Spektrum an HDAC zu inhibieren, wurden alle Versuche mit den folgenden HDACi durchgeführt: SAHA (inhibiert HDAC der Klassen I, IIa, IIb, IV), Scriptaid (inhibiert HDAC der Klasse I), MS-275 (inhibiert HDAC 1 und 3 sowie HDAC 8 marginal) und TSA (Klasse I, IIa, IIb, IV jedoch nicht HDAC8) (Abschnitt 7.1.4.2, Tabelle 25). Zudem wurden alle Zellen in parallelen Versuchsansätzen gleichzeitig mit den genannten HDACi und Erlotinib sowie mit dem EGFR/HER2-HDACi CUDC-101 behandelt. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob die gleichzeitige Inhibition der EGFR- und HDAC-Aktivität zu synergetischen oder additiven Effekten führt (Abschnitts 4.8.1 und 4.8.2).

5.8.1 Einfluss von HDACi auf die Proliferation von GBM-Zellen

Um die Auswirkungen einer Inhibition von HDAC auf die Proliferation von GBM-Zellen zu untersuchen, wurden parentale und Erlotinib resistente GBM-Zelllinien mit unterschiedlichem wtEGFR/EGFRvIII-Status (Tabelle 17) mit den HDACi SAHA, Scriptaid, MS-275 und TSA, sowie mit Erlotinib und dem kombinierten EGFR/HER2-HDACi CUDC-101 behandelt. Hierbei zeigte sich, dass die HDACi SAHA, Scriptaid, MS275 und TSA in der Lage waren, die Proliferation aller parentalen und Erlotinib-resistenten Zelllinien konzentrationsabhängig zu inhibieren (Abschnitts 4.8.1, Abbildung 44 und Abschnitt 4.8.1.2, Abbildung 46). Dieses Ergebnis deutet

darauf hin, dass die inhibitorische Wirkung der HDACi nicht vom wtEGFR/EGFRvIII-Status (Gen-Amplifikation, Proteinexpression) der GBM-Zellen abhängig ist. Die hohe anti-proliferative Wirkung der HDACi beruht vermutlich unter anderem darauf, dass HDACi sowohl die HDAC-Aktivität sich teilende, als auch sich nicht teilender Tumorzellen inhibiert (406). Ferner konnte beobachtet werden, dass die Reduktion der Proliferation aller parentaler GBM-Zellen bei gleichzeitiger Behandlung mit Erlotinib und HDACi immer stärker war, als die inhibitorische Wirkung von Erlotinib oder HDACi alleine (Abschnitts 4.8.1, Abbildung 44 und Abschnitt 4.8.1.2, Abbildung 46). Dies zeigt, dass die gleichzeitige Behandlung mit Erlotinib und HDACi zu einer additiven Inhibition der Proliferation führte. Interessanterweise konnte dieser additive Effekt von HDACi und Erlotinib nicht nur bei allen parentalen Zellen, sondern selbst bei den Erlotinib-resistenten Zelllinien BS153^{resE} und DK-MG^{resE} beobachtet werden (Abschnitts 4.8.1, Abbildung 44). Da Erlotinib alleine die Proliferation von BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zellen nicht signifikant beeinflusste, konnte durch diesen Versuch zudem erstmals gezeigt werden, dass Erlotinib-resistente, wtEGR-amplifizierte und EGFRvIII exprimierende GBM-Zellen durch die gleichzeitige Behandlung mit Erlotinib und HDAC gegenüber dem TKI sensitiviert werden können (Abbildung 58).

Ebenso wie die Behandlung mit HDACi, führte auch die Behandlung mit CUDC-101 zu einer Inhibition der Proliferation parentaler und Erlotinib-resistenter GBM-Zelllinien (Abschnitt 4.8.1, Abbildung 45 und Abschnitt 4.8.1.2, Abbildung 47). Die Reduktion der Proliferation durch CUDC-101 war in allen Fällen bereits ab einer Konzentration von 0,1 µM signifikant stärker als die inhibitorische Wirkung von Erlotinib. Dies belegt die zuvor gemachte Beobachtung, dass die simultane Inhibition von EGFR und HDAC zu einer additiven Reduktion der Proliferation führt. Die Wirkung von CUDC-101 konnte bereits in präklinischen Studien mit Brust-, Darm- und NSCLC-Zelllinien nachgewiesen werden (407, 408). Zudem konnte in einer ersten klinischen Phase I-Studie mit an soliden Tumoren erkrankten Patienten (Brustkrebs, Kopf und Nackentumore, NSCLC, SCLC, Ösophaguskarzinom, Kolorektalkrebs, Pankreaskrebs, Magenkrebs und Nierenkrebs), die Verträglichkeit von CUDC-101 nachgewiesen und die Inhibition der HDAC-Aktivität (Acetylierungsstatus des Histons (H) 3) durch den Inhibitor bestätigt werden (409). Die Behandlung von GBM-Zellen mit CUDC-101 zeigte ferner, dass die Proliferation parentaler und Erlotinib-resistenter Zellen auch nach einer sechstägigen Behandlung mit den HDACi oder CUDC-101 gehemmt wurde (Abschnitts 4.8.1). Dies ist ein Indiz dafür, dass keine der getesteten Zelllinien eine Resistenz gegenüber den HDACi oder CUDC-101 entwickelte.

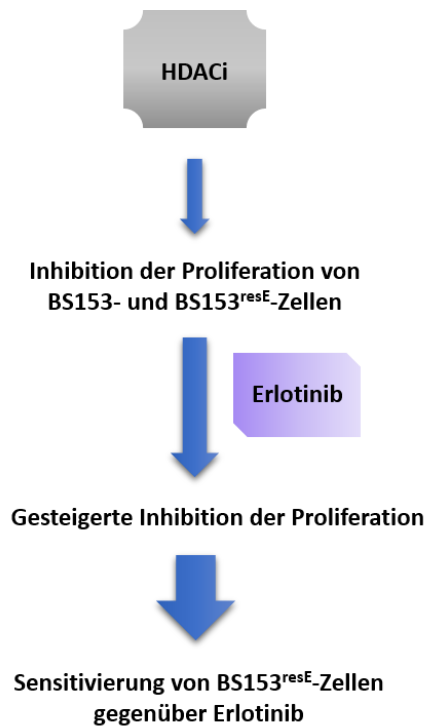


Abbildung 58 Einfluss von HDACi auf die Proliferation von BS153- und BS153^{resE}-Zellen. Durch die Behandlung von BS153- und BS153^{resE}-Zellen mit HDACi ist es möglich die Proliferation der Zellen zu inhibieren. Der inhibitorische Effekt der HDACi kann durch die zusätzliche Behandlung mit Erlotinib gesteigert werden. Bemerkenswerter Weise ist es durch die gleichzeitige Behandlung mit HDACi und Erlotinib zudem möglich BS153^{resE}-Zellen gegenüber dem TKI zu sensitivieren.

Insgesamt zeigen diese Versuchsergebnisse, dass durch die gleichzeitige Inhibition der EGFR- und der HDAC-Aktivität durch Erlotinib und HDACi oder durch CUDC-101 die Proliferation von wtEGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden parental Zellen additiv inhibiert und die Ausbildung einer TKI-Resistenz unterbunden werden kann. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine bereits vorhandene Erlotinib-Resistenz durch die kombinatorische Behandlung mit Erlotinib und HDACi überwunden werden kann.

Ähnliche Beobachtungen konnten unter anderem auch von Bruzzese et al. gemacht werden, welche zeigen konnten, dass die gleichzeitige Behandlung von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs (squamous cell carcinoma of the head and neck, SCCHN) und von Gefitinib-resistenten SCCHN-Zellen mit SAHA und dem TKI Gefitinib zu einer additiven Inhibition der Proliferation, Migration und Invasion sowie zu einer gesteigerten Apoptoserate der Zellen führte. Zudem konnte gezeigt werden, dass der grundlegende Mechanismus der synergetischen Wirkung des HDACi und des TKI auf einer Modulation der Expression von Proteinen der ErBb-Familie durch SAHA beruhte. Eine Behandlung der SCCH-Zelllinie CAL27-Zellen mit SAHA führte beispielsweise zu einer Herunterregulation der EGFR-, ErbB2- und ErbB3-Expression sowie zu einer Inhibition der EGFR-vermittelten Signaltransduktion. In Gefitinib-resistenten SCCHN-Zellen (KB- und Hep2-Zellen) induzierte SAHA sowohl eine verminderte EGFR- und ErbB2-Expression als auch eine gesteigerte Expression von ErbB3, was zu einer Umkehrung der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (epithelial-mesenchymal transitions, EMT) führte (410).

LaBonte et al. konnte ferner einen synergetischen Effekt des HDACi Panobinostat (LBH589) und des dualen EGFR/HER2-Inhibitors Lapatinib in Kolorektalkrebszellen (colorectal cancer cells, CRC) nachweisen. Die Behandlung mit Panobinostat und Lapatinib führte in allen getesteten CRC-Zelllinien zu einer additiven Inhibition der Proliferation und der Kolonienformation (Maß für die *in vitro*-Tumorigenität), welche auf einer gesteigerten Apoptoserate und einer Reduktion der EGFR-vermittelten Signaltransduktion (PI3K-Akt- und Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg) beruhte. Die Behandlung mit Panobinostat führte ferner zu einer Reduktion der EGFR-, HER2- und HER3-Translation und Proteinexpression (411).

Edwards et al. konnten in einer weiteren Studie mit Panobinostat zeigen, dass die kombinierte Behandlung von Lungenkrebszellen mit Erlotinib und dem HDACi zu einer synergetischen Inhibition der Zellvitalität führte. Ursächlich für diesen Effekt scheinen vor allem eine gesteigerte Acetylierung von HSP90 und eine erhöhte Apoptoserate zu sein, welche durch die Behandlung mit Panobinostat induziert wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Auswirkungen einer Panobinostat-Behandlung insbesondere in Lungenkrebszellen mit einer aktivierenden EGFR-Mutation zu beobachten waren, wohingegen eine etwa 10fach höhere Panobinostat-Konzentration benötigt wurde, um die gleichen Effekte in Lungenkrebszellen ohne aktivierende EGFR-Mutation hervorzurufen (412).

Trotz dieser vielversprechenden klinischen Daten wurde eine Phase I/II Studie, welche die Wirkung einer kombinierten Vorinostat (SAHA)-Erlotinib-Behandlung bzw. einer Vorinostat (SAHA)-Erlotinib-TMZ-Behandlung von Patienten mit anaplastischen Gliomen und GBM-Rezidiven untersuchen sollte, auf Grund unerwarteter Nebenwirkungen abgebrochen (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01110876) (241).

5.8.2 Einfluss von HDACi auf die Migration von GBM Zellen

Da die Überexpression von wtEGFR/EGFRvIII mit einem besonders invasiven und somit hoch migratorischem GBM-Phänotyp assoziiert ist (343, 344) sollte eine GBM-Therapie idealerweise nicht nur die Proliferation, sondern auch die Migration von GBM-Zellen inhibieren. Um den Einfluss einer HDACi-Behandlung, sowie einer CUDC-101-Behandlung und einer kombinierten HDACi-Erlotinib-Therapie auf die Migration von GBM-Zellen zu untersuchen, wurde sowohl die ungerichtete als auch die EGF-gerichtete Migration von HDACi-behandelten parentalen und Erlotinib-resistenten GBM-Zellen (BS153/BS153^{resE}, DK-MG/DK-MG^{resE}, U87MG und 0627) analysiert (Abschnitts 4.8.2). Die HDACi-Behandlung von parentalen GBM-Zellen führte, unabhängig vom wtEGFR/EGFRvIII-Status der Zellen (Tabelle 17), überraschender Weise nicht zu einer Inhibition sondern teilweise sogar zu einer leichten Stimulation der Migration (Abbildung

48). Die Migration parentaler Zelllinien konnte jedoch durch eine kombinierte Behandlung mit Erlotinib und HDACi bzw. durch eine CUDC-101-Behandlung auf ein basales Niveau gesenkt werden (Abbildung 48 A). Auf die Migration der resistenten Zelllinien BS153^{resE} und DK-MG^{resE} hatte CUDC-101 bzw. eine kombinierte HDACi-Erlotinib-Therapie hingegen keinen Einfluss (Abbildung 48 B). Somit konnte, anders als zuvor für die Zellproliferation beschrieben (Abschnitt 4.8.1), durch eine kombinierte Inhibition der HDAC- und EGFR-Aktivität keine additive Inhibition der Migration und somit auch keine Sensitivierung Erlotinib-resistenter Zellen gegenüber dem TKI erzielt werden.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Beobachtungen von Wang et al., welche zeigen konnten, dass die Migration von TKI-resistenten NSCLC und Brustkrebszellen durch die Behandlung mit CUDC-101 inhibiert werden konnte. Es wurde jedoch nicht geklärt, ob der inhibitorische Effekt von CUDC-101 auf einer Veränderung der Histonacetylierung und/oder auf der Inhibition der EGFR-Aktivität beruhte (408). Zhou et al. konnten ferner zeigen, dass die Behandlung von Ovarialkarzinomzellen (Caov3) mit TSA zu einer Reduktion der Zellmigration führte, wobei der anti-migratorische Effekt des HDACi durch die gleichzeitige Behandlung mit EGFR- oder PI3K-Inhibitoren gesteigert werden konnte. Interessanterweise konnten Zhou et al. jedoch auch zeigen, dass die Behandlung mit TSA zu einer gesteigerten Phosphorylierung und somit Aktivierung von EGFR und Akt führte (413, 414). Ähnliche Ergebnisse konnten auch von Song et al. erzielt werden, welche zeigen konnten, dass die Behandlung epidermoider Karzinom-Zellen (A431) mit SAHA oder TSA zu einer CBP (CREB-Bindungsprotein) Acetyltransferase vermittelten Acetylierung von EGFR (Lysinreste: K684, K836 und K843) und in Folge dessen zu einer gesteigerten Phosphorylierung des EGFR führte (413, 414). Diese Beobachtung könnte auch eine mögliche Erklärung für die Stimulation der GBM-Zellenmigration durch HDACi sein (Abschnitt 4.8.1).

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieses Abschnitts, dass die Migration von EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden parentalen und Erlotinib-resistenten GBM-Zellen durch eine HDACi-Behandlung nicht inhibiert werden konnte. Zudem konnte die Migration von Erlotinib-behandelten GBM-Zellen durch die zusätzliche Inhibition der HDAC-Aktivität nicht weiter reduziert werden. Somit scheint die Aktivität der EGF-Rezeptoren, nicht aber die der HDAC für die Migration von GBM-Zellen von Bedeutung zu sein. Das beobachtete Unvermögen der verschiedenen HDACi die Migration zu inhibieren, ist jedoch möglicherweise eine Erklärung dafür, dass HDACi keinen oder nur einen geringen Effekt bei der Behandlung von GBM-Rezidiven zeigten. Obwohl SAHA (Vorinostat) von GBM-Patienten gut toleriert wird und es bereits zur Behandlung von T-Zell-Lymphomen mit Manifestationen in der

Haut (cutaneous T cell lymphoma, CTCL) angewandt wird, konnte seine Wirksamkeit bei der Behandlung von GBM bisher nicht nachgewiesen werden. In einer Phase II-Studie mit GBM-Rezidiv-Patienten konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Monotherapie mit SAHA lediglich zu einer geringfügigen jedoch nicht signifikanten Erhöhung der progressionsfreien Phase führte (227). Zudem stellte sich in einer weiteren Phase II-Studie mit GBM-Rezidiv-Patienten heraus, dass eine kombinierte Behandlung mit SAHA und dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib klinisch unwirksam ist (415). GBM-Rezidiv-Patienten welche mit dem HDACi Romidepsin behandelt wurden, zeigten ebenfalls lediglich eine leichte jedoch nicht signifikante Erhöhung der Überlebensdauer (416).

5.8.3 Einfluss von HDACi auf den wtEGFR/EGFRvIII und den Histonacetylierungsstatus von GBM Zellen

Um die molekularbiologischen Auswirkungen einer HDACi-Therapie zu untersuchen, wurden der Histonacetylierungs- und der wtEGFR/EGFRvIII-Status von HDACi-, CUDC-101- und HDACi-Erlotinib-behandelten GBM-Zelllinien (BS153/BS153^{resE}, DK-MG/DK-MG^{resE} sowie U87MG und 0627) untersucht (Abschnitt 4.8.3). Während die Acetylierung von Histon 3 (H3) durch alle getesteten HDACi (SAHA, Scriptaid, MS275 und TSA) bereits nach 4 Stunden deutlich gesteigert wurde, hatte die HDACi-Behandlung keinen Einfluss auf die Expression und Aktivität von wtEGFR und EGFRvIII (Abbildung 49). Ein umgekehrtes Bild zeigte sich bei der Behandlung der Zellen mit Erlotinib, welches die Histonacetylierung nicht beeinflusste aber wie zu erwarten die Aktivierung von wtEGFR/EGFRvIII inhibierte.

Der kombinierte EGFR/HER2-HDAC-Inhibitor CUDC-101, induzierte einerseits die Acetylierung von H3 und inhibierte andererseits die Phosphorylierung von wtEGFR und EGFRvIII, wobei die Wirkung von CUDC-101 auf die Aktivität der Rezeptoren verglichen mit Erlotinib, entweder gleich stark (BS153, DK-MG, U87MG, 0627, Abbildung 50 A, C und D) oder aber stärker war (BS153^{resE} und DK-MG^{resE}, Abbildung 50 B). Somit induzierte CUDC-101 in GBM-Zellen sowohl die Effekte eines HDACi, als auch die einer Erlotinib-Behandlung. Die starke Wirkung von CUDC-101 auf die Histonacetylierung und die Inhibition von wtEGFR/EGFRvIII ist eine mögliche Erklärung für die überaus effektive Inhibition der Proliferation von parentalen und Erlotinib-resistenten GBM-Zellen durch CUDC-101 (Versuch 4.8.1, Abbildung 45 und Abbildung 47).

Die Untersuchung der Auswirkungen einer 144stündigen SAHA-Behandlung von parentalen und Erlotinib-resistenten GBM-Zellen (BS153/BS153^{resE}, GS-27 und GS-30) zeigte, dass die Behandlung mit dem HDACi nach 24 Stunden zu einer starken Herunterregulation der wtEGFR-

und EGFRvIII-Proteinexpression führte (Abschnitt 4.8.3.1, Abbildung 51). Dieser Effekt nahm in dem untersuchten Beobachtungszeitraum weiter zu, bis nach 144 Stunden nur noch sehr geringe Mengen der beiden Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Bemerkenswerterweise konnte die Herunterregulation von wtEGFR und EGFRvIII nicht nur in parental GBM-Zellen (Abbildung 51 A, C, D) sondern auch in BS153^{resE}-Zellen (Abbildung 51 B) beobachtet werden, welche eine Überexpression des EGFRvIII aufweisen (Abbildung 59).

Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch die Untersuchung der wtEGFR- und EGFRvIII-RNA Menge. Es zeigte sich, dass die RNA-Menge der beiden Rezeptoren nach einer 24stündigen Behandlung mit SAHA in BS153- und BS153^{resE}-Zellen stark herunterreguliert wurde (Abschnitt 4.8.3.2, Abbildung 52) (Abbildung 59).

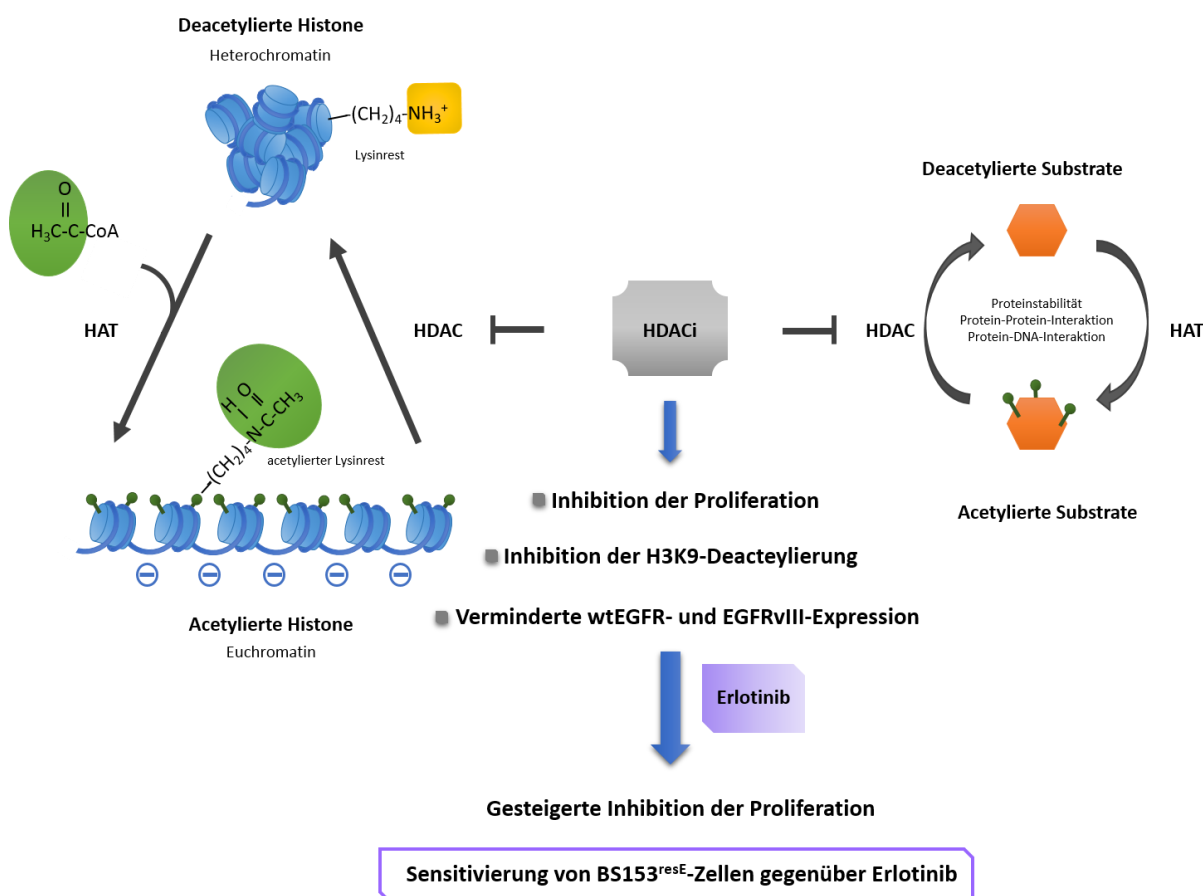


Abbildung 59 **Einfluss von HDACi auf BS153- und BS153^{resE}-Zellen.** Durch die Behandlung von BS153- und BS153^{resE}-Zellen mit HDACi ist es möglich die Proliferation der Zellen zu inhibieren. Durch die gleichzeitige Behandlung mit Erlotinib kann dieser Effekt gesteigert, und BS153^{resE}-Zellen können gegenüber dem TKI sensitiviert werden. Die Wirkung von HDACi beruht vermutlich auf einer verminderten Histon- und Protein-Deacetylierung. Es konnte ferner gezeigt werden, dass HDACi in der Lage sind die Expression von wtEGFR und EGFRvIII zu inhibieren, was vermutlich der Grund für die Sensitivierung von BS153^{resE}-Zellen gegenüber dem TKI ist.

Die Beobachtung, dass eine HDACi-Behandlung zu einer verminderten EGFR-Expression führt, konnte bereits in anderen Tumorentitäten gemacht werden. Chou et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Behandlung von Kolorektalkrebszellen mit SAHA zu einer Herunterregulation der

EGFR-Promotor-Aktivität und infolge dessen zu einer Reduktion der EGFR-mRNA, einer verminderten EGFR-Expression und in letzter Konsequenz zu einer geringen Zellvitalität führte (417). In Anbetracht des veränderten EGFRvIII-Status von BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zellen und der Beobachtung, dass die Behandlung mit HDACi innerhalb von 24 Stunden zu einer Herunterregulation des wtEGFR und EGFRvIII führte, ist es wahrscheinlich, dass die Sensitivierung von BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zellen gegenüber Erlotinib zumindest teilweise auf den durch HDACi induzierten veränderten wtEGFR/EGFRvIII-Status zurückzuführen ist. In der Literatur wird EGFRvIII bei einer gleichzeitigen Coexpression von PTEN (phosphatase and tensin homolog), als positiver prognostischer Marker für eine TKI-Therapie von GBM-Patienten beschrieben (167). In einer Phase I-Studie mit Gliom-Patienten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Erfolg einer Erlotinib-Therapie mit der Amplifikation und Überexpression von EGFR und einer niedrigen Akt-Phosphorylierungsrate assoziiert ist (365). Diese Beobachtungen widersprechen jedoch einer Phase II-Studie mit GBM-Rezidiv-Patienten, welche zeigte, dass kein Zusammenhang zwischen der Expression von EGFRvIII und PTEN und dem positiven Ansprechen auf eine Erlotinib-Behandlung besteht (198). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass EGFRvIII in Erlotinib-resistenten BS153- und DK-MG-Zellen, im Vergleich zu den jeweiligen parental Zellen, stark hochreguliert ist (Abschnitt 4.3.2-4.3.5). Da BS153^{resE}- und DK-MG^{resE}-Zellen nach dem Knockdown von EGFRvIII sensitiv auf eine Erlotinib-Behandlung reagierten, konnte ferner ein direkter Zusammenhang zwischen der Erlotinib-Resistenz von BS153- und DK-MG-Zellen und der Überexpression von EGFRvIII gezeigt werden (Abschnitt 4.7.1).

5.9 Ausblick

Auf der Basis des aktuellen Kenntnisstandes und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eröffnen sich potenzielle therapeutische Perspektiven. In dieser Arbeit konnte unter anderem gezeigt werden, dass der Knockdown der katalytischen p110 δ -Untereinheit der PI3K *in vitro* zu einer Sensitivierung Erlotinib-resistenter, EGFR-amplifizierter und EGFRvIII-exprimierender GBM-Zellen gegenüber dem TKI führte. Da PI3K(p110 δ) nicht von gesundem Gehirngewebe exprimiert wird stellt die gleichzeitige Inhibition der PI3K(p110 δ)-Aktivität während einer Erlotinib-Therapie eine interessante Möglichkeit dar, um die Bildung von Erlotinib-Resistenzen zu verhindern oder um vorhandene Resistenzen zu umgehen. Zu den bekanntesten PI3K(p110 δ)-Inhibitoren zählt CAL-101 (small molecule inhibitor), welches die Kinaseaktivität der katalytischen Untereinheit

inhibiert und sich derzeit in klinischen Studien zur Behandlung von Lymphomen befindet (396, 398, 402). In weiteren *in vitro* und *in vivo* Versuchen sollte daher die Wirkung einer kombinierten Erlotinib-CAL-101-Therapie untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die Behandlung von EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-positiven GBM-Zellen mit HDACi zu einer Herunterregulation der wtEGFR- und EGFRvIII-Expression führte. Zudem konnte durch die simultane Inhibition der HDAC- und EGFR-Aktivität durch eine HDACi-Erlotinib-Therapie bzw. durch eine Behandlung mit dem Kombinierten EGFR/HER2-HDAC-Inhibitor CUDC-101 eine Sensitivierung EGFR-amplifizierter und EGFRvIII-positiver GBM-Zellen gegenüber dem TKI erzielt werden. In weiteren Abreiten sollte daher die Effizienz einer CUDC-101-Therapie in *in vivo*-Xenograft-Versuchen bestimmt werden. In präklinischen Studien mit Brust-, Darm- und NSCLC-Zelllinien konnte die Wirkung von CUDC-101 bereits bestätigt und die Verträglichkeit des Präparats in einer ersten klinischen Phase I-Studie mit an soliden Tumoren erkrankten Patienten (Brustkrebs, Kopf und Nackentumore, NSCLC, SCLC, Ösophaguskarzinom, Kolorektalkrebs, Pankreaskrebs, Magenkrebs und Nierenkrebs) nachgewiesen werden (409). Ob sich die positiven *in vitro* Ergebnisse in weiteren klinischen Studien bestätigen bleibt abzuwarten. Parallel zu der vorliegenden Arbeit wurde eine Phase I/II Studie mit anaplastischen Gliompatienten durchgeführt um die Verträglichkeit und Wirkung einer kombinierten Vorinostat (SAHA)-Erlotinib-Behandlung bzw. einer Vorinostat (SAHA)-Erlotinib-TMZ-Behandlung zu untersuchen, welche jedoch aufgrund unerwarteter starker Nebenwirkungen abgebrochen werden musste (241).

Neben der Identifikation der Mechanismen einer Erlotinib-Resistenz, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Bedeutung des EGFR-Status für die GBM-Initiierung untersucht. In *in vivo*-Experimenten mit RGB-markierten BS153-Zellen, welche eine Amplifikation des EGFR-Gens aufweisen und zudem EGFRvIII exprimieren, zeigte sich, dass BS153-RGB-Xenograft-Tumore vermutlich lediglich von einigen wenigen tumorigenen Zellen induziert wurden. In zukünftigen Arbeiten sollte das Gen- und das Protein-Profil der tumorinitiierenden Klone untersucht werden. Zudem sollten weitere *in vivo*-Versuchen mit unterschiedlich markierten, definierten Klonen, deren Expressionsprofil bekannt ist durchgeführt werden. Auf diese Weise können in zukünftigen Abreiten weitere Schlüsse hinsichtlich der Bedeutung des wtEGFR/EGFRvIII-Status sowie anderer Gene/Proteine für die Tumorigenität von Zellen gezogen werden. Die bereits durchgeführten Versuche lassen einen Zusammenhang zwischen der Amplifikation von EGFR und Tumorstammzellen vermuten. Eine typische Eigenschaft von Tumorstammzellen (TSZ) ist neben einer inhärenten Teilungsfähigkeit und der

Resistenz gegenüber einer Radio- und Chemotherapie auch die Fähigkeit zu disseminieren. Entgegen früheren Arbeiten konnte in jüngsten Studien gezeigt werden, dass fast jeder dritte GBM-Patient zirkulierenden Tumorzellen (CTC) aufweist und dass diese zudem häufig eine Amplifikation des EGFR-Gens aufweisen (74). Diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen CTC, TSZ und der Amplifikation von EGFR vermuten. Vor diesem Hintergrund, könnte eine effiziente EGFR-gerichtete Therapie und somit die Ergebnisse dieser Arbeit, zukünftig an Bedeutung für die Entwicklung von TSZ-gerichteten GBM-Therapien gewinnen.

6 Zusammenfassung

Glioblastome (GBM) sind die häufigsten, aggressivsten und malignesten humanen Hirntumore. Eine besonders häufig auftretende und für primäre GBM charakteristische Aberration ist die Überexpression des EGFR, welche auf einer gesteigerten Translation und/oder auf einer Amplifikation des EGFR-Gens beruhen kann und häufig mit der Expression des konstitutiv aktiven Deletionsmutante EGFRvIII verbunden ist. In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe unterschiedlichster EGFR-gerichteter Therapien entwickelt, wie beispielsweise EGFR-spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und Antikörper (mAB). Da GBM-Patienten jedoch häufig Resistenzen gegenüber diesen Therapeutika entwickeln, konnten anfänglich positive präklinische-Ergebnisse in klinischen Studien nicht bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe des Modellsystems der EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zelllinie BS153 die Bedeutung des wtEGFR und EGFRvIII für die GBM-Tumorinitiierung sowie der Einfluss der EGFR-Amplifikation und der EGFRvIII-Expression auf die Wirkung von EGFR-gerichteten Therapien und die Bildung von TKI-Resistenzen untersucht werden.

In *in vivo*-Xenograftversuchen mit individuell fluoreszenzmarkierten BS153-Zellen (RGB-Markierung) konnte gezeigt werden, dass BS153-Tumore im Gegensatz zu U87MG-Tumoren, welche keine EGFR-Amplifikation aufweisen und EGFRvIII-negativ sind, aus wenigen, EGFR-positiven Klonen (< 8) mit Tumorinitiierungseigenschaften hervorgegangen sind. Dieses Ergebnis bestätigt die These der Tumorstammzellen (TSZ) und unterstreicht die Bedeutung von EGFR für Tumorstammzellen.

Die Behandlung von BS153-Zellen mit den TKI Erlotinib und Gefitinib führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation und -migration, wohingegen der mAK Cetuximab keine inhibitorische Wirkung zeigte. Durch die chronische Behandlung der Zellen mit Erlotinib konnte eine Erlotinib-resistente Zelllinie (BS153^{resE}) generiert werden, welche verglichen mit der parentalen Zelllinie eine Hochregulation des EGFRvIII-Proteinexpression sowie eine Herunterregulation des wtEGFR (auf mRNA- und Proteinebene) aufwies. Die EGFR-Amplifikation von BS153^{resE}-Zellen war im Vergleich zu BS153-Zellen hingegen unverändert. Durch EGFRvIII-Knockdown-Experimente mit BS153^{resE}-Zellen konnte gezeigt werden, dass EGFRvIII an der Steuerung des PI3K-Akt- und des Ras-Raf-MEK-Erk-Signalwegs beteiligt ist. Die zentrale Bedeutung von EGFRvIII für BS153^{resE}-Zellen wurde ferner durch die Beobachtung verdeutlicht, dass der Knockdown von EGFRvIII zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Erlotinib führte.

In *in vivo*-Experimenten mit immundefizienten Mäusen waren BS153^{resE}-Zellen ebenso wie BS153-Zellen tumorigen und induzierten invasive Tumore, wobei der wtEGFR/EGFRvIII-Phänotyp

in vivo erhalten blieb. Die chronische Erlotinib-Behandlung von RGB-markierten BS153-Zellen zeigte, dass die Erlotinib-resistente BS153^{resE}-Zelllinie vermutlich nicht aufgrund einer klonalen Selektion, sondern vielmehr infolge einer Veränderung der Genexpression aus der parentalen BS153-Zelllinie hervorgegangen ist. Neben einem veränderten wtEGFR/EGFRvIII-Status wiesen BS153^{resE}-Zellen zudem eine erhöhte Expression der katalytischen p110 δ Untereinheit der PI3K und eine verminderte Expression von PTEN, dem wichtigsten negativen Regulator des PI3K-Akt-Signalwegs auf. Der Knockdown von PI3K(p110 δ) führte zu einer verminderten Proliferation von BS153- und BS153^{resE}-Zellen und bemerkenswerterweise zu einer Sensitivierung von BS153^{resE}-Zellen gegenüber Erlotinib. Da PI3K(p110 δ) nicht von gesundem Gehirngewebe exprimiert wird, stellt die Inhibition der PI3K(p110 δ) einen interessanten Ansatzpunkt für die Umgehung erworbener Erlotinib-Resistenzen dar.

Eine Möglichkeit, die Effizienz von EGFR-gerichteten Therapien zu erhöhen, ist Modulation der EGFR-Expression über epigenetische Mechanismen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von BS153- und BS153^{resE}-Zellen mit Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) zu einer starken Herunterregulation der wtEGFR- und EGFRvIII-Expression sowie zu einer Inhibition der Zellproliferation, nicht aber der Migration führte. Zudem konnte durch die gleichzeitige Inhibition der HDAC- und EGFR-Aktivität durch HDACi und Erlotinib eine additive Inhibition der Proliferation von BS153- und BS153^{resE}-Zellen erzielt werden. Somit führte die simultane Behandlung von BS153^{resE}-Zellen mit HDACi und Erlotinib zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber dem TKI.

Zusammenfassend scheinen die Hochregulation des EGFRvIII und der PI3K(p110 δ) sowie die Herunterregulation des wtEGFR, zentrale Mechanismen der Erlotinibresistenz von EGFR-amplifizierten und EGFRvIII-exprimierenden GBM-Zellen zu sein. Zudem stellen die Inhibition der PI3K(p110 δ) sowie die epigenetische Modulation der wtEGFR/EGFRvIII-Expression durch HDACi vielversprechende Ansatzpunkte dar, um Resistenzen gegenüber Erlotinib zu verhindern und zu überwinden.

6.1 Summary

Glioblastoma is the most frequent, aggressive and malignant human brain tumor. One of the most common characteristic aberration of primary GBM is the overexpression of EGFR which is caused by increased translation and/or an amplification of the EGFR gene and is often associated with the expression of the constitutive active deletion variant EGFRvIII. In the past few years different EGFR-specific therapies such as EGFR specific tyrosine kinase inhibitors (TKI) and antibodies (mAB) were developed. Because glioblastoma patients do often not respond or develop resistance against these therapeutics, initial positive preclinical results could not be confirmed in clinical studies. In the present study the impact of wtEGFR and EGFRvIII on GBM initiation as well as the influence of EGFR amplification and EGFRvIII expression on the efficacy of EGFR-specific therapies and the development of TKI resistance was analyzed using EGFR amplified and EGFRvIII expressing GBM model cell lines.

Using *in vivo* xenograft experiments with individually fluorescence-labeled BS153 cells (RGB marking), it was demonstrated that in contrast to U87MG tumors, which showed no EGFR amplification and were EGFRvIII negative, BS153 tumors were only induced by a limited number of EGFR positive clones (< 8) with tumor initiation capacity. This supports the thesis of cancer stem cells and highlights the impact of EGFR on cancer stem cells.

Treatment of BS153 cells with the TKIs erlotinib and gefitinib induced a significant reduction of cell proliferation and migration whereas mAB cetuximab showed no inhibitory effect. Chronical treatment of BS153 cells with erlotinib, led to erlotinib resistant cell line (BS153^{resE}), which showed increased EGFRvIII protein expression and reduction of wtEGFR (mRNA and protein) compared to the parental cell line. In contrast, the EGFR amplification of BS153^{resE} cells was not changed in comparison to BS153 cells. EGFRvIII knock down experiments with BS153^{resE} cells showed, that EGFRvIII contributes to the regulation of the PI3K-Akt- and the Ras-Raf-MEK-Erk signaling pathway. The central importance of EGFRvIII for BS153^{resE} cell was further elucidated by the observation that the knock down of EGFRvIII caused a resensitization to erlotinib.

In *in vivo* experiments with immune deficient mice, BS153 and BS153^{resE} cells were tumorigenic and induced invasive tumors, whereas the wtEGFR/EGFRvIII phenotype was preserved. Chronic erlotinib treatment of RGB labeled BS153 cells showed, that the erlotinib resistant cell line BS153^{resE} emerged from parental BS153 cell by a modification of gene expression and not by clonal selection. Besides a modified wtEGFR/EGFRvIII status, BS153^{resE} cells showed increased expression of the catalytic p110 δ subunit of PI3K and decreased expression of PTEN, the most important negative regulator of the PI3K-Akt signaling pathway. The knock down of PI3K(p110 δ) caused a decrease cell proliferation and a resensitization of BS153^{resE} cells to Erlotinib. Because

PI3K(p110 δ) is not expressed by healthy brain tissue, the inhibition of PI3K(p110 δ) is an interesting and promising new treatment approach to overcome acquired erlotinib resistance.

One possibility to increase the efficacy of EGFR targeted therapy is the modulation of EGFR expression by epigenetic mechanisms. The present study demonstrates that the treatment of BS153 and BS153^{resE} cells with histone deacetylase inhibitors (HDACi) results in reduced wtEGFR and EGFRvIII expression as well as decreased proliferation, whereas cell migration is not affected by HDACi treatment. Importantly, the simultaneous inhibition of EGFR and HDAC activity by Erlotinib and HDACi caused an additive inhibition of BS153 and BS153^{resE} proliferation. Therefore, it was possible to sensitize BS153^{resE} cell to Erlotinib by parallel treatment with HDAC and the TKI.

In summary, the upregulation of EGFRvIII and PI3K(p110 δ) seem to be central mechanisms of the erlotinib resistance of EGFR amplified and EGFRvIII expressing GBM cells. Furthermore, the inhibition of PI3K(p110 δ) as well as the epigenetic modulation of wtEGFR/EGFRvIII expression by HDACi are promising treatment approaches to prevent and overcome erlotinib resistance.

7 Anhang

7.1 Materialien

7.1.1 Laborgeräte

Die während der Promotion verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Anwendungsbereich: Zellkultur und sonstige	
Bezeichnung	Hersteller
Design Reiskocher Pro 42518	Gastroback GmbH, Hollenstedt
Durchflussszytometer PAS	Partec GmbH, Münster
FACSAria™ III	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Floureszenzlampe	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Fluoreszenzlampe "HBO 50"	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop "Axioskop"	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop "DM IL"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskop "DM IRB"	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Partec PAS Durchflussszytometer	Sysmex, Norderstedt
pH Meter "CG820"	Schott-Geräte GmbH, Ludwigshafen
Präzisionswaage "440-33"	Kern Sohn GmbH, Balingen
Power Pac 200	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Schüttler "Polymax"	Heidolph GmbH, Schwabach
Shaker Incubator Series 25	New Brunswick Scientific Co., Inc., New Jersey, USA
Sicherheitswerkbank HeraSafe Klasse 2	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Tisch-Kühlzentrifuge "Biofuge Fresco"	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
Tisch-Zentrifuge "Minispin"	Eppendorf AG, Hamburg
Vibratom, VT1000S	Leica
Vortex	Heidolph GmbH, Schwabach
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Zellkulturbrutschrank HeraCell	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund
Zentrifuge "Centrifuge 5810"	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge "Megafuge 1.0R"	Heraeus GmbH, Bad Grund
-80°C Kühltruhe	Kryotec GmbH, Hamburg
Anwendungsbereich: RNA-Präparation	
Bezeichnung	Hersteller
FlexCycler Thermal Cycler	Analytik Jena AG, Jena
Anwendungsbereich: cDNA-Präparation	
Bezeichnung	Hersteller

FlexCycler Thermal Cycler	Analytik Jena AG, Jena
Anwendungsbereich: Real-Time-PCR-Analysen	
Bezeichnung	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Anwendungsbereich: in vivo-Tierversuche	
Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterspritze zur Injektion	Hamilton
Mikrotom „SM 2000R“	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Tabelle 19: Laborgeräte

7.1.2 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 20 sind alle verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet

Bezeichnung	Hersteller
Cell Scraper 16 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Combitips advanced (0,1 / 0,5 / 1 / 2,5 / 5 / 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips Plus (1 / 5 / 12,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalspritzen „Injekt“ (1 / 5 / 10 / 20 ml)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf Reagiergefäße (0,5 / 1,5 / 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Cellstar-Gefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filtermembranen Polycarbonat	Neuro Probe, Gaithersburg, Maryland, USA
Fluoromount-G®	SouthernBiotech
Glasgeräte (Bechergläser, Kolben etc.)	Schott-Duran, Mainz
anti-Maus IgG Microbeats	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Immobilon-P Transfer Membran (PVDF-Membran), Porengröße 0,45 µm	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Kulturplatten 35 x 10 mm „Falcon“	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Kulturplatten 100 x 20 mm „Falcon“ ERGÄNZEN	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Kryoröhrchen „Cryo Pure“ (1,6 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
MiniMACS™ MS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mini-PROTEAN® TGX™ Gels (4-15%)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Multiwell „Primaria“ Flat Bottom 6-Well „Falcon“	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Neubauer Zählkammer	Rudolf Brand GmbH & Co., Wertheim
Nunc™ MicroWell™ 96-Well-Platten	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Objektträger SuperFrost®	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Pipettenspitzen (10 / 200 / 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten Biosphere® Filter Tips (10 / 20 / 200 / 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten „Falcon“ (2 / 5 / 15 / 25 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Sterile Spitzenvorsatzfilter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
T-25 Zellkulturflaschen "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
T-25 "Primaria" Tissue Culture Plates "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
T-75 Zellkulturflaschen "Cellstar"	Greiner Bio One, Frickenhausen
T-75 "Primaria" Tissue Culture Plates "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
T-175 Zellkulturflaschen "Falcon"	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA
96-well Platte für qPCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Whatman Benchkote and Benchkote Plus Absorbent Papers (3MM)	Whatman International Ltd, Maidstone, GB
X-Ray Filme	Fuji Medical, Düsseldorf
Zellkulturplatten (96-well, 48-well, 24-well, 6-well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Tabelle 20 Verbrauchsmaterialien

7.1.3 Kits

In Tabelle 21 sind alle verwendeten Kits tabellarisch aufgeführt.

Kit / Array	Hersteller
NucleoSpin RNA XS	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin Tissue XS	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin Tissue	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin TriPrep	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
CellTiter-Glo®: Luminescent Cell Viability Assays	Promega, Fitchburg, USA
Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kits	R&D-Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 21 Kits

7.1.4 Chemikalien

In Tabelle 22 sind alle verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Produkt	Hersteller	Katalognummer
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt	1.00013
AlamarBlue™	Serotec, Düsseldorf	BUF012B
Alfazyme	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	L11-012
Ampicillin, Natriumsalz, lyophilisiert	Sigma-Aldrich, Steinheim	A9518
6-Aminonicotinamide (6-AN)	Sigma-Aldrich, Steinheim	A68203
Antibody Diluent Reagent Solution	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	003218
BioPrime DNA Labeling Systems	Invitrogen	18094-011
Bio-Spin 30 Tris Säule	Bio-Rad	732-6231
BSA, Fraction V, >99%	Sigma-Aldrich, Steinheim	A-3059

BSA, Fraction V	PAA Laboratories / GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, Frankreich	K41-001-100
Carboxy-H2DCFDA	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	C400
Cell Dissociation Solution, Non-enzymatic	Sigma-Aldrich, Steinheim	C5914
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt	102445
Citifluor antifading solution	Agar Scientific	AGR1320A
Citronensäure-Monohydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz	27490
Complete Mini EDTA-free (Protease Inhibitor Cocktail Tablet)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	11 836 170 001
Coomassie Brilliant Blue, R-250	Bio Rad, Hercules, CA, USA	161-0400
4',6-diamidino-2-phenylindole	Vector Laboratories	H-1200
4',6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim	D9542
Dichlormethan, Rotipuran®, ≥ 99,5%, p.a., HPLC grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	6053.2
Diff Quik Stain Set	Medion Diagnostics AG, Düringen, Schweiz	130832
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MP Biomedicals	196055
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim	D-9779
dNTP Set (100mM)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	10297-018
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim	E-4884
Recombinant Human Epithelial Growth Factor (EGF)	Peptrotech, Rocky Hill, NJ, USA	AF-100-15
Essigsäure (100%)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	2234.1000
Eosin (1%)	Sigma-Aldrich, Steinheim	45260
Ethanol (abs)	Merck KGaA, Darmstadt	1.00983
Ethanol (abs), Emplura, HPLC grade	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn	8.18760
Ethidiumbromid (1%)	Merck KGaA, Darmstadt	1.11608
Eukitt® Eindeckmedium	O. Kindler GmbH, Freiburg	
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	A15-151
Recombinant human Fibroblast Growth Factor (FGF)-basic	Peptrotech, Rocky Hill, NJ, USA	100-18B
Formalin Lösung (10%)	Sigma-Aldrich, Steinheim	HT501320
Gemcitacinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	G6423
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	23114
GlutaMAX (100x)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	35050-038
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim	G5516
Glycin, ≥99%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3908.2
hairpin-loop DNA	Sigma-Aldrich	
Heparin	Rotexmedica GmbH, Trittau	20283
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim	H-3375
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	24137-52-R
Lipofectamine RNAiMax-Reagent	Life Technologies	13778-075
Kaiser's Glycergelatine	Merck KGaA, Darmstadt	1.09242.0100
Kristallviolett	Merck KGaA, Darmstadt	115940
Magermilchpulver	Spinnrad GmbH, Bad Segeberg	2231018
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	M-1028
Hämalaun, Mayer's Hemalum Solution	Merck KGaA, Darmstadt	109249
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	M3148
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	65548
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck KGaA, Darmstadt	6268.0250
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt	106688
Natriumchlorid	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	1367.5000

Natriumcitrat Salz	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	38642
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim	L-4390
Natriumorthovanadat	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA	159564
Natriumpyruvat	Biochrom AG	L0473
Natronlauge, 1 mol/L (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt	1.09137
NovaRed Substrate Kit	Vector Labs, Burlingame, CA, USA	SK-4800
Oligo-dT Primer (mM)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany	
Ornidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim	05879
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim	P6148
PBS Tabletten	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA	2810307
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	15140-122
Presicion Plus Protein Standards, Dual Color	Bio Rad, CA, USA	161-0394
Puromycindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	P8833
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	21059
Retinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim	R2625
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim	R5000
RNase Out, Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	10777-019
Roti Block	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	A151.1
Salzsäure 1mol/L	Merck KGaA, Darmstadt	1.09057
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA	50004
Spectrum Orange-dUTP	Abbot Molecular, Inc	
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	34080
SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	34080
SuperScriptII Reverse Transcriptase	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	18064-014
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (10x)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	15558-026
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	10342-020
Temozolomid	Sigma-Aldrich, Steinheim	76899
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim	T1503
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt	
0,05% Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	25300-054
Tween-20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	37470
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (30%)	Merck KGaA, Darmstadt	107209
Ziegenserum	DakoDeutschland GmbH	X0907

Tabelle 22 Verwendete Chemikalien

7.1.4.1 EGFR-Inhibitoren

Folgende EGFR-spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren (Tabelle 23) und mAK (Tabelle 24) wurden verwendet:

Name	Hersteller	Bestellnummer
Erlotinib	LC Laboratories	E-4007
Gefitinib	LC Laboratories	G-4408

Tabelle 23 EGFR-spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren

Name	Hersteller	Bestellnummer
Cetuximab	Zu Verfügung gestellt von Eli Lilly and Company (ehemals ImClone Systems)	

Tabelle 24 EGFR-spezifische mAK

7.1.4.2 HDAC Inhibitoren

Im Folgenden sind alle verwendeten HDAC-Inhibitoren, sowie deren Eigenschaften tabellarisch aufgeführt (Tabelle 25).

Name	TSA	SAHA
Synonym	Trichostatin A	Vorinostat; Zolinza; Octanedioic acid hydroxyamide phenylamide
Chemische Formel	$C_{17}H_{22}N_2O_3$	$C_{14}H_{20}N_2O_3$
chemischer Name	[R-(E,E)]-7-[4-(Dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxo-2,4-heptadienamide	N1-hydroxy-N8-phenyl-octanediamide
Molekular Gewicht	302,37	264,33 g/mol
Klasse	Hydroxamate	Hydroxamate
Spezifität	Klasse I, IIa, IIb, IV (nicht HDAC8)	Klasse I, IIa, IIb, IV
Firma	Cal Biochem	Cayman Chemical Company
Bestellnummer	647926	10009929

Name	Scriptaid	MS-275
Synonym		Etinostat, SNDX-275, MS-27-275
Chemische Formel	$C_{18}H_{18}N_2O_4$	$C_{21}H_{20}N_4O_3$
chemischer Name	6-(1,3-Dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-hexanoic acid hydroxyamide	(Pyridin-3-yl)methyl 4-[(2-aminophenyl)carbamoyl]phenyl)methyl)-carbamate
Molekular Gewicht	326,36 g/mol	376,4 g/mol
Klasse	Hydroxamate	Benzamidine
Spezifität	N/A --> Alex klasse I	HDAC 1,3 (HDAC 8 marginal)
Firma	Cayman Chemical Company	US Biological
Bestellnummer	10572	M4693-15A

Name	CUDC-101
Synonym	
Chemische Formel	$C_{24}H_{26}N_4O_4$
chemischer Name	7-[[4-(3-Ethynylphenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yl]oxy]-N-hydroxyheptanamide
Molekular Gewicht	434,49 g/mol
Klasse	
Spezifität	Klasse I, IIa, IIb und EGFR, HER2
Firma	Sigma Aldrich
Bestellnummer	EPS003-5MG

Tabelle 25 Verwendete HDAC-Inhibitoren

7.1.5 PI3K Inhibitoren

Der folgende PI3K Inhibitor wurde verwendet:

PX-866 LC Laboratories (Bestellnummer: P-7501)

7.1.6 Lösungen und Puffer

Im Folgenden sind alle verwendeten Lösungen und Puffer tabellarisch aufgeführt (Tabelle 26).

Bezeichnung	Zusammensetzung
Citratpuffer (10 mM, pH 6,0)	27 mL Stammlösung A + 123 mL Stammlösung B + 1350 mL ddH ₂ O <u>Stammlösung A:</u> 0,1 M Citronensäure-Monohydrat in dest. H ₂ O <u>Stammlösung B:</u> 0,1 M Natriumcitrat in dest. H ₂ O
Coomassie-Lösung	0,077 % (w/v) Coomassie 25 % Isopropanol 10 % Eisessig in dest. H ₂ O
Lämmli-Puffer (10x)	0,1 M Tris/HCl, pH 7,4 50 % (v/v) β -Mercaptoethanol 25 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer	1,87 M Glycin 0,25 M Tris-HCl 1 % (w/v) SDS
TNT	0,15 M NaCl 10 mM Tris-HCl 0,05 % Tween 20
Transferpuffer	1,92 M Glycin 0,5 M Tris-HCl
Tris-Triton-Puffer (TPP)	0,05 M Tris 0,145 M NaCl 0,01 % Triton pH 7,6
Triton-X-Lysispuffer	1 % Triton Complete Protease Inhibitor (Roche) 2 mM Orthovanadat

Tabelle 26 Lösungen und Puffer

7.1.7 Medien für die Zellkultur

Nachfolgenden sind alle in der Zellkultur verwendeten Medien aufgelistet (Tabelle 27).

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1x), high glucose, GlutaMAX TM , Pyruvate	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	31966-021
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose, HEPES, no Phenol Red	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	21063-029
Neurobasal A-Medium (1x)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	52400-025

Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medium	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	10888-022
DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	14190-814
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt	25300-54

Tabelle 27 Medien für die Zellkultur

7.2 Ergebnisse der bioinformatischen RTK-Array-Auswertung

Tabelle 28 RTK-Array-Daten von BS153- und BS153^{resE}-Zellen

RTK-Array BS153-Zellen				RTK-Array BS153 ^{resE} -Zellen			
Koordinaten	Rezeptor-Familie	Rezeptor	Array-Werte	Koordinaten	Rezeptor-Familie	Rezeptor	Array-Werte
A 1	Reference Spots		10.811	A 1	Reference Spots		24.667
A 2	Reference Spots		14.883	A 2	Reference Spots		18.688
A 23	Reference Spots		14.815	A 23	Reference Spots		11.936
A 34	Reference Spots		14.035	A 34	Reference Spots		10.542
B 1	EGFR	EGFR	8.767	B 1	EGFR	EGFR	7.676
B 2	EGFR	EGFR	14.223	B 2	EGFR	EGFR	21.763
B 3	EGFR	ErbB2	1.105	B 3	EGFR	ErbB2	0.673
B 4	EGFR	ErbB2	0.720	B 4	EGFR	ErbB2	0.570
B 5	EGFR	ErbB3	0.522	B 5	EGFR	ErbB3	0.505
B 6	EGFR	ErbB3	0.508	B 6	EGFR	ErbB3	0.520
B 7	EGFR	ErbB4	0.450	B 7	EGFR	ErbB4	0.511
B 8	EGFR	ErbB4	0.480	B 8	EGFR	ErbB4	0.517
B 9	FGFR	FGF R1	0.530	B 9	FGFR	FGF R1	0.570
B 10	FGFR	FGF R1	0.541	B 10	FGFR	FGF R1	0.567
B 11	FGFR	FGF R2a	0.556	B 11	FGFR	FGF R2a	0.622
B 12	FGFR	FGF R2a	0.560	B 12	FGFR	FGF R2a	0.620
B 13	FGFR	FGF R3	0.497	B 13	FGFR	FGF R3	0.518
B 14	FGFR	FGF R3	0.519	B 14	FGFR	FGF R3	0.518
B 15	FGFR	FGF R4	0.477	B 15	FGFR	FGF R4	0.472
B 16	FGFR	FGF R4	0.484	B 16	FGFR	FGF R4	0.468
B 17	Insulin R	Insulin R	0.538	B 17	Insulin R	Insulin R	0.523
B 18	Insulin R	Insulin R	0.523	B 18	Insulin R	Insulin R	0.531
B 19	Insulin R	IGF-I R	0.546	B 19	Insulin R	IGF-I R	0.440
B 20	Insulin R	IGF-I R	0.562	B 20	Insulin R	IGF-I R	0.431
B 21	Axl	Axl	1.138	B 21	Axl	Axl	0.590
B 22	Axl	Axl	1.158	B 22	Axl	Axl	0.622
B 23	Axl	Dtk	0.560	B 23	Axl	Dtk	0.455

B 24	Axl	Dtk	0.567
C 1	Axl	Mer	0.572
C 2	Axl	Mer	0.624
C 3	HGF R	HGF R	0.547
C 4	HGF R	HGF R	0.525
C 5	HGF R	MSP R	0.556
C 6	HGF R	MSP R	0.530
C 7	PDGF R	PDGF R α	0.461
C 8	PDGF R	PDGF R α	0.474
C 9	PDGF R	PDGF R β	0.628
C 10	PDGF R	PDGF R β	0.643
C 11	PDGF R	SCF R	0.516
C 12	PDGF R	SCF R	0.503
C 13	PDGF R	Flt-3	0.464
C 14	PDGF R	Flt-3	0.463
C 15	PDGF R	M-CSF R	0.584
C 16	PDGF R	M-CSF R	0.606
C 17	RET	c-Ret	0.509
C 18	RET	c-Ret	0.508
C 19	ROR	ROR1	0.521
C 20	ROR	ROR1	0.498
C 21	ROR	ROR2	0.712
C 22	ROR	ROR2	0.657
C 23	Tie	Tie-1	0.539
C 24	Tie	Tie-1	0.540
D 1	Tie	Tie-2	0.553
D 2	Tie	Tie-2	0.537
D 3	NGF R	TrkA	0.475
D 4	NGF R	TrkA	0.487
D 5	NGF R	TrkB	0.478
D 6	NGF R	TrkB	0.487
D 7	NGF R	TrkC	0.486
D 8	NGF R	TrkC	0.477
D 9	VEGF R	VEGF R1	4.082
D 10	VEGF R	VEGF R1	4.124
D 11	VEGF R	VEGF R2	0.473
D 12	VEGF R	VEGF R2	0.467
D 13	VEGF R	VEGF R3	0.491
D 14	VEGF R	VEGF R3	0.530
D 15	MuSK	MuSK	0.482
D 16	MuSK	MuSK	0.504
D 17	Eph R	EphA1	0.585

B 24	Axl	Dtk	0.431
C 1	Axl	Mer	0.579
C 2	Axl	Mer	0.624
C 3	HGF R	HGF R	0.571
C 4	HGF R	HGF R	0.538
C 5	HGF R	MSP R	0.691
C 6	HGF R	MSP R	0.664
C 7	PDGF R	PDGF R α	0.523
C 8	PDGF R	PDGF R α	0.544
C 9	PDGF R	PDGF R β	0.736
C 10	PDGF R	PDGF R β	0.695
C 11	PDGF R	SCF R	0.568
C 12	PDGF R	SCF R	0.570
C 13	PDGF R	Flt-3	0.481
C 14	PDGF R	Flt-3	0.477
C 15	PDGF R	M-CSF R	0.583
C 16	PDGF R	M-CSF R	0.586
C 17	RET	c-Ret	0.498
C 18	RET	c-Ret	0.521
C 19	ROR	ROR1	0.499
C 20	ROR	ROR1	0.482
C 21	ROR	ROR2	0.707
C 22	ROR	ROR2	0.671
C 23	Tie	Tie-1	0.446
C 24	Tie	Tie-1	0.430
D 1	Tie	Tie-2	0.581
D 2	Tie	Tie-2	0.633
D 3	NGF R	TrkA	0.574
D 4	NGF R	TrkA	0.549
D 5	NGF R	TrkB	0.571
D 6	NGF R	TrkB	0.541
D 7	NGF R	TrkC	0.572
D 8	NGF R	TrkC	0.573
D 9	VEGF R	VEGF R1	3.561
D 10	VEGF R	VEGF R1	5.316
D 11	VEGF R	VEGF R2	0.508
D 12	VEGF R	VEGF R2	0.484
D 13	VEGF R	VEGF R3	0.583
D 14	VEGF R	VEGF R3	0.590
D 15	MuSK	MuSK	0.520
D 16	MuSK	MuSK	0.495
D 17	Eph R	EphA1	0.621

D 18	Eph R	EphA1	0.620
D 19	Eph R	EphA2	0.481
D 20	Eph R	EphA2	0.472
D 21	Eph R	EphA3	0.438
D 22	Eph R	EphA3	0.467
D 23	Eph R	EphA4	0.581
D 24	Eph R	EphA4	0.561
E 1	Eph R	EphA6	0.489
E 2	Eph R	EphA6	0.494
E 3	Eph R	EphA7	0.493
E 4	Eph R	EphA7	0.483
E 5	Eph R	EphB1	0.460
E 6	Eph R	EphB1	0.454
E 7	Eph R	EphB2	0.507
E 8	Eph R	EphB2	0.529
E 9	Eph R	EphB4	0.492
E 10	Eph R	EphB4	0.491
E 11	Eph R	EphB6	0.504
E 12	Eph R	EphB6	0.486
E 13	Insulin R	ALK	0.496
E 14	Insulin R	ALK	0.496
E 15		DDR1	0.509
E 16		DDR1	0.521
E 17		DDR2	0.493
E 18		DDR2	0.499
E 19	Eph R	EphA5	0.505
E 20	Eph R	EphA5	0.480
E 21	Eph R	EphA10	0.430
E 22	Eph R	EphA10	0.440
F 1	Reference Spots		10.625
F 2	Reference Spots		21.796
F 5	Eph R	EphB3	0.421
F 6	Eph R	EphB3	0.415
F 7		RYK	0.419
F 8		RYK	0.429
F 23	PBS (-)		9.067
F 24	PBS (-)		17.618

D 18	Eph R	EphA1	0.681
D 19	Eph R	EphA2	0.506
D 20	Eph R	EphA2	0.488
D 21	Eph R	EphA3	0.437
D 22	Eph R	EphA3	0.431
D 23	Eph R	EphA4	0.450
D 24	Eph R	EphA4	0.427
E 1	Eph R	EphA6	0.480
E 2	Eph R	EphA6	0.517
E 3	Eph R	EphA7	0.577
E 4	Eph R	EphA7	0.533
E 5	Eph R	EphB1	0.515
E 6	Eph R	EphB1	0.522
E 7	Eph R	EphB2	0.602
E 8	Eph R	EphB2	0.611
E 9	Eph R	EphB4	0.599
E 10	Eph R	EphB4	0.547
E 11	Eph R	EphB6	0.549
E 12	Eph R	EphB6	0.541
E 13	Insulin R	ALK	0.519
E 14	Insulin R	ALK	0.515
E 15		DDR1	0.583
E 16		DDR1	0.545
E 17		DDR2	0.517
E 18		DDR2	0.505
E 19	Eph R	EphA5	0.515
E 20	Eph R	EphA5	0.519
E 21	Eph R	EphA10	0.431
E 22	Eph R	EphA10	0.421
F 1	Reference Spots		11.898
F 2	Reference Spots		10.947
F 5	Eph R	EphB3	0.453
F 6	Eph R	EphB3	0.455
F 7		RYK	0.462
F 8		RYK	0.452
F 23	PBS (-)		9.511
F 24	PBS (-)		14.682

7.3 Publikationsverzeichnis

7.3.1 Zeitschriftenbeiträge

1. **Liffers K**, Kolbe K, Westphal M, Lamszus K, Schulte A. Histone deacetylase inhibitors resensitize EGFR/EGFRvIII-overexpressing, erlotinib-resistant glioblastoma cells to targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors. *submitted to Targeted Oncology* TAON-D-15-00001
2. **Liffers K**, Lamszus K, Schulte A. EGFR amplification and glioblastoma stem-like cells. *submitted to Stem Cells International*
3. Schulte A, **Liffers K**, Kathagen A, Riethdorf S, Zapf S, Merlo A, et al. Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110delta. *Neuro-oncology* 2013.
4. Struve N, Riedel M, **Liffers K**, Schulte A, Grob T, Gal A, et al. EGFRvIII has no prominent effect on sensitivity of glioblastoma cells towards irradiation or EGFR inhibition. *submitted to Neuro-oncology* 2014.

7.3.2 Vorträge und Posterpräsentationen

1. **Liffers K**, Schulte A., , Kolbe K, Ricken K, Fehse B, Westphal M, Lamszus K, Schulte A. Determining the molecular principles of tumor initiation and progression of EGFR-amplified glioblastoma by multicolor labeling of individual cells. Braintumor Meeting, Berlin, 2013, (Posterpräsentation)
2. **Liffers K**, Schulte A., , Kolbe K, Ricken K, Fehse B, Westphal M, Lamszus K, Schulte A. Determining the molecular principles of tumor initiation and progression of EGFR-amplified glioblastoma by multicolor labeling of individual cells. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 2013, Düsseldorf, (Vortrag)
3. **Liffers K**, Schulte A., , Kolbe K, Ricken K, Fehse B, Westphal M, Lamszus K, Schulte A. Determining the molecular principles of tumor initiation and progression of EGFR-amplified glioblastoma by multicolor labeling of individual cells. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 2013, Düsseldorf, (Posterpräsentation)
4. **Liffers K**, Kolbe K, Westphal M, Lamszus K, Schulte A. Histone deacetylase inhibitors resensitize glioblastoma cells to EGFR-directed therapy with tyrosine kinase inhibitors after primary treatment failure. The European Association for Cancer Research (EACR), 2014, München, (Posterpräsentation)
5. **Liffers K**, Kolbe K, Westphal M, Lamszus K, Schulte A. Histone deacetylase inhibitors resensitization of glioblastoma cells to EGFR-directed therapy with tyrosine kinase inhibitors by . Histone deacetylase inhibitors. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 2014, Düsseldorf, (Posterpräsentation)
6. **Liffers K**, Kolbe K, Westphal M, Lamszus K, Schulte A. Impact of EGFR-associated intratumoral heterogeneity on tumorigenicity and response to targeted therapy analyzed by multicolor

labeling of EGFR-amplified glioblastoma cells. Advances in Biology and Treatment of Malignant Brain Gliomas (SIF), 2014, Rom, (Posterpräsentation)

7.4 Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
A	Alanin
AA	anaplastisches Astrozytom
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AML	myeloische Leukämie
AOA	anaplastisches Oligoastrozytom
AOD	anaplastisches Oligodendrogliom
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2 assoziierter Agonist des Zelltods
BBM	bone marrow-derived macrophages
Bcl2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BCNT	boron neutron capture therapy
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLK	B-cell lymphocyte tyrosine kinase
BS153 ^{resE}	Erlotinib resistente BS153 Zellen
bzw	beziehungsweise
CBP	CREB-binding protein
CD	cluster of differentiation
CDK4	cyclin-dependent kinase 4
CED	convection-enhanced delivery
ch	chimäre Form
CRC	colorectal cancer cells
CREB	cAMP response element-binding protein
CSC	cancer stem cells
CTC	circulating tumor cells
CTCL	cutaneous T cell lymphoma
d	Tage
D	Asparaginsäure
DA	diffuses Astrozytom
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	deoxyribonucleic acid
E1A	adenovirus early region 1A
EBRT	external beam radiation therapy
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGFRvIII	vIII Splicevariante des EGFR
EMT	epitheliale mesenchymale Transition

Erk	extracellular signal-regulated kinase
FAM	6-carboxyfluorescein
FCS	forward scatter
FISH	fluorescent <i>in situ</i> hybridization
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
G	Glycin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastom
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
Gy	Gray
h	Stunde
H292	NSCLC Zelllinie
H ₂ O	Wasser
H3	Histon 3
HB-EGF	heparin binding EGF-like growth factor
HAT	Histonacetylasen
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	HDAC-Inhibitoren
HMGB1	high-mobility-group-protein B1
HNSCC	Plattenepithelkarzinom des Kopf und Nackens
hpf	high power fields
HSP90	heat shock protein 90
ICD-O Code	Code der International Classification of Diseases for Oncology
IDH	Isozitat Dehydrogenase
IGF	insulin-like growth factor
IGF-R	insulin-like growth factor receptor
IgG	Immunglobulin
IMRT	intensity modulated radiation therapy
K	Lysin
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
KLH	keyhole limpet hemocyanin
KPS	Karnofsky-Index
LeGO	Lentiviral gene ontology
LIF	leukemia inhibitor factor
LOH10	Loss of heterozygosity on chromosome 10
LTR	long terminal repeat
m	Meter
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
mAK	monoklonaler Antikörper
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MEK	MAPK/Erk
mg	Milligramm
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minuten
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSPR	Macrophage-stimulating Protein Receptor
mTor	mammalian target of rapamycin
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIH 3T3	mouse embryonic fibroblast cells
nM	Nanomolar
NSCLC	non-small cell lung cancer
OA	Oligoastrozytom
OD	Oligodendrogliom
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
OP	Operation
P	Prolin
PCR	polymerase chain reaction
PDF	Polyvinylidendifluorid
PDK1	Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isoenzyme 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3KCA	Gen der katalytischen Untereinheit der PI3K
PI3KR	Gen der regulatorische Untereinheit der PI3K
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Protein Kinase B
pmol	Pikomol
PTB	phosphotyrosin bindingsite
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
qPCR	quantitative real time polymerase chain reaction
R	Argenin
RGB	Rot Grün Blau
RIPK2	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2
RL	relative Lumineszenz
RNA	Ribonucleic acid
ROCK	Rho-associated protein kinase
RohA	Ras homolog gene family, member A
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SA	Standardabweichung
SCCHN	squamous cell carcinoma of the head and neck

SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese
SETA	SH3 domain-containing gene expressed in tumorigenic astrocytes
scr	Scrambled
SFFV	spleen focus-forming virus (Promotor)
SH	Src-Homologie Domänen
SHC	SH domain-containing adaptor protein
SHIP	SH2 Domäne beinhaltende Inositol Phosphatase
siRNA	small interfering RNA
SIRT	Sirtuin
SKMG-3	Gliom-Zelllinie
SCLC	small cell lung cancer
Smad7	mothers against decapentaplegic homolog 7
Sos	son of sevenless
Sox2	sex determining region Y (SRY)- box 2
SRY	sex determining region Y
SSC	sideward scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	Threonin
TGF- α	transforming growth factor α
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosin-Kinase Inhibitoren
TKR	Tyrosinkinaserzeptor
TMZ	Temozolomid
TP53	Tumor Protein P53
TSC	tuberöse Sklerose
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
TSZ	Tumorstammzelle
u.a.	unter anderem
U373	Gliomzelllinie
UKE	Universitätsklinikum-Eppendorf, Hamburg
uPA	urokinase-type plasminogen activator
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
V	Valin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wPRE	woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
wtEGFR	wildtyp EGFR
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentralen Nervensystems

7.5 Literaturverzeichnis

1. Organization WH. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-oncology*. 2013;15 Suppl 2:ii1-56.
3. Tonn J.-C., Westphal M., T. RJ. *Oncology of CNS Tumors*. Springer; 2010.
4. Schlegel U, Weller M, Westphal M. *Neuroonkologie*. In: Schlegel U, Weller M, Westphal M, editors. *Neuroonkologie*. 2. Stuttgart: Thieme; 2003. p. 182-3.
5. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathologica*. 2005;109(1):93-108.
6. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & development*. 2001;15(11):1311-33.
7. (eds) FAeA. *CD-O International classification of diseases for oncology*. World Health Organization, Geneva. 2000.
8. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2007;114(2):97-109.
9. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain pathology* (Zurich, Switzerland). 1993;3(3):255-68.
10. Burkhard C, Di Patre PL, Schuler D, Schuler G, Yasargil MG, Yonekawa Y, et al. A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma. *Journal of neurosurgery*. 2003;98(6):1170-4.
11. Pahapill PA, Ramsay DA, Del Maestro RF. Pleomorphic xanthoastrocytoma: case report and analysis of the literature concerning the efficacy of resection and the significance of necrosis. *Neurosurgery*. 1996;38(4):822-8; discussion 8-9.
12. Giannini C, Scheithauer BW, Burger PC, Brat DJ, Wollan PC, Lach B, et al. Pleomorphic xanthoastrocytoma: what do we really know about it? *Cancer*. 1999;85(9):2033-45.
13. Kozak KR, Moody JS. Giant cell glioblastoma: a glioblastoma subtype with distinct epidemiology and superior prognosis. *Neuro-oncology*. 2009;11(6):833-41.
14. Kozak KR, Mahadevan A, Moody JS. Adult gliosarcoma: epidemiology, natural history, and factors associated with outcome. *Neuro-oncology*. 2009;11(2):183-91.
15. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta neuropathologica*. 2004;108(1):49-56.
16. Lassman AB, Iwamoto FM, Cloughesy TF, Aldape KD, Rivera AL, Eichler AF, et al. International retrospective study of over 1000 adults with anaplastic oligodendroglial tumors. *Neuro-oncology*. 2011;13(6):649-59.
17. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, WK C. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, 4th Edition, International Agency for Research on Cancer. 4th ed 2007.
18. Eman A. CNS Tumor, Ependymal tumors, Subependymoma 2012 [cited 2014 12]. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cnstumorsubependymoma.html>.
19. network Nci. 2010. Available from: <http://www.ncin.org.uk>.
20. Weber DC, Wang Y, Miller R, Villà S, Zaucha R, Pica A, et al. Long-term outcome of patients with spinal myxopapillary ependymoma: treatment results from the MD Anderson Cancer Center and institutions from the Rare Cancer Network. *Neuro-oncology*. 2014.
21. Vitancovics D, Balint K, Hanzely Z, Banczerowski P, Afra D. Ependymoma in adults: surgery, reoperation and radiotherapy for survival. *Pathology oncology research : POR*. 2010;16(1):93-9.
22. McGuire CS, Sainani KL, Fisher PG. Incidence patterns for ependymoma: a surveillance, epidemiology, and end results study. *Journal of neurosurgery*. 2009;110(4):725-9.
23. Kumar R, Singhal N, Jaiswal SK, Mahapatra AK. Recurrence in Supratentorial Anaplastic Ependymoma. *Pediatric Neurosurgery*. 2007;43(5):364-8.

24. Bernell WR KJ, Seitz EP. Late malignant recurrence of childhood cerebellar astrocytoma. Report of two cases. *Journal of neurosurgery*. 1972;37:470-4.
25. Alvord EC Jr LS. Gliomas of the optic nerve or chiasm. Outcome by patients' age, tumor site, and treatment. *Journal of neurosurgery*. 1988;68:85-98.
26. Davis FG, McCarthy BJ, Freels S, Kupelian V, Bondy ML. The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors: surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. *Cancer*. 1999;85(2):485-91.
27. Kleihues P, Cote DC. World Health Organization Classification of Tumours of the Nervous System, Editorial and Consensus Conference Working Group: Pathology and genetics of tumors of the nervous system. IARC Press, Lyon, France. 2007.
28. Ironside JW, Mount LT, Louis DN et al. *Diagnostic Pathology of Nervous System Tumours*. Churchill Livingstone, London, UK. 2002.
29. Tortosa A, Villalva S et al. Prognostic implications of clinical, radiologic, and pathologic features in patients with anaplastic gliomas. *Cancer*. 2003;97:1063-71.
30. Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer cell*. 2002;1(2):125-8.
31. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual review of pathology*. 2006;1:97-117.
32. Mork SJ, Lindegaard KF, Halvorsen TB, Lehmann EH, Solgaard T, Hatlevoll R, et al. Oligodendroglioma: incidence and biological behavior in a defined population. *Journal of neurosurgery*. 1985;63(6):881-9.
33. Hartmann C, Mueller W, von Deimling A. Pathology and molecular genetics of oligodendroglial tumors. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2004;82(10):638-55.
34. Graham DI, Lachy C. *Greenfield's neuropathology*. 6th edn Arnold, London. 1997.
35. Kleihues P, (Eds) Cote DC. *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. 2nd edn IARC, Lyon. 2000.
36. Helseth A, Mork SJ. Neoplasms of the central nervous system in Norway. III. Epidemiological characteristics of intracranial gliomas according to histology. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1989;97(6):547-55.
37. Association ABT. Brain Tumor Information - Types of Tumors - Oligoastrocytoma. <http://www.abta.org/brain-tumor-information/types-of-tumors/oligoastrocytoma.html>.
38. Hart MN, Petito CK, Earle KM. Mixed gliomas. *Cancer*. 1974;33(1):134-40.
39. Lassman AB, Iwamoto FM, Cloughesy TF, Aldape KD, Rivera AL, Eichler AF, et al. International retrospective study of over 1000 adults with anaplastic oligodendroglial tumors. *Neuro-oncology*. 2011;13(6):649-59.
40. Deutsche Hirntumorhilfe e.V. - Wissen H, Ependymom. <http://www.hirntumorhilfe.de/hirntumor/tumorarten/ependymom/>.
41. Hanbali F, Fournier DR, Marmor E, Suki D, Rhines LD, Weinberg JS, et al. Spinal cord ependymoma: radical surgical resection and outcome. *Neurosurgery*. 2002;51(5):1162-72; discussion 72-4.
42. Cristante L, Herrmann HD. Surgical management of intramedullary spinal cord tumors: functional outcome and sources of morbidity. *Neurosurgery*. 1994;35(1):69-74; discussion -6.
43. Weller M, Westphal M. Glioblastom. In: Schlegel U, editor. *Neuroonkologie*. 2. Stuttgart: Thieme; 2003. p. 196-204.
44. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research*. 2004;64(19):6892-9.
45. Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, et al. 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 research*. 2003;63(20):6613-25.
46. Louis DN, von Deimling A, Chung RY, Rubio MP, Whaley JM, Eibl RH, et al. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1993;52(1):31-8.

47. Wrensch M, Lee M, Miike R, Newman B, Barger G, Davis R, et al. Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. *American journal of epidemiology*. 1997;145(7):581-93.
48. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert opinion on investigational drugs*. 2009;18(8):1061-83.
49. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic clinics*. 2007;25(4):867-90, vii.
50. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*. 2007;170(5):1445-53.
51. Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2005;25(1):1-7.
52. association Abt. <http://www.abta.org/>. aus A deas End.
53. Kanu OO, Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD, et al. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2009;13(6):701-18.
54. Buccheri G, Ferrigno D, Tamburini M. Karnofsky and ECOG performance status scoring in lung cancer: a prospective, longitudinal study of 536 patients from a single institution. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 1996;32a(7):1135-41.
55. Wisconsin NMDPaTMC. Karnofsky/Lansky Performance Status 2009. Available from: <http://www.cibmtr.org/DataManagement/TrainingReference/Manuals/DataManagement/Documents/appendix-l.pdf>.
56. Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain : a journal of neurology*. 2007;130(Pt 10):2596-606.
57. Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(8):1253-65.
58. Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer*. 1985;56(5):1106-11.
59. Palma L, Celli P, Maleci A, Di Lorenzo N, Cantore G. Malignant monstrocellular brain tumours. A study of 42 surgically treated cases. *Acta neurochirurgica*. 1989;97(1-2):17-25.
60. Shinojima N, Kochi M, Hamada J, Nakamura H, Yano S, Makino K, et al. The influence of sex and the presence of giant cells on postoperative long-term survival in adult patients with supratentorial glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery*. 2004;101(2):219-26.
61. Artico M, Cervoni L, Celli P, Salvati M, Palma L. Supratentorial glioblastoma in children: a series of 27 surgically treated cases. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 1993;9(1):7-9.
62. Ohgaki H, Peraud A, Nakazato Y, Watanabe K, A vD. Giant cell glioblastoma. In: Kleihues P, WK C, editors. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*. Lyon: IACR Press; 2000. p. 40-1.
63. Miller CR, Perry A. Glioblastoma. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(3):397-406.
64. Lutterbach J, Guttenberger R, Pagenstecher A. Gliosarcoma: a clinical study. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2001;61(1):57-64.
65. Galanis E, Buckner JC, Dinapoli RP, Scheithauer BW, Jenkins RB, Wang CH, et al. Clinical outcome of gliosarcoma compared with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group results. *Journal of neurosurgery*. 1998;89(3):425-30.
66. Parekh HC, O'Donovan DG, Sharma RR, Keogh AJ. Primary cerebral gliosarcoma: report of 17 cases. *British journal of neurosurgery*. 1995;9(2):171-8.
67. Perry JR, Ang LC, Bilbao JM, Muller PJ. Clinicopathologic features of primary and postirradiation cerebral gliosarcoma. *Cancer*. 1995;75(12):2910-8.
68. Meis JM, Martz KL, Nelson JS. Mixed glioblastoma multiforme and sarcoma. A clinicopathologic study of 26 radiation therapy oncology group cases. *Cancer*. 1991;67(9):2342-9.

69. Fonkem E, Lun M, Wong ET. Rare phenomenon of extracranial metastasis of glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(34):4594-5.
70. Kalokhe G, Grimm SA, Chandler JP, Helenowski I, Rademaker A, Raizer JJ. Metastatic glioblastoma: case presentations and a review of the literature. *Journal of neuro-oncology*. 2012;107(1):21-7.
71. Pasquier B, Pasquier D, N'Golet A, Panh MH, Couderc P. Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas: clinicopathological study of two cases and review of literature. *Cancer*. 1980;45(1):112-25.
72. Liwnicz BH, Rubinstein LJ. The pathways of extraneural spread in metastasizing gliomas: a report of three cases and critical review of the literature. *Human pathology*. 1979;10(4):453-67.
73. Pansera F, Pansera E. An explanation for the rarity of extraaxial metastases in brain tumors. *Medical hypotheses*. 1992;39(1):88-9.
74. Muller C, Holtschmidt J, Auer M, Heitzer E, Lamszus K, Schulte A, et al. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Science translational medicine*. 2014;6(247):247ra101.
75. Perryman L, Erler JT. Brain cancer spreads. *Science translational medicine*. 2014;6(247):247fs28.
76. Chen H, Shah AS, Girgis RE, Grossman SA. Transmission of glioblastoma multiforme after bilateral lung transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(19):3284-5.
77. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-8.
78. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, NY)*. 2008;321(5897):1807-12.
79. Kim DH, Mohapatra G, Bollen A, Waldman FM, Feuerstein BG. Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme tumors and glioma cell lines detected by comparative genomic hybridization. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1995;60(6):812-9.
80. Mohapatra G, Bollen AW, Kim DH, Lamborn K, Moore DH, Prados MD, et al. Genetic analysis of glioblastoma multiforme provides evidence for subgroups within the grade. *Genes, chromosomes & cancer*. 1998;21(3):195-206.
81. Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, Ito H, Arai H, Beppu T, et al. Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes, chromosomes & cancer*. 1998;21(4):340-6.
82. von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC, Bender B, Fassbender F, Nagel J, et al. Comprehensive allelotype and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2000;59(6):544-58.
83. Collins VP. Brain tumours: classification and genes. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2004;75 Suppl 2:ii2-11.
84. Vranova V, Necesalova E, Kuglik P, Cejpek P, Pesakova M, Budinska E, et al. Screening of genomic imbalances in glioblastoma multiforme using high-resolution comparative genomic hybridization. *Oncology reports*. 2007;17(2):457-64.
85. Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD, et al. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene*. 1995;10(11):2243-6.
86. Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP. 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*. 1998;22(1):9-15.
87. Fufts D, Pedone CA, Thompson GE, Uchiyama CM, Gumpfer KL, Iliev D, et al. Microsatellite deletion mapping on chromosome 10q and mutation analysis of MMAC1, FAS, and MXI1 in human glioblastoma multiforme. *International journal of oncology*. 1998;12(4):905-10.
88. Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, Nordenskjold M, et al. Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Human genetics*. 1993;92(2):169-74.

89. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80(1):65-72.
90. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2005;64(6):479-89.
91. Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *The American journal of pathology*. 1999;155(2):387-94.
92. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*. 1999;13(12):1501-12.
93. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, et al. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2001;11(2):159-68.
94. Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2001;81(1):77-82.
95. Labuhn M, Jones G, Speel EJ, Maier D, Zweifel C, Gratzl O, et al. Quantitative real-time PCR does not show selective targeting of p14(ARF) but concomitant inactivation of both p16(INK4A) and p14(ARF) in 105 human primary gliomas. *Oncogene*. 2001;20(9):1103-9.
96. Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia*. 1995;15(3):308-27.
97. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *The EMBO journal*. 1998;17(17):5001-14.
98. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992;69(7):1237-45.
99. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. 1992;358(6381):80-3.
100. Reifemberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer research*. 1993;53(12):2736-9.
101. Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1997;56(2):180-5.
102. Marumoto T, Saya H. Molecular biology of glioma. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;746:2-11.
103. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*. 2009;360(8):765-73.
104. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta neuropathologica*. 2008;116(6):597-602.
105. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *The American journal of pathology*. 2009;174(4):1149-53.
106. Xu X, Zhao J, Xu Z, Peng B, Huang Q, Arnold E, et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(32):33946-57.
107. Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermarck B, et al. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer research*. 1992;52(11):3213-9.

108. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science (New York, NY)*. 2009;324(5924):261-5.
109. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, et al. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Human mutation*. 2009;30(1):7-11.
110. Dahia PL. PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocrine-related cancer*. 2000;7(2):115-29.
111. Knobbe CB, Merlo A, Reifemberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro-oncology*. 2002;4(3):196-211.
112. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(22):13375-8.
113. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(5):341-54.
114. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(7):505-16.
115. Wells A. EGF receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1999;31(6):637-43.
116. Hasselbalch B, Lassen U, Poulsen HS, Stockhausen MT. Cetuximab insufficiently inhibits glioma cell growth due to persistent EGFR downstream signaling. *Cancer investigation*. 2010;28(8):775-87.
117. Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor α . *Cell*. 2002;110(6):763-73.
118. Ward CW, Lawrence MC, Streltsov VA, Adams TE, McKern NM. The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(3):129-37.
119. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*. 2002;110(6):775-87.
120. Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Molecular cell*. 2003;11(2):507-17.
121. Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science (New York, NY)*. 2002;297(5585):1330-3.
122. Bouyain S, Longo PA, Li S, Ferguson KM, Leahy DJ. The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(42):15024-9.
123. Dawson JP, Berger MB, Lin CC, Schlessinger J, Lemmon MA, Ferguson KM. Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(17):7734-42.
124. Ozcan F, Klein P, Lemmon MA, Lax I, Schlessinger J. On the nature of low- and high-affinity EGF receptors on living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(15):5735-40.
125. Jura N, Endres NF, Engel K, Deindl S, Das R, Lamers MH, et al. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*. 2009;137(7):1293-307.
126. Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(24):7261-70.
127. Karpel-Massler G, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Molecular cancer research : MCR*. 2009;7(7):1000-12.

128. Huang PH, Xu AM, White FM. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Science signaling*. 2009;2(87):re6.
129. Dikic I. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochemical Society transactions*. 2003;31(Pt 6):1178-81.
130. Wells A, Gupta K, Chang P, Swindle S, Glading A, Shiraha H. Epidermal growth factor receptor-mediated motility in fibroblasts. *Microscopy research and technique*. 1998;43(5):395-411.
131. Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annual review of biochemistry*. 1993;62:515-41.
132. Dancy JE, Freidlin B. Targeting epidermal growth factor receptor--are we missing the mark? *Lancet*. 2003;362(9377):62-4.
133. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(2):127-37.
134. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 1996;6(3):217-23; discussion 23-4.
135. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, et al. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1998;57(7):684-9.
136. Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2004;14(2):131-6.
137. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(21):3651-64.
138. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia (New York, NY)*. 2010;12(9):675-84.
139. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(3):169-81.
140. Lee JC, Vivanco I, Beroukhi R, Huang JH, Feng WL, DeBiasi RM, et al. Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS medicine*. 2006;3(12):e485.
141. Humphrey PA, Gangarosa LM, Wong AJ, Archer GE, Lund-Johansen M, Bjerkvig R, et al. Deletion-mutant epidermal growth factor receptor in human gliomas: effects of type II mutation on receptor function. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;178(3):1413-20.
142. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(7):2965-9.
143. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer research*. 2000;60(5):1383-7.
144. Belda-Iniesta C, de Castro Carpeno J, Sereno M, Gonzalez-Baron M, Perona R. Epidermal growth factor receptor and glioblastoma multiforme: molecular basis for a new approach. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2008;10(2):73-7.
145. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*. 1985;313(5998):144-7.
146. Peschard P, Park M. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene*. 2007;26(9):1276-85.
147. Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Current opinion in oncology*. 1999;11(3):162-7.
148. Schwechheimer K, Huang S, Cavenee WK. EGFR gene amplification--rearrangement in human glioblastomas. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1995;62(2):145-8.

149. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer research*. 2003;63(20):6962-70.
150. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(16):7727-31.
151. Frederick L, Eley G, Wang XY, James CD. Analysis of genomic rearrangements associated with EGFRvIII expression suggests involvement of Alu repeat elements. *Neuro-oncology*. 2000;2(3):159-63.
152. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, et al. 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. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(5):2927-35.
153. Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(10):5724-9.
154. Grandal MV, Zandi R, Pedersen MW, Willumsen BM, van Deurs B, Poulsen HS. EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes. *Carcinogenesis*. 2007;28(7):1408-17.
155. Cai XM, Tao BB, Wang LY, Liang YL, Jin JW, Yang Y, et al. Protein phosphatase activity of PTEN inhibited the invasion of glioma cells with epidermal growth factor receptor mutation type III expression. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005;117(6):905-12.
156. Pedersen MW, Tkach V, Pedersen N, Berezin V, Poulsen HS. Expression of a naturally occurring constitutively active variant of the epidermal growth factor receptor in mouse fibroblasts increases motility. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004;108(5):643-53.
157. Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery*. 1999;45(6):1442-53.
158. Garcia de Palazzo IE, Adams GP, Sundaresan P, Wong AJ, Testa JR, Bigner DD, et al. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer research*. 1993;53(14):3217-20.
159. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer research*. 1995;55(23):5536-9.
160. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, Montgomery RB, Wong AJ. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(1):200-6.
161. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science*. 2009;100(12):2235-41.
162. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5573):1655-7.
163. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5712):1098-101.
164. Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(1):11-20.
165. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-74.
166. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development*. 2007;21(21):2683-710.
167. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *The New England journal of medicine*. 2005;353(19):2012-24.

168. Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta neuropathologica*. 2007;113(3):295-302.
169. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*. 1994;370(6490):527-32.
170. Schulze WX, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Molecular systems biology*. 2005;1:2005.0008.
171. Chu CT, Everiss KD, Wikstrand CJ, Batra SK, Kung HJ, Bigner DD. Receptor dimerization is not a factor in the signalling activity of a transforming variant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII). *The Biochemical journal*. 1997;324 (Pt 3):855-61.
172. Moscatello DK, Montgomery RB, Sundareshan P, McDanel H, Wong MY, Wong AJ. Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene*. 1996;13(1):85-96.
173. Prigent SA, Nagane M, Lin H, Huvar I, Boss GR, Feramisco JR, et al. Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(41):25639-45.
174. Montgomery RB, Moscatello DK, Wong AJ, Cooper JA, Stahl WL. Differential modulation of mitogen-activated protein (MAP) kinase/extracellular signal-related kinase and MAP kinase activities by a mutant epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(51):30562-6.
175. Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science (New York, NY)*. 1993;260(5114):1658-61.
176. Warne PH, Viciana PR, Downward J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*. 1993;364(6435):352-5.
177. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*. 1993;74(1):205-14.
178. Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, et al. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*. 1993;364(6435):308-13.
179. Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK, et al. Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(31):12867-72.
180. Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5573):1653-5.
181. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(9):1143-8.
182. Huang PH, Cavenee WK, Furnari FB, White FM. Uncovering therapeutic targets for glioblastoma: a systems biology approach. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2007;6(22):2750-4.
183. de la Iglesia N, Konopka G, Puram SV, Chan JA, Bachoo RM, You MJ, et al. Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes & development*. 2008;22(4):449-62.
184. Luwor RB, Zhu HJ, Walker F, Vitali AA, Perera RM, Burgess AW, et al. The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR. *Oncogene*. 2004;23(36):6095-104.
185. Fan QW, Cheng CK, Gustafson WC, Charron E, Zipper P, Wong RA, et al. EGFR phosphorylates tumor-derived EGFRvIII driving STAT3/5 and progression in glioblastoma. *Cancer cell*. 2013;24(4):438-49.
186. Wells A, Marti U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(9):697-702.
187. Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DW, Vandenberg S, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes & development*. 2010;24(16):1731-45.

188. Ramnarain DB, Park S, Lee DY, Hatanpaa KJ, Scoggin SO, Otu H, et al. Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer research*. 2006;66(2):867-74.
189. Kodama T, Ikeda E, Okada A, Ohtsuka T, Shimoda M, Shiomi T, et al. ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *The American journal of pathology*. 2004;165(5):1743-53.
190. Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*. 2002;416(6877):183-7.
191. Mosesson Y, Mills GB, Yarden Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(11):835-50.
192. Han W, Zhang T, Yu H, Foulke JG, Tang CK. Hypophosphorylation of residue Y1045 leads to defective downregulation of EGFRvIII. *Cancer biology & therapy*. 2006;5(10):1361-8.
193. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*. 2002;359(9311):1011-8.
194. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer*. 1993;71(8):2585-97.
195. Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, et al. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature reviews Neuroscience*. 2011;12(3):169-82.
196. Haar CP, Hebbbar P, Wallace GC, Das A, Vandergrift WA, 3rd, Smith JA, et al. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochemical research*. 2012;37(6):1192-200.
197. Kuhn JG. Influence of anticonvulsants on the metabolism and elimination of irinotecan. A North American Brain Tumor Consortium preliminary report. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2002;16(8 Suppl 7):33-40.
198. van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, Kouwenhoven MC, Kros JM, Carpentier AF, et al. Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1268-74.
199. Thiessen B, Stewart C, Tsao M, Kamel-Reid S, Schaiquevich P, Mason W, et al. A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes, pharmacokinetics and molecular correlation. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2010;65(2):353-61.
200. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):987-96.
201. Lacroix M, Abi-Said D, Fourny DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery*. 2001;95(2):190-8.
202. Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*. 2008;62(3):564-76; discussion -76.
203. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology*. 2006;7(5):392-401.
204. Kristiansen K, Hagen S, Kollevold T, Torvik A, Holme I, Nesbakken R, et al. Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. *Cancer*. 1981;47(4):649-52.
205. Walker MD, Alexander E, Jr., Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *Journal of neurosurgery*. 1978;49(3):333-43.

206. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *The New England journal of medicine*. 2007;356(15):1527-35.
207. Silvani A, Gaviani P, Lamperti EA, Eoli M, Falcone C, Dimeco F, et al. Cisplatin and BCNU chemotherapy in primary glioblastoma patients. *Journal of neuro-oncology*. 2009;94(1):57-62.
208. Agarwala SS, Kirkwood JM. Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *The oncologist*. 2000;5(2):144-51.
209. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology*. 2003;5(2):79-88.
210. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazar O, Perez-Tamayo R, Kramer S, et al. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer*. 1983;52(6):997-1007.
211. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 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*. 2001;22(10):1715-9.
212. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):997-1003.
213. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *The New England journal of medicine*. 2008;359(5):492-507.
214. Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Rich JN, et al. Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1262-7.
215. Clarke J, Butowski N, Chang S. Recent advances in therapy for glioblastoma. *Archives of neurology*. 2010;67(3):279-83.
216. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature reviews Cancer*. 2001;1(2):118-29.
217. Brady LW, Miyamoto C, Woo DV, Rackover M, Emrich J, Bender H, et al. Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a phase II trial. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1992;22(1):225-30.
218. Foulon CF, Reist CJ, Bigner DD, Zalutsky MR. Radioiodination via D-amino acid peptide enhances cellular retention and tumor xenograft targeting of an internalizing anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody. *Cancer research*. 2000;60(16):4453-60.
219. Wang QC, Pai LH, Debinski W, FitzGerald DJ, Pastan I. Polyethylene glycol-modified chimeric toxin composed of transforming growth factor alpha and Pseudomonas exotoxin. *Cancer research*. 1993;53(19):4588-94.
220. Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast cancer research : BCR*. 2002;4(3):95-9.
221. Siwak DR, Tari AM, Lopez-Berestein G. The potential of drug-carrying immunoliposomes as anticancer agents. Commentary re: J. W. Park et al., Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy due to targeted delivery. *Clin. Cancer Res.*, 8: 1172-1181, 2002. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(4):955-6.
222. Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(5):383-93.
223. Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *The oncologist*. 2009;14(11):1131-8.

224. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(30):4722-9.
225. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2014;370(8):709-22.
226. Germano IM, Binello E. Gene therapy as an adjuvant treatment for malignant gliomas: from bench to bedside. *Journal of neuro-oncology*. 2009;93(1):79-87.
227. Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ, Reid JM, Ames MM, Hardwick JS, et al. Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(12):2052-8.
228. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(5):317-27.
229. Rivera F, Vega-Villegas ME, Lopez-Brea MF. Cetuximab, its clinical use and future perspectives. *Anti-cancer drugs*. 2008;19(2):99-113.
230. Emanuel SL, Hughes TV, Adams M, Rugg CA, Fuentes-Pesquera A, Connolly PJ, et al. Cellular and in vivo activity of JNJ-28871063, a nonquinazoline pan-ErbB kinase inhibitor that crosses the blood-brain barrier and displays efficacy against intracranial tumors. *Molecular pharmacology*. 2008;73(2):338-48.
231. Martens T, Laabs Y, Gunther HS, Kemming D, Zhu Z, Witte L, et al. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(17):5447-58.
232. Li L, Quang TS, Gracely EJ, Kim JH, Emrich JG, Yaeger TE, et al. A Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor radioimmunotherapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *Journal of neurosurgery*. 2010;113(2):192-8.
233. Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, Huang HJ, Cavenee WK, et al. Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2002;98(3):398-408.
234. Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G, et al. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer research*. 2001;61(14):5355-61.
235. Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, et al. Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor. *Cancer research*. 2001;61(14):5349-54.
236. Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, Herbertson R, Gill SS, Liu Z, et al. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(10):4071-6.
237. Heimberger AB, Sampson JH. The PEPvIII-KLH (CDX-110) vaccine in glioblastoma multiforme patients. *Expert opinion on biological therapy*. 2009;9(8):1087-98.
238. Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS, et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(31):4722-9.
239. Lateef SS, Gupta S, Jayathilaka LP, Krishnanchettiar S, Huang JS, Lee BS. An improved protocol for coupling synthetic peptides to carrier proteins for antibody production using DMF to solubilize peptides. *Journal of biomolecular techniques : JBT*. 2007;18(3):173-6.
240. Machulla HK, Steinborn F, Schaaf A, Heidecke V, Rainov NG. Brain glioma and human leukocyte antigens (HLA)--is there an association. *Journal of neuro-oncology*. 2001;52(3):253-61.

241. U.S. ClinicalTrials.gov 2014.
242. Yang W, Barth RF, Wu G, Tjarks W, Binns P, Riley K. Boron neutron capture therapy of EGFR or EGFRvIII positive gliomas using either boronated monoclonal antibodies or epidermal growth factor as molecular targeting agents. *Applied radiation and isotopes : including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine*. 2009;67(7-8 Suppl):S328-31.
243. Yang W, Wu G, Barth RF, Swindall MR, Bandyopadhyaya AK, Tjarks W, et al. Molecular targeting and treatment of composite EGFR and EGFRvIII-positive gliomas using boronated monoclonal antibodies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(3):883-91.
244. Yang W, Barth RF, Wu G, Ciesielski MJ, Fenstermaker RA, Moffat BA, et al. Development of a syngeneic rat brain tumor model expressing EGFRvIII and its use for molecular targeting studies with monoclonal antibody L8A4. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(1):341-50.
245. Yang W, Barth RF, Wu G, Kawabata S, Sferra TJ, Bandyopadhyaya AK, et al. Molecular targeting and treatment of EGFRvIII-positive gliomas using boronated monoclonal antibody L8A4. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(12):3792-802.
246. Mischel PS, Cloughesy TF. Targeted molecular therapy of GBM. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2003;13(1):52-61.
247. Broniscer A, Baker SJ, Stewart CF, Merchant TE, Laningham FH, Schaiquevich P, et al. Phase I and pharmacokinetic studies of erlotinib administered concurrently with radiotherapy for children, adolescents, and young adults with high-grade glioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(2):701-7.
248. Gril B, Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Vega-Valle E, Feigenbaum L, et al. Effect of lapatinib on the outgrowth of metastatic breast cancer cells to the brain. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(15):1092-103.
249. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(11):876-85.
250. Vivanco I, Robins HI, Rohle D, Campos C, Grommes C, Nghiemphu PL, et al. Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors. *Cancer discovery*. 2012;2(5):458-71.
251. Barkovich KJ, Hariono S, Garske AL, Zhang J, Blair JA, Fan QW, et al. Kinetics of inhibitor cycling underlie therapeutic disparities between EGFR-driven lung and brain cancers. *Cancer discovery*. 2012;2(5):450-7.
252. Rich JN, Rasheed BK, Yan H. EGFR mutations and sensitivity to gefitinib. *The New England journal of medicine*. 2004;351(12):1260-1; author reply -1.
253. Hegi ME, Diserens AC, Bady P, Kamoshima Y, Kouwenhoven MC, Delorenzi M, et al. Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib--a phase II trial. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(6):1102-12.
254. Hofer S, Frei K, Rutz HP. Gefitinib accumulation in glioblastoma tissue. *Cancer biology & therapy*. 2006;5(5):483-4.
255. Clark PA, Iida M, Treisman DM, Kalluri H, Ezhilan S, Zorniak M, et al. Activation of multiple ERBB family receptors mediates glioblastoma cancer stem-like cell resistance to EGFR-targeted inhibition. *Neoplasia (New York, NY)*. 2012;14(5):420-8.
256. Hu J, Jo M, Cavenee WK, Furnari F, VandenBerg SR, Gonias SL. Crosstalk between the urokinase-type plasminogen activator receptor and EGF receptor variant III supports survival and growth of glioblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(38):15984-9.
257. Hu J, Muller KA, Furnari FB, Cavenee WK, VandenBerg SR, Gonias SL. Neutralizing the EGF receptor in glioblastoma cells stimulates cell migration by activating uPAR-initiated cell signaling. *Oncogene*. 2014.
258. Omuro AM, Faivre S, Raymond E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(7):1909-19.

259. Rich JN, Bigner DD. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(5):430-46.
260. Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry*. 2004;73:417-35.
261. Bhalla KN. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(17):3971-93.
262. Marks PA, Dokmanovic M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert opinion on investigational drugs*. 2005;14(12):1497-511.
263. de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal*. 2003;370(Pt 3):737-49.
264. Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family. *Experimental cell research*. 2001;262(2):75-83.
265. Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of molecular biology*. 2004;338(1):17-31.
266. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 2007;26(37):5541-52.
267. Gryder BE, Sodji QH, Oyelere AK. Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. *Future medicinal chemistry*. 2012;4(4):505-24.
268. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American journal of translational research*. 2011;3(2):166-79.
269. Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(28):25748-55.
270. Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends in genetics : TIG*. 2003;19(5):286-93.
271. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry*. 2001;70:81-120.
272. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389(6649):349-52.
273. Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;983:84-100.
274. Marmorstein R. Structure of histone acetyltransferases. *Journal of molecular biology*. 2001;311(3):433-44.
275. Sengupta N, Seto E. Regulation of histone deacetylase activities. *Journal of cellular biochemistry*. 2004;93(1):57-67.
276. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 2005;363:15-23.
277. Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2005;9(4):809-24.
278. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(9):769-84.
279. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(1):38-51.
280. Zhao LJ, Subramanian T, Zhou Y, Chinnadurai G. Acetylation by p300 regulates nuclear localization and function of the transcriptional corepressor CtBP2. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(7):4183-9.
281. Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, et al. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *The EMBO journal*. 2002;21(22):6236-45.

282. Jin YH, Jeon EJ, Li QL, Lee YH, Choi JK, Kim WJ, et al. Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(28):29409-17.
283. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(18):10014-9.
284. Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(5):1241-6.
285. Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2007;9(1):25-47.
286. Gupta M, Han JJ, Stenson M, Wellik L, Witzig TE. Regulation of STAT3 by histone deacetylase-3 in diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapy. *Leukemia*. 2012;26(6):1356-64.
287. Emori T, Kitamura K, Okazaki K. Nuclear Smad7 Overexpressed in Mesenchymal Cells Acts as a Transcriptional Corepressor by Interacting with HDAC-1 and E2F to Regulate Cell Cycle. *Biology open*. 2012;1(3):247-60.
288. Subramanian C, Jarzembowski JA, Opipari AW, Jr., Castle VP, Kwok RP. HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma. *Neoplasia (New York, NY)*. 2011;13(8):726-34.
289. Aoyagi S, Archer TK. Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation. *Trends in cell biology*. 2005;15(11):565-7.
290. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002;417(6887):455-8.
291. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(8):4389-94.
292. Wang LG, Ossowski L, Ferrari AC. Androgen receptor level controlled by a suppressor complex lost in an androgen-independent prostate cancer cell line. *Oncogene*. 2004;23(30):5175-84.
293. He M, Zhang B, Wei X, Wang Z, Fan B, Du P, et al. HDAC4/5-HMGB1 signalling mediated by NADPH oxidase activity contributes to cerebral ischaemia/reperfusion injury. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2013;17(4):531-42.
294. Igotti Abramova MV, Pojidaeva AK, Filippova EA, Gnedina OO, Svetlikova SB, Pospelov VA. HDAC inhibitors induce apoptosis but not cellular senescence in Gadd45alpha-deficient E1A+Ras cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;51:102-10.
295. Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Current opinion in genetics & development*. 1999;9(1):40-8.
296. Lee JH, Hart SR, Skalnik DG. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis (New York, NY : 2000)*. 2004;38(1):32-8.
297. Georgopoulos K. From immunity to tolerance through HDAC. *Nature immunology*. 2009;10(1):13-4.
298. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate*. 2004;59(2):177-89.
299. Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, et al. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(19):13548-58.
300. Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer cell*. 2004;5(5):455-63.
301. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K, et al. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. *Breast cancer research and treatment*. 2005;94(1):11-6.
302. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Omoto Y, Ando Y, et al. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(20):6962-8.

303. Miller TA, Witter DJ, Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2003;46(24):5097-116.
304. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular cancer research : MCR*. 2007;5(10):981-9.
305. Van Lint C, Emiliani S, Verdin E. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene expression*. 1996;5(4-5):245-53.
306. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T, et al. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(2):540-5.
307. Lee JH, Park JH, Jung Y, Kim JH, Jong HS, Kim TY, et al. Histone deacetylase inhibitor enhances 5-fluorouracil cytotoxicity by down-regulating thymidylate synthase in human cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(12):3085-95.
308. Gray SG, Qian CN, Furge K, Guo X, Teh BT. Microarray profiling of the effects of histone deacetylase inhibitors on gene expression in cancer cell lines. *International journal of oncology*. 2004;24(4):773-95.
309. Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, et al. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(10):3697-702.
310. Nusinzon I, Horvath CM. Unexpected roles for deacetylation in interferon- and cytokine-induced transcription. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2005;25(12):745-8.
311. Nusinzon I, Horvath CM. Positive and negative regulation of the innate antiviral response and beta interferon gene expression by deacetylation. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(8):3106-13.
312. Dokmanovic M, Perez G, Xu W, Ngo L, Clarke C, Parmigiani RB, et al. Histone deacetylase inhibitors selectively suppress expression of HDAC7. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(9):2525-34.
313. Schuettengruber B, Simboeck E, Khier H, Seiser C. Autoregulation of mouse histone deacetylase 1 expression. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(19):6993-7004.
314. Grozinger CM, Schreiber SL. Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(14):7835-40.
315. Parra M, Kasler H, McKinsey TA, Olson EN, Verdin E. Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(14):13762-70.
316. Zhao X, Ito A, Kane CD, Liao TS, Bolger TA, Lemrow SM, et al. The modular nature of histone deacetylase HDAC4 confers phosphorylation-dependent intracellular trafficking. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(37):35042-8.
317. Bertos NR, Gilquin B, Chan GK, Yen TJ, Khochbin S, Yang XJ. Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(46):48246-54.
318. Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*. 2007;109(1):31-9.
319. Modesitt SC, Sill M, Hoffman JS, Bender DP. A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2008;109(2):182-6.
320. Kim YJ, Greer CB, Cecchini KR, Harris LN, Tuck DP, Kim TH. HDAC inhibitors induce transcriptional repression of high copy number genes in breast cancer through elongation blockade. *Oncogene*. 2013;32(23):2828-35.

321. Kunkel P, Ulbricht U, Bohlen P, Brockmann MA, Fillbrandt R, Stavrou D, et al. Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer research*. 2001;61(18):6624-8.
322. Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, Cominelli M, Franzin A, Sergi Sergi L, et al. Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer research*. 2010;70(19):7500-13.
323. Schulte A, Gunther HS, Martens T, Zapf S, Riethdorf S, Wulfing C, et al. Glioblastoma stem-like cell lines with either maintenance or loss of high-level EGFR amplification, generated via modulation of ligand concentration. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(7):1901-13.
324. Jones G, Machado J, Jr., Merlo A. Loss of focal adhesion kinase (FAK) inhibits epidermal growth factor receptor-dependent migration and induces aggregation of nh(2)-terminal FAK in the nuclei of apoptotic glioblastoma cells. *Cancer research*. 2001;61(13):4978-81.
325. Yamoutpour F, Bodempudi V, Park SE, Pan W, Mauzy MJ, Kratzke RA, et al. Gene silencing for epidermal growth factor receptor variant III induces cell-specific cytotoxicity. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(11):3586-97.
326. Luk SK, Piekorz RP, Nürnberg B, Tony To S-S. The catalytic phosphoinositol 3-kinase isoform p110δ is required for glioma cell migration and invasion. *European Journal of Cancer*. 2012;48(1):149-57.
327. Weber K, Thomaschewski M, Warlich M, Volz T, Cornils K, Niebuhr B, et al. RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nature medicine*. 2011;17(4):504-9.
328. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002;39(3):193-206.
329. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nature medicine*. 2010;16(2):198-204.
330. Weber K, Thomaschewski M, Benten D, Fehse B. RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nature protocols*. 2012;7(5):839-49.
331. Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science (New York, NY)*. 2006;312(5771):217-24.
332. Fehse B, Kustikova OS, Bubenheim M, Baum C. Pois(s)on - It's a Question of Dose[hellip]. *Gene Ther*. 2004;11(11):879-81.
333. Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M, Rudolph C, Meyer J, Li Z, et al. Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood*. 2005;105(11):4235-46.
334. Rae JM, Scheys JO, Clark KM, Chadwick RB, Kiefer MC, Lippman ME. EGFR and EGFRvIII expression in primary breast cancer and cell lines. *Breast cancer research and treatment*. 2004;87(1):87-95.
335. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, et al. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(11):4207-11.
336. Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, et al. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(1):133-42.
337. Pandita A, Aldape KD, Zadeh G, Guha A, James CD. Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR. *Genes, chromosomes & cancer*. 2004;39(1):29-36.
338. LLC. S-AC. Trichostatin A 2014. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8552?lang=de®ion=DE>.

339. Ltd EC. Suberoylanilide Hydroxamic Acid: Exclusive Chemistry Ltd; 2013. Available from: <http://www.exchemistry.com/histone-deacetylase-inhibitors/SAHA.html>.
340. Ltd EC. Scriptaid 2013. Available from: <http://www.exchemistry.com/histone-deacetylase-inhibitors/Scriptaid.html>.
341. National Center for Biotechnology Information USNLoM. Vorinostat. Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5311?from=summary#section=Top>.
342. Technology A. CUDC-101 2013. Available from: <http://www.apexbt.com/cudc-101.html>.
343. Lal A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH, et al. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer research*. 2002;62(12):3335-9.
344. Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Humphrey PA, Bigner SH, Bigner DD, Laerum OD. Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer research*. 1990;50(18):6039-44.
345. Filmus J, Pollak MN, Cairncross JG, Buick RN. Amplified, overexpressed and rearranged epidermal growth factor receptor gene in a human astrocytoma cell line. *Biochemical and biophysical research communications*. 1985;131(1):207-15.
346. Del Vecchio CA, Giacomini CP, Vogel H, Jensen KC, Florio T, Merlo A, et al. EGFRvIII gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. *Oncogene*. 2013;32(21):2670-81.
347. Learn CA, Hartzell TL, Wikstrand CJ, Archer GE, Rich JN, Friedman AH, et al. Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(9):3216-24.
348. Ono M, Hirata A, Kometani T, Miyagawa M, Ueda S, Kinoshita H, et al. Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Molecular cancer therapeutics*. 2004;3(4):465-72.
349. Yoshida T, Okamoto I, Okabe T, Iwasa T, Satoh T, Nishio K, et al. Matuzumab and cetuximab activate the epidermal growth factor receptor but fail to trigger downstream signaling by Akt or Erk. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;122(7):1530-8.
350. Jutten B, Dubois L, Li Y, Aerts H, Wouters BG, Lambin P, et al. Binding of cetuximab to the EGFRvIII deletion mutant and its biological consequences in malignant glioma cells. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2009;92(3):393-8.
351. Johns TG, Perera RM, Vernes SC, Vitali AA, Cao DX, Cavenee WK, et al. The efficacy of epidermal growth factor receptor-specific antibodies against glioma xenografts is influenced by receptor levels, activation status, and heterodimerization. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(6):1911-25.
352. Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, et al. A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(20 Pt 1):6144-52.
353. Lamszus K, Brockmann MA, Eckerich C, Bohlen P, May C, Mangold U, et al. Inhibition of glioblastoma angiogenesis and invasion by combined treatments directed against vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and vascular endothelial-cadherin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(13):4934-40.
354. Fukai J, Nishio K, Itakura T, Koizumi F. Antitumor activity of cetuximab against malignant glioma cells overexpressing EGFR deletion mutant variant III. *Cancer science*. 2008;99(10):2062-9.
355. Roda JM, Joshi T, Butchar JP, McAlees JW, Lehman A, Tridandapani S, et al. The activation of natural killer cell effector functions by cetuximab-coated, epidermal growth factor receptor positive tumor cells is enhanced by cytokines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(21):6419-28.

356. Siegel-Lakhai WS, Beijnen JH, Schellens JH. Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa). *The oncologist*. 2005;10(8):579-89.
357. Schulte A, Liffers K, Kathagen A, Riethdorf S, Zapf S, Merlo A, et al. Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110delta. *Neuro-oncology*. 2013;15(10):1289-301.
358. e.V. DK. Therapie von Lungenkrebs: Deutsche Krebsgesellschaft e.V.; 2015 [updated 06.02.2015]. Available from: Deutsche Krebsgesellschaft e.V.
359. Brehmer D, Greff Z, Godl K, Blencke S, Kurtenbach A, Weber M, et al. Cellular targets of gefitinib. *Cancer research*. 2005;65(2):379-82.
360. Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Janne PA, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(15):2442-9.
361. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*. 2004;350(21):2129-39.
362. Learn PA, Krishnegowda N, Talamantez J, Kahlenberg MS. Compensatory increases in Her-2/neu activation in response to EGFR tyrosine kinase inhibition in colon cancer cell lines. *The Journal of surgical research*. 2006;136(2):227-31.
363. Clark PA, Iida M, Treisman DM, Kalluri H, Ezhilan S, Zorniak M, et al. Activation of Multiple ERBB Family Receptors Mediates Glioblastoma Cancer Stem-like Cell Resistance to EGFR-Targeted Inhibition. *Neoplasia (New York, NY)*. 2012;14(5):420-8.
364. Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(4):1897-905.
365. Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, Eberhard DA, Jelluma N, Arvold ND, et al. Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(12):880-7.
366. Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, Visnyei K, Koga T, Gomez G, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science (New York, NY)*. 2014;343(6166):72-6.
367. Feng H, Hu B, Vuori K, Sarkaria JN, Furnari FB, Cavenee WK, et al. EGFRvIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180. *Oncogene*. 2014;33(19):2504-12.
368. Zheng Q, Han L, Dong Y, Tian J, Huang W, Liu Z, et al. JAK2/STAT3 targeted therapy suppresses tumor invasion via disruption of the EGFRvIII/JAK2/STAT3 axis and associated focal adhesion in EGFRvIII-expressing glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2014;16(9):1229-43.
369. Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, Peng W, et al. Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell stem cell*. 2009;4(1):80-93.
370. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401.
371. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer research*. 2004;64(19):7011-21.
372. Westermarck B. Glioblastoma--a moving target. *Upsala journal of medical sciences*. 2012;117(2):251-6.
373. Zaidi HA, Kosztowski T, DiMeco F, Quinones-Hinojosa A. Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis. *Journal of neuro-oncology*. 2009;93(1):49-60.
374. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, et al. 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*. 2006;9(5):391-403.

375. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*. 2003;63(18):5821-8.
376. Abhold EL, Kiang A, Rahimy E, Kuo SZ, Wang-Rodriguez J, Lopez JP, et al. EGFR kinase promotes acquisition of stem cell-like properties: a potential therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *PloS one*. 2012;7(2):e32459.
377. Bruce WR, Van Der Gaag H. A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO. *Nature*. 1963;199:79-80.
378. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*. 1997;3(7):730-7.
379. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3983-8.
380. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106-10.
381. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*. 2005;65(23):10946-51.
382. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
383. Hambardzumyan D, Squatrito M, Carbajal E, Holland EC. Glioma formation, cancer stem cells, and akt signaling. *Stem cell reviews*. 2008;4(3):203-10.
384. Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nature genetics*. 2000;25(1):55-7.
385. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(6):425-36.
386. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li Y, Burns DK, et al. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer cell*. 2009;15(1):45-56.
387. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, NY)*. 1992;255(5052):1707-10.
388. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(15):5820-9.
389. Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, Marcorelles P, Benos DJ, Lancaster JR, Jr., et al. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PloS one*. 2008;3(11):e3655.
390. Zheng X, Shen G, Yang X, Liu W. Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer research*. 2007;67(8):3691-7.
391. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer research*. 2007;67(9):4010-5.
392. Joo KM, Kim SY, Jin X, Song SY, Kong DS, Lee JJ, et al. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2008;88(8):808-15.
393. Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Boe SO, Svendsen A, et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;122(4):761-8.
394. Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, Crosby K, Seligson D, Palotie A, et al. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer research*. 2003;63(11):2742-6.
395. Li B, Yuan M, Kim IA, Chang CM, Bernhard EJ, Shu HK. Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene*. 2004;23(26):4594-602.

396. Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood*. 2010;116(12):2078-88.
397. Herman SE, Lapalombella R, Gordon AL, Ramanunni A, Blum KA, Jones J, et al. The role of phosphatidylinositol 3-kinase-delta in the immunomodulatory effects of lenalidomide in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(16):4323-7.
398. Luk SK, Piekorz RP, Nurnberg B, Tony To SS. The catalytic phosphoinositol 3-kinase isoform p110delta is required for glioma cell migration and invasion. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2012;48(1):149-57.
399. Bianco R, Shin I, Ritter CA, Yakes FM, Basso A, Rosen N, et al. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2003;22(18):2812-22.
400. Koul D, Shen R, Kim YW, Kondo Y, Lu Y, Bankson J, et al. Cellular and in vivo activity of a novel PI3K inhibitor, PX-866, against human glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2010;12(6):559-69.
401. Papakonstanti EA, Ridley AJ, Vanhaesebroeck B. The p110delta isoform of PI 3-kinase negatively controls RhoA and PTEN. *The EMBO journal*. 2007;26(13):3050-61.
402. Meadows SA, Vega F, Kashishian A, Johnson D, Diehl V, Miller LL, et al. PI3Kdelta inhibitor, GS-1101 (CAL-101), attenuates pathway signaling, induces apoptosis, and overcomes signals from the microenvironment in cellular models of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012;119(8):1897-900.
403. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010;141(1):69-80.
404. Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes & development*. 2004;18(19):2315-35.
405. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature reviews Cancer*. 2006;6(2):107-16.
406. Burgess A, Ruefli A, Beamish H, Warrenner R, Saunders N, Johnstone R, et al. Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells. *Oncogene*. 2004;23(40):6693-701.
407. Cai X, Zhai HX, Wang J, Forrester J, Qu H, Yin L, et al. Discovery of 7-(4-(3-ethynylphenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yloxy)-N-hydroxyheptanamide (CUDC-101) as a potent multi-acting HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor for the treatment of cancer. *Journal of medicinal chemistry*. 2010;53(5):2000-9.
408. Wang J, Pursell NW, Samson ME, Atoyan R, Ma AW, Selmi A, et al. Potential advantages of CUDC-101, a multitargeted HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor, in treating drug resistance and preventing cancer cell migration and invasion. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(6):925-36.
409. Shimizu T, LoRusso PM, Papadopoulos KP, Patnaik A, Beeram M, Smith LS, et al. Phase I First-in-Human Study of CUDC-101, a Multitargeted Inhibitor of HDACs, EGFR, and HER2 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(19):5032-40.
410. Bruzzese F, Leone A, Rocco M, Carbone C, Piro G, Caraglia M, et al. HDAC inhibitor vorinostat enhances the antitumor effect of gefitinib in squamous cell carcinoma of head and neck by modulating ErbB receptor expression and reverting EMT. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(9):2378-90.
411. LaBonte MJ, Wilson PM, Fazzone W, Russell J, Louie SG, El-Khoueiry A, et al. The dual EGFR/HER2 inhibitor lapatinib synergistically enhances the antitumor activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat in colorectal cancer models. *Cancer research*. 2011;71(10):3635-48.
412. Edwards A, Li J, Atadja P, Bhalla K, Haura EB. Effect of the histone deacetylase inhibitor LBH589 against epidermal growth factor receptor-dependent human lung cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(9):2515-24.

413. Song H, Li CW, Labaff AM, Lim SO, Li LY, Kan SF, et al. Acetylation of EGF receptor contributes to tumor cell resistance to histone deacetylase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;404(1):68-73.
414. Zhou C, Qiu L, Sun Y, Healey S, Wanebo H, Kouttab N, et al. Inhibition of EGFR/PI3K/AKT cell survival pathway promotes TSA's effect on cell death and migration in human ovarian cancer cells. *International journal of oncology*. 2006;29(1):269-78.
415. Friday BB, Anderson SK, Buckner J, Yu C, Giannini C, Geoffroy F, et al. Phase II trial of vorinostat in combination with bortezomib in recurrent glioblastoma: a north central cancer treatment group study. *Neuro-oncology*. 2012;14(2):215-21.
416. Iwamoto FM, Lamborn KR, Kuhn JG, Wen PY, Alfred Yung WK, Gilbert MR, et al. A phase I/II trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin for adults with recurrent malignant glioma: North American Brain Tumor Consortium Study 03-03. *Neuro-oncology*. 2011;13(5):509-16.
417. Chou CW, Wu MS, Huang WC, Chen CC. HDAC inhibition decreases the expression of EGFR in colorectal cancer cells. *PloS one*. 2011;6(3):e18087.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Katrin Lamszus danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit. Zudem möchte ich mich für die Unterstützung und konstruktive Zusammenarbeit während meiner Dissertationsarbeit bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Andreas Pommerening-Röser möchte ich mich für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Prof. Dr. Manfred Westphal danke ich für die fortwährende Unterstützung und Förderung während meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Alexander Schulte für die wissenschaftliche Betreuung, die zahlreichen interessanten und konstruktiven Diskussionen und für seine große Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Problemen bedanken. Insbesondere möchte ich mich auch für die technische Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten bedanken, sowie für die immer motivierende und aufmunternde Arbeitsatmosphäre an Land und im Wasser.

Ein Dankeschön auch an Katharina Kolbe, Mareike Holz, Regina Peters, Svenja Zapf, ohne deren Tatkraft, Erfahrung und Unterstützung im Labor sicher kein so effektives Arbeiten möglich gewesen wäre und welche immer für eine äußerst angenehme und harmonische Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Insbesondere bei Katharina möchte ich mich ganz herzlich für ihre Unterstützung „in guten und in schlechten Zeiten“ bedanken!

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern, insbesondere bei Dr. Kristoffer Riecken und bei Prof. Dr. Boris Fehse aus der Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie der Klinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, für ihre Unterstützung bei der RGB-Markierung von Zellen. Ferner möchte ich mich bei PD Dr. Sabine Riethdorf aus dem Institut für Tumorbilogie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, für ihre Unterstützung bei der FISH-Analyse bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Kollegen Annegret Kathagen und Martin Zamykal für den wissenschaftlichen Austausch während meiner Dissertationsarbeit, für das entspannte Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit in allen Lebenslagen.

Mein größter Dank gilt Jan-Peter und meiner Familie, welche mich stets unterstützt haben. Zudem möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, welche mir immer zur Seite gestanden haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit (einschließlich Abbildungen), die anderen Ursprungs sind in jedem Einzelfall mit Angabe des Urhebers als solche kenntlich gemacht habe.

Hamburg, den 10.02.2015

Katrin Liffers