

# Inhibierung der Progression von Glioblastomen durch Blockierung des Insulin-like Growth Factor-1 Rezeptors

## **Dissertation**

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

vorgelegt von  
Martin Jan Zamykal  
aus Düsseldorf

Hamburg 2016

Betreuerin: Prof. Dr. Katrin Lamszus  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie  
Labor für Hirntumorbiologie

Gutachter: Prof. Dr. Arp Schnittger  
Universität Hamburg  
Biozentrum Klein-Flottbek  
Abteilung Entwicklungsbiologie

Vorsitzender: PD Dr. Andreas Pommerening-Röser  
Universität Hamburg  
Biozentrum Klein-Flottbek  
Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie

Tag der Disputation: 11.11.2016

## Inhaltsverzeichnis

|             |                                                                         |           |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>                                                 | <b>1</b>  |
| <b>1.1.</b> | <b>Hirntumore .....</b>                                                 | <b>1</b>  |
| 1.1.1.      | Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme).....                          | 3         |
| 1.1.2.      | Molekularpathologie bei Glioblastomen .....                             | 4         |
| <b>1.1.</b> | <b>Behandlungsoptionen bei Glioblastomen .....</b>                      | <b>6</b>  |
| 1.1.1.      | Standardtherapie.....                                                   | 6         |
| 1.1.2.      | Weitere Behandlungsmethoden.....                                        | 7         |
| 1.1.2.1.    | Angiogeneseinhibitoren .....                                            | 7         |
| 1.1.2.2.    | Signaltransduktionsinhibitoren .....                                    | 8         |
| <b>1.2.</b> | <b>Insulin-like Growth Factor Signalweg .....</b>                       | <b>9</b>  |
| 1.2.1.      | Bedeutung des IGF-Signalwegs in der Onkologie .....                     | 11        |
| 1.2.2.      | Bedeutung des IGF-Signalwegs in Hirntumoren.....                        | 14        |
| 1.2.3.      | Inhibierung des IGF-Signalwegs .....                                    | 16        |
| <b>1.3.</b> | <b>Konvektionstherapie.....</b>                                         | <b>18</b> |
| <b>1.4.</b> | <b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>                                     | <b>19</b> |
| <b>2.</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                      | <b>21</b> |
| <b>2.1.</b> | <b>Material.....</b>                                                    | <b>21</b> |
| 2.1.1.      | Geräte .....                                                            | 21        |
| 2.1.2.      | Zellkulturmedien & Zusätze.....                                         | 21        |
| 2.1.3.      | Chemikalien.....                                                        | 22        |
| 2.1.4.      | Antikörper und Isotypkontrollen.....                                    | 24        |
| 2.1.5.      | Kits.....                                                               | 25        |
| 2.1.6.      | Puffer und Lösungen .....                                               | 25        |
| 2.1.7.      | Verbrauchsmaterial .....                                                | 26        |
| <b>2.2.</b> | <b>Methoden .....</b>                                                   | <b>26</b> |
| 2.2.1.      | Tierversuche.....                                                       | 26        |
| 2.2.1.1.    | Xenotransplantation von Tumorzellen und Explantation der Maushirne..... | 27        |
| 2.2.1.2.    | Bestimmung der Tumorgröße bei U87-induzierten Tumoren.....              | 28        |
| 2.2.1.3.    | Bestimmung der Tumorlast bei GS-12-induzierten Tumoren.....             | 28        |
| 2.2.1.4.    | Histologische Untersuchungen (Hämatoxylin und Eosin Färbung).....       | 28        |
| 2.2.1.5.    | Immunhistologische Analyse .....                                        | 29        |
| 2.2.1.6.    | Gewebemikroarray .....                                                  | 30        |
| 2.2.2.      | <i>In vitro</i> Versuche .....                                          | 30        |
| 2.2.2.1.    | Zellkultur .....                                                        | 30        |
| 2.2.2.2.    | Einfrieren und Auftauen von Zellen .....                                | 31        |
| 2.2.2.3.    | RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen .....                            | 31        |
| 2.2.2.4.    | Konzentrationsbestimmung von RNA .....                                  | 32        |
| 2.2.2.5.    | Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....                             | 32        |
| 2.2.2.6.    | Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) .....                      | 32        |

|             |                                                                                                                                   |           |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.2.7.    | Gewinnung von konditioniertem Medium und Proteinen aus Zelllysaten .....                                                          | 34        |
| 2.2.2.8.    | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....                                                                               | 34        |
| 2.2.2.9.    | Western Blot .....                                                                                                                | 34        |
| 2.2.2.10.   | Durchflusszytometrische Analysen .....                                                                                            | 35        |
| 2.2.2.10.1. | Bestimmung der IGF-1R Expression .....                                                                                            | 36        |
| 2.2.2.10.2. | Annexin V Apoptose-Assay .....                                                                                                    | 36        |
| 2.2.2.11.   | Proliferationsassay .....                                                                                                         | 37        |
| 2.2.2.12.   | Migrationsassay.....                                                                                                              | 38        |
| 2.2.2.13.   | Isolierung und Etablierung von primären Glioblastomstammzelllinien.....                                                           | 39        |
| 2.2.3.      | Auswertung und Statistik.....                                                                                                     | 40        |
| <b>3.</b>   | <b>ERGEBNISSE.....</b>                                                                                                            | <b>41</b> |
| <b>3.1.</b> | <b><i>In vivo</i> Untersuchungen zur Inhibierung des Tumorwachstums.....</b>                                                      | <b>41</b> |
| 3.1.1.      | Wirkung von IMC-A12 auf das Wachstum von U87-Tumoren <i>in vivo</i> .....                                                         | 41        |
| 3.1.2.      | Wirkung von IMC-A12 auf das Wachstum von GS-12-Tumoren <i>in vivo</i> .....                                                       | 43        |
| <b>3.2.</b> | <b>Expressionsanalyse des IGF-Signalwegs in Glioblastomzelllinien und -gewebe.....</b>                                            | <b>46</b> |
| 3.2.1.      | Expressionsanalyse des IGF-1R an Glioblastomgewebeschnitten .....                                                                 | 46        |
| 3.2.2.      | Expressionsanalyse des IGF-1R und der Liganden in Glioblastomzelllinien.....                                                      | 48        |
| <b>3.3.</b> | <b>Funktionelle <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Inhibierung des Wachstums von Glioblastomzelllinien .....</b>                  | <b>52</b> |
| 3.3.1.      | Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Proliferation.....                                                | 52        |
| 3.3.2.      | Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Migration .....                                                   | 54        |
| 3.3.3.      | Auswirkungen der Inhibierung des IGF-1R auf die Apoptose.....                                                                     | 57        |
| <b>3.4.</b> | <b>Analyse der Liganden-induzierten Aktivierung und Blockierung des IGF-Signalwegs</b>                                            | <b>58</b> |
| <b>3.5.</b> | <b>Untersuchungen zum IGF-1R in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen.....</b>                                                | <b>60</b> |
| 3.5.1.      | Expressionsanalyse des IGF-1R in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen.....                                                   | 60        |
| 3.5.2.      | Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Proliferation von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen ..... | 61        |
| <b>3.6.</b> | <b>Untersuchung der IGF-Abhängigkeit von Glioblastom-Primärzellen .....</b>                                                       | <b>63</b> |
| <b>4.</b>   | <b>DISKUSSION.....</b>                                                                                                            | <b>66</b> |
| <b>4.1.</b> | <b><i>In vivo</i> Untersuchungen zur Inhibierung des Tumorwachstums.....</b>                                                      | <b>66</b> |
| 4.1.1.      | Wirkung von IMC-A12 auf das Wachstum von U87-Tumoren <i>in vivo</i> .....                                                         | 66        |
| 4.1.2.      | Wirkung von IMC-A12 auf das Wachstum von GS-12-Tumoren <i>in vivo</i> .....                                                       | 68        |
| 4.1.3.      | Evaluierung der Konvektionstherapie .....                                                                                         | 70        |
| <b>4.2.</b> | <b>Expressionsanalyse des IGF-Signalwegs in Glioblastomzelllinien und -gewebe.....</b>                                            | <b>71</b> |
| 4.2.1.      | Expressionsanalyse des IGF-1R an Glioblastomgewebeschnitten .....                                                                 | 71        |
| 4.2.2.      | Expressionsanalyse des IGF-1R und dessen Liganden in Glioblastomzelllinien .....                                                  | 72        |
| <b>4.3.</b> | <b>Funktionelle <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Inhibierung des Wachstums von Glioblastomzelllinien .....</b>                  | <b>74</b> |
| 4.3.1.      | Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Proliferation.....                                                | 74        |
| 4.3.2.      | Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Migration .....                                                   | 75        |
| 4.3.3.      | Auswirkungen der Inhibierung des IGF-1R auf die Apoptose.....                                                                     | 76        |

|             |                                                                                                                             |            |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.4.</b> | <b>Analyse der Liganden-induzierten Aktivierung und Blockierung des IGF-Signalwegs</b>                                      | <b>77</b>  |
| <b>4.5.</b> | <b>Untersuchungen zum IGF-1R in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen</b>                                               | <b>78</b>  |
| 4.5.1.      | Expressionsanalyse des IGF-1R in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen                                                  | 78         |
| 4.5.2.      | Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Proliferation von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen | 79         |
| <b>4.6.</b> | <b>Untersuchung der IGF-Abhängigkeit von Glioblastom-Primärzellen</b>                                                       | <b>79</b>  |
| <b>4.7.</b> | <b>Fazit</b>                                                                                                                | <b>81</b>  |
| <br>        |                                                                                                                             |            |
| <b>5.</b>   | <b>ANHANG</b>                                                                                                               | <b>82</b>  |
| <b>5.1.</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                                                                                      | <b>82</b>  |
| <b>5.2.</b> | <b>Abstract</b>                                                                                                             | <b>84</b>  |
| <b>5.3.</b> | <b>Abkürzungen</b>                                                                                                          | <b>86</b>  |
| <b>5.4.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                                                 | <b>88</b>  |
| <b>5.5.</b> | <b>Publikationsverzeichnis</b>                                                                                              | <b>99</b>  |
| <b>5.6.</b> | <b>Danksagung</b>                                                                                                           | <b>100</b> |
| <b>5.7.</b> | <b>Eidesstattliche Versicherung</b>                                                                                         | <b>101</b> |

## 1. Einleitung

### 1.1. Hirntumore

Hirntumore sind neoplastische Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) und werden eingeteilt in hirneigene Hirntumore, die *de novo* im Gehirn entstehen, sowie Metastasen, welche aus fremden Geweben in das Gehirn streuen. Laut der International Agency for Research on Cancer sind im Jahr 2012 in Deutschland 7116 bösartige Hirntumore diagnostiziert worden<sup>1</sup>. Diese machen einen Anteil von 1,4 % aller malignen Tumore in Deutschland aus und haben somit eine vergleichsweise niedrige Inzidenz. Das Robert Koch-Institut beziffert diese für das Jahr 2010 auf durchschnittlich 8,7 pro 100.000 Menschen, dabei lag die Häufigkeit bei Männern an einem malignen Hirntumor zu erkranken bei 9,7 und bei Frauen bei 7,3 pro 100.000 Menschen<sup>2</sup>. Die am öftesten diagnostizierte Hirntumorart mit einem Anteil von 36,1 % aller primären Tumore des ZNS ist das Meningeom, welches in über 90 % der Fälle als gutartig klassifiziert wird. Die zweithäufigste Diagnose stellen die Glioblastome mit 15,4 % aller primären Hirntumore dar. Glioblastome gehören zu den Gliomen, welche 80 % aller malignen Hirntumore ausmachen<sup>3</sup>. Gliome sind aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit Gliazellen nach diesen benannt. Zu den Gliazellen gehören Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen, deren Funktionen die Aufrechterhaltung des chemischen Milieus für Nervenzellen sowie die elektrische Isolation von Axonen beinhalten<sup>4</sup>. Gliome werden in Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependymome sowie Mischformen, wie z.B. Oligoastrozytome, eingeteilt, die verschiedene histologische und klinische Charakteristika aufweisen.

**Tabelle 1** WHO-Klassifizierung, Inzidenz und mittlere Überlebensraten bei Gliomen. Modifiziert nach Radner et al. (2002), Schlegel et al. (2003), Ohgaki und Kleihues (2005) und Ostrom et al. (2014)<sup>3,5-7</sup>.

| Tumorentität      |                           | WHO Grad | Inzidenz*<br>[in % aller Gliome] | Mittlere Überlebensrate                          |
|-------------------|---------------------------|----------|----------------------------------|--------------------------------------------------|
| Astrozytome       | Pilozytisches Astrozytom  | I        | 5,1 %                            | meistens kurativ behandelbar                     |
|                   | Diffuses Astrozytom       | II       | 8,9 %                            | 7 - 8 Jahre                                      |
|                   | Anaplastisches Astrozytom | III      | 6,1 %                            | 3 - 5 Jahre                                      |
|                   | Glioblastom               | IV       | 54,7 %                           | 1 Jahr                                           |
| Oligodendrogliome |                           | II - III | 5,9 %                            | Grad II: 10 - 16 Jahre<br>Grad III: 2 - 10 Jahre |
| Oligoastrozytome  |                           | II - III | 3,3 %                            |                                                  |
| Ependymome        |                           | I - III  | 6,7 %                            | keine zuverlässigen Daten                        |

\* Die fehlenden 9,3 % sind sehr seltene Gliome, die nicht eindeutig einer dieser Entitäten zugeordnet werden können.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert Hirntumore in 4 unterschiedliche Malignitätsgrade (WHO-Grade I-IV), welche durch ihre histopathologischen Merkmale bestimmt werden<sup>8</sup>. Zu diesen Merkmalen gehören das Ausmaß der Zelldifferenzierung, zelluläre und nukleäre Polymorphien, mitotische Aktivität, mikrovaskuläre Proliferation und Tumorgewebenekrosen<sup>6</sup>. Dem Glioblastom als dem bösartigsten Gliom wurde der Malignitätsgrad IV zugeordnet. Tabelle 1 fasst die Klassifizierung, Inzidenz und Überlebensraten der Tumorfamilie der Gliome zusammen.

Die Mehrheit der diagnostizierten Gliome machen Astrozytome, zu denen das Glioblastom zählt, mit 74,8 % aus, wohingegen Ependymome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome mit nur 15,9 % deutlich seltener diagnostiziert werden. Ependymome entstehen meistens in der ependymalen Auskleidung des Ventrikelsystems und wachsen entlang der Ventrikel. Sie machen 6,7 % aller Gliome aus, treten aber bevorzugt im Kindesalter auf. Bei Kindern unter 3 Jahren liegt die Inzidenz sogar bei 30 % aller Gliome. Bei Erwachsenen sind Ependymome häufig im Rückenmark lokalisiert, wohingegen sie bei Kindern meistens infratentoriell am 4. Ventrikel vorkommen.

Oligodendrogliome sind diffus infiltrierende und hoch differenzierte Gliome, die vorwiegend im Alter zwischen 40-50 Jahren auftreten. In den meisten Fällen sind sie im Frontallappen lokalisiert, typischerweise in der weißen Substanz, können aber auch die graue Substanz des Cortex infiltrieren. Trotz ihrer Klassifizierung in die WHO-Grade II und III haben sie meistens eine bessere Prognose als Astrozytome desselben Malignitätsgrads.

Oligoastrozytome sind diffus infiltrierende Gliome, die neoplastische Zellen mit astrozytären und oligodendroglialen Morphologien aufweisen. Diese wachsen entweder miteinander vermischt oder voneinander getrennt in verschiedenen Lokalisationen. Wie die Oligodendrogliome treten die Mischgliome häufig im Erwachsenenalter auf und sind meistens im Frontallappen lokalisiert<sup>9</sup>.

Die am häufigsten vorkommenden Gliome sind Astrozytome. Das pilozytische Astrozytom mit dem WHO-Grad I besteht aus differenzierten Tumorzellen, welche langsam und meist abgegrenzt vom Hirngewebe wachsen<sup>5</sup>. Es tritt vor allem im Kindes- und Jugendalter auf und befällt Zerebellum und Mittellinienstrukturen wie z.B. den Nervus opticus und das Dienzephalon. Wenn eine vollständige operative Resektion möglich ist, weisen pilozytische Astrozytome eine günstige Prognose auf und sind kurativ behandelbar<sup>6</sup>.

Diffus wachsende Astrozytome der WHO-Grade II bis IV weisen eine deutlich schlechtere Prognose auf, weil sie invasiv wachsen<sup>5,6</sup>. Das diffuse Astrozytom mit dem WHO-Grad II tritt vor allem im jungen Erwachsenenalter zwischen 30 und 40 Jahren auf und kann im gesamten ZNS vorkommen, jedoch vorwiegend in den Großhirnhemisphären. Aufgrund des invasiven Wachstums ist eine vollständige operative Resektion nicht möglich, sodass

sich häufig Rezidive bilden. Dabei tendieren sie durch Dedifferenzierung der Tumorzellen zur malignen Progression in höhergradige Astrozytome der WHO-Grade III und IV. Die individuelle Prognose wird daher stark von der Schnelligkeit der Rezidivierung und des progredienten Wachstums beeinflusst, wird aber im Mittel auf 7-8 Jahre beziffert<sup>6</sup>.

Astrozytome des WHO-Grads III, welche auch anaplastische Astrozytome genannt werden, weisen histologisch eine deutlich höhere Zellularität, vermehrte Kernatypien und eine höhere mitotische Aktivität auf als die niedriger klassifizierten Astrozytome. Sie können *de novo* oder als Rezidive von diffusen Astrozytomen durch maligne Progression entstehen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 40 und 50 Jahren. Mit multimodalen Therapieansätzen, welche Operation, Strahlen- und Chemotherapie beinhalten, kann die Überlebensrate auf 3-5 Jahre verlängert werden. Auch anaplastische Astrozytome können lokal rezidivieren und sich durch maligne Progression zu Grad IV Astrozytomen entwickeln<sup>6</sup>.

Das einzige Astrozytom, das von der WHO mit dem Malignitätsgrad IV klassifiziert wird, ist das Glioblastom, auf das im folgenden Abschnitt genauer eingegangen wird, weil es die zentrale Tumorentität der vorliegenden Arbeit darstellt.

#### 1.1.1. Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme)

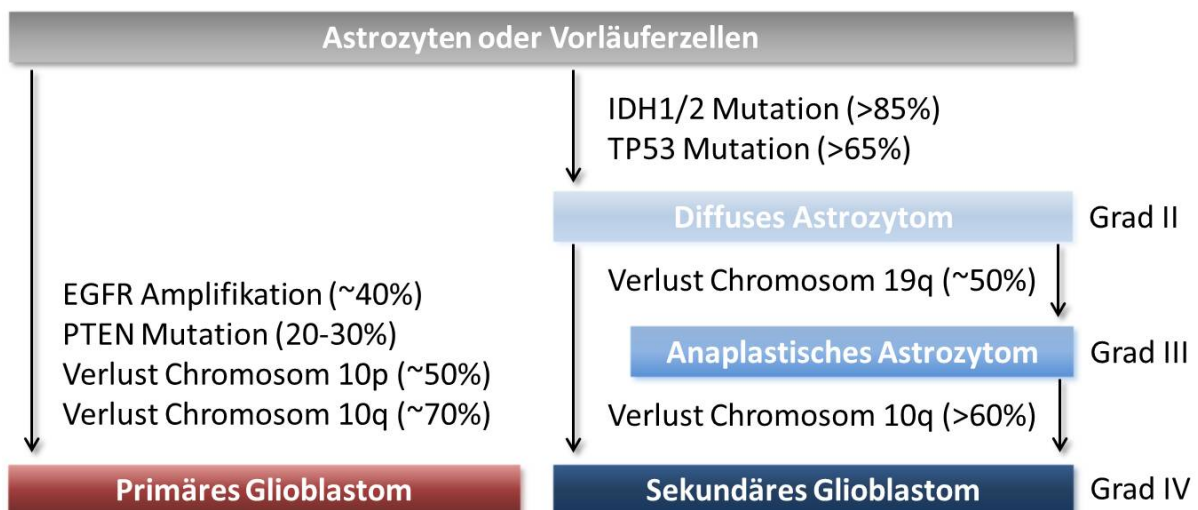
Glioblastome weisen eine jährliche Inzidenz von 2,9 pro 100.000 Menschen auf und stellen mit knapp 55 % die häufigste Subentität der Gliome dar<sup>3,6</sup>. Mit einer mittleren Lebenserwartung von 14,6 Monaten haben Glioblastompatienten die schlechteste Prognose aller Gliompatienten<sup>10</sup>. Die 2-, 3-, 4- und 5-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeiten liegen bei 27 %, 16 %, 12 % bzw. 10 %. Das Glioblastom ist ein sehr aggressiver Tumor, der durch eine hohe Zelldichte, schnelles Zellwachstum, einen hohen Grad an dedifferenzierten Zellen, viele Zell- und Kernatypien sowie hohe Invasivität in naheliegendes Hirnparenchym charakterisiert ist. Zusätzlich zu den histologischen Charakteristika von niedriggradigen Astrozytomen werden bei Glioblastomen Gewebenekrosen und/oder vaskuläre Proliferation beobachtet, welche als Kriterien für die diagnostische Klassifizierung von Glioblastomen essenziell sind<sup>6,9</sup>. In vielen Fällen streuen die Tumorzellen über das Corpus Callosum sogar in die gegenüberliegende Hirnhemisphäre. Diese hohe zelluläre Invasivität macht eine vollständige Resektion des Tumors unmöglich, sodass sich immer Rezidive bilden. Im Gegensatz zu *de novo* entstandenen Glioblastomen, welche primäre Glioblastome genannt werden und 90 % all jener ausmachen, können sich Astrozytome gemäß WHO-Grad II und III auch zu Glioblastomen weiterentwickeln. Glioblastome, die aus solch einer malignen Progression hervorgehen, werden als sekundäre Glioblastome bezeichnet<sup>11</sup>. Primäre Glioblastome treten typischerweise in hohem Lebensalter zwischen 50 und 70 Jahren auf, wohingegen



Patienten mit sekundären Glioblastomen wesentlich jünger sein können. Histologisch sind primäre und sekundäre Glioblastome voneinander nicht zu unterscheiden, jedoch besitzen beide Arten molekularbiologische Merkmale, die eine Differenzierung ermöglichen. Diese werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

#### 1.1.2. Molekularpathologie bei Glioblastomen

Die exakten Mechanismen für die Entstehung von primären und sekundären Glioblastomen sind bisher nicht bekannt, jedoch konnten genetische Mutationen, Amplifikation und Chromosomanomalien identifiziert werden, die charakteristisch für primäre und sekundäre Glioblastome sind. Bei primären Glioblastomen liegen vor allem Amplifikationen des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (*EGFR*) Gens und Mutationen des Phosphatase und Tensin Homolog (*PTEN*) Gens vor, wohingegen sekundäre Glioblastome Mutationen der Isocitratdehydrogenase (*IDH*) Gene-1 und -2 sowie des Tumorsuppressorgens *TP53* aufweisen<sup>11</sup>. Diese genetischen Veränderungen haben Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion, welche u.a. den Zellzyklus, das Zellwachstum sowie das Überleben kontrollieren. Die wichtigsten Driver-Mutationen in der Entstehung von primären und sekundären Glioblastomen sind in Abbildung 1 zusammengefasst.



**Abbildung 1** Genetische und chromosomale Veränderungen in der Entstehung von primären und sekundären Glioblastomen. Modifiziert nach Ohgaki & Kleihues (2009, 2013) und Hegi & Stupp (2013)<sup>11-13</sup>.

Das *EGFR* Gen ist in über 40 % der primären Glioblastome amplifiziert und führt durch die hiermit einhergehende Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors zu erhöhter Zellproliferation und -migration sowie zur Inhibition der Apoptose<sup>14,15</sup>. In einem Drittel der Glioblastome mit *EGFR* Amplifikation findet sich außerdem eine mutierte konstitutiv aktive Deletionsvariante, welche *EGFRvIII* genannt wird und unkontrolliert Wachstums- und

Überlebenssignale über den darunter geschalteten Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K-) Signalweg sendet<sup>16,17</sup>. Dieser Effekt der unkontrollierten Aktivierung des PI3K-Signalwegs wird durch die Mutation oder den chromosomalen Verlust von *PTEN* auf Chromosom 10 verstärkt, welche in ca. 25 % bzw. ca. 70 % aller primären Glioblastome vorkommt<sup>18,19</sup>. Das *PTEN* Gen codiert einen intrazellulären Regulator, der phosphorylierte Substrate des PI3K-Signalwegs dephosphoryliert und somit deaktiviert.

In sekundären Glioblastomen können *PTEN* Mutationen ebenfalls identifiziert werden, jedoch zu einem sehr viel geringeren Anteil (<10 %). Für eine präzisere Unterscheidung von primären und sekundären Glioblastomen, ist eine Untersuchung des *IDH* Gens von größerer Bedeutung. Es codiert ein zentrales Enzym des Zitratzyklus, welches in ca. 80 % aller Astrozytome, Oligoastrozytome und Oligodendrogliome der Grade II und III sowie sekundären Glioblastomen mutiert ist<sup>20-22</sup>. Die Beobachtung, dass *IDH* Mutationen in niedriggradigen Astrozytomen, Oligodendrogliomen und Oligoastrozytomen, aber nicht in primären Glioblastomen auftreten, lässt vermuten, dass diese Tumorentitäten dem gleichen *IDH*-mutierten Ursprungszelltyp entstammen<sup>23</sup>. Wohingegen für die Entstehung von Oligodendrogliomen der gleichzeitige (Teil-)Verlust der Chromosomarme 1p und 19q als Folgemutationen identifiziert wurden, ist in diffusen und anaplastischen Astrozytomen häufig die Mutation des Tumorsuppressorgens *TP53* zu beobachten<sup>12</sup>. Diese Mutation kommt in über zwei Drittel der sekundären Glioblastome vor, wohingegen sie nur in einem Viertel der primären Glioblastome auftritt<sup>24,25</sup>. Der mutierte Transkriptionsfaktor p53 ist dadurch nicht mehr fähig an die DNA zu binden und die Transkription von p21 zu induzieren, welches den Zellzyklus zwischen G<sub>1</sub>- und S-Phase reguliert. Folglich führt auch diese Mutation zu unkontrolliertem Wachstum der Zelle. In pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I), die sich histologisch von den höhergradigen Astrozytomen durch ihr langsames und weniger diffuses Wachstum unterscheiden, ist der wichtigste diagnostische Marker eine Mutation oder Fusion des *BRAF* Gens, welche in 80 % dieser Astrozytome vorkommt<sup>26,27</sup>.

Trotz diverser genetischer Unterschiede, die eine Diskriminierung zwischen primären und sekundären Glioblastomen ermöglichen, teilen über 60 % beider Entitäten den (Teil-) Verlust des Chromosomarms 10q<sup>28,29</sup>. Diese Deletion betrifft jedoch nicht den Locus auf dem *PTEN* codiert ist, sodass hier andere Gene an der Entstehung von Glioblastomen beteiligt sein können, die bisher noch nicht identifiziert wurden.

Diese und weitere molekularpathologische Unterschiede bei primären und sekundären Glioblastomen ermöglichen nicht nur eine genauere Diagnose und Stratifizierung der Patienten, sondern auch verschiedene experimentelle Therapieansätze, die zusätzlich zur Standardtherapie eingesetzt werden können.

## 1.1. Behandlungsoptionen bei Glioblastomen

### 1.1.1. Standardtherapie

Glioblastome gehören zu den nicht heilbaren Tumorerkrankungen und können bisher nur palliativ behandelt werden, jedoch hat sich die Überlebensrate seit den 70er Jahren immerhin von ca. 3 auf 14 Monate verlängert<sup>30</sup>. Die Grundlage der Therapie besteht aus einer möglichst vollständigen operativen Resektion des Tumors. Eine retrospektive Studie der Klinik für Neurochirurgie des M.D. Anderson Cancer Center in Houston ergab, dass eine Resektion der Tumormasse von 98 % oder mehr die mediane Überlebensrate um 4 Monate erhöht im Vergleich zu einer Resektion von weniger als 98 %<sup>31</sup>. Eine vollständige Resektion ist aufgrund des invasiven Wachstums von Glioblastomen jedoch nicht möglich, außerdem wird der operative Eingriff von der Lokalisation des Tumors limitiert. Damit neue neurologische Defizite vermieden werden können, sollte die Protektion von funktionell wichtigen Hirnregionen höhere Priorität genießen als eine möglichst radikale Operation<sup>6</sup>. Eine weitere signifikante Steigerung der mittleren Überlebensrate von 3 auf 8 Monate erfolgte durch die Einführung einer postoperativen fraktionierten Strahlentherapie<sup>32,33</sup>. Obwohl systemische oder lokale Behandlung mit Chemotherapeutika der Familie der Nitrosoharnstoffe (ACNU, BCNU, CCNU) lange Jahre zusätzlich zur Strahlentherapie verwendet wurden, führten diese nur zu marginalen Therapieerfolgen<sup>30</sup>. Erst die simultane adjuvante Behandlung mit dem Zytostatikum Temozolomid (TMZ) erhöhte die mittlere Überlebensrate nochmals deutlich auf derzeit knapp 15 Monate<sup>34</sup>. Die zytotoxische Wirkung von Temozolomid beruht auf der Störung der zellulären DNA-Replikation, indem es Guanin zu O<sup>6</sup>-Methylguanin methyliert und dadurch die Bindung mit der komplementären DNA-Base Cytosin verhindert. Das Reparaturenzym O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) beseitigt diese Methylgruppe von Guanin und kann somit dem therapeutischen Effekt von TMZ entgegenwirken. Eine vorherige Untersuchung der Promotormethylierung des *MGMT*-Gens hat daher einen prädiktiven Wert für die Behandlung mit TMZ. Bei einer Methylierung des *MGMT*-Promotors ist das Gen epigenetisch inaktiviert, sodass die Wirkung von TMZ durch MGMT nicht beeinflusst werden kann. Unmethylierter *MGMT*-Promotor, d.h. aktiviertes *MGMT*-Gen, kann zu einer intrinsischen Resistenz gegen TMZ führen<sup>35,36</sup>.

Nach erfolgreicher Anwendung der derzeitigen Standardtherapie kommt es jedoch in den meisten Fällen innerhalb eines Jahres zur Rezidivbildung, der entweder mit erneuter Standardtherapie entgegengewirkt werden kann oder mit der Verwendung von experimentellen Behandlungsmethoden. Diese umfassen z.B. den Einsatz von Antikörpern und niedermolekularen Wirkstoffen („small molecules“) für die Blockierung

von wichtigen Signaltransduktionswegen. Mögliche Zielstrukturen sind Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren und betreffen unter anderem die Blutgefäßneubildung (Angiogenese). Andere aktuell stark diskutierte Behandlungsmethoden befassen sich mit der Immuntherapie von Gliomen. Dabei wird versucht das Immunsystem so zu modulieren, dass der Tumor beseitigt wird und einer Rezidivierung durch das sogenannte „immunologische Gedächtnis“ vorgebeugt wird<sup>37</sup>. Unter anderem werden hierfür autologe T-Zellen *ex vivo* mit Tumorzellen kultiviert, um gegen die Tumorzellen gerichtete T-Zellen zu expandieren. Ein weiteres immuntherapeutisches Verfahren versucht das Immunsystem mittels Vakzinierung mit Tumor-assoziierten Antigenen gegen den Tumor zu richten.

### 1.1.2. Weitere Behandlungsmethoden

#### 1.1.2.1. Angiogeneseinhibitoren

Mit dem Begriff Angiogenese bezeichnet man das Wachstum von Blutgefäßen durch Sprossung aus bereits existierenden Gefäßen. Im Laufe des Wachstums von soliden Tumoren kommt es zu einem Punkt, an dem das Blutgefäßnetz den Tumor nicht mehr ausreichend versorgen kann, sodass dieser hypoxisch also mit Sauerstoff unterversorgt ist. Daraufhin sezernieren unterversorgte Tumorzellen verschiedene Botenstoffe, welche die Blutgefäßbildung in hypoxische Tumorregionen stimulieren, ein Mechanismus der „angiogener switch“ genannt wird<sup>38,39</sup>. Der zentrale Botenstoff für Angiogenese ist der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)-A, der an den VEGF-Rezeptor (VEGFR) auf Endothelzellen bindet und in diesen migrations- und proliferations-induzierende Prozesse aktiviert. In Glioblastomen konnten diese Moleküle 1992 nachgewiesen werden<sup>40</sup>. Die publizierten *in situ* Untersuchungen zeigten, dass Gliomzellen VEGF und die dazugehörigen Tumorendothelzellen den VEGFR exprimieren. Die Mehrheit der Angiogeneseinhibitoren blockiert den VEGF Signalweg, dazu gehören verschiedene niedermolekulare Wirkstoffe, die in klinischen Studien bisher jedoch enttäuscht haben<sup>41</sup>. Vielversprechendere Ergebnisse wurden mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Avastin) erzielt, welcher 2009 von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA für die Behandlung von rezidivierenden Glioblastomen zugelassen wurde. Bevacizumab bindet VEGF und inhibiert dadurch dessen Interaktion mit dem VEGFR. Jedoch können sich schon nach wenigen Monaten Resistenzen gegen die antiangiogene Behandlung entwickeln, z.B. indem die Tumorzellen invasiv entlang bereits vorhandener Blutgefäße migrieren<sup>42,43</sup>. In zwei Phase III Studien zeigte Bevacizumab keine zusätzliche Verbesserung zur Standardtherapie bei neu diagnostizierten Glioblastomen, wohingegen die Anzahl der beobachteten Neben-

wirkungen anstieg<sup>44,45</sup>. Somit wird der Einsatz von Angiogenesinhibitoren für die Behandlung von Glioblastomen bisher als umstritten angesehen.

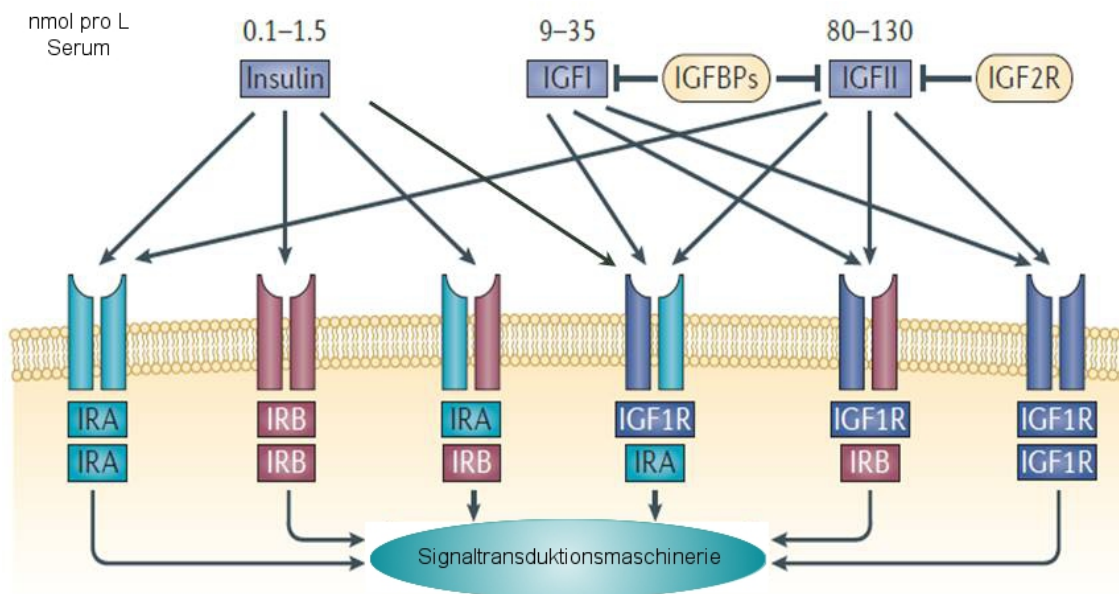
#### 1.1.2.2. Signaltransduktionsinhibitoren

Wichtige Glioblastom-assoziierte Signalwege können entweder intrazellulär oder auf der Ebene von Tyrosinkinaserzeptoren blockiert werden. Der PI3K- und der mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)-Signalweg z.B. sind wichtige intrazelluläre Transmitter von Tyrosinkinaserzeptoren, welche die Proliferation, Migration und Apoptose regulieren. Tyrosinkinaserzeptoren, wie z.B. der EGFR oder VEGFR, können sowohl intrazellulär mittels niedermolekularer Wirkstoffe als auch extrazellulär mithilfe von Antikörpern blockiert werden.

Der EGFR, der in 40 % der primären Glioblastomen amplifiziert vorliegt, ist ein zentrales therapeutisches Ziel für die Behandlung von Glioblastomen. Die niedermolekularen Therapeutika Erlotinib und Gefitinib, welche die Tyrosinkinase des EGFR intrazellulär blockieren, haben bei Glioblastomen in verschiedenen klinischen Studien jedoch allenfalls geringe Wirksamkeit bewiesen, obwohl diese im Gegensatz zu Antikörpern leichter die Bluthirnschranke passieren sollen (siehe Abschnitt 1.4) und auch die mutierte Variante EGFRvIII inhibieren können<sup>46</sup>. In klinischen Studien mit EGFR-Antikörpern konnte ebenfalls keine Verbesserung der Standardtherapie erzielt werden. So konnten z.B. für den Antikörper Nimotuzumab keine signifikanten Verlängerungen der progressionsfreien und allgemeinen Überlebenszeit bei neu diagnostizierten Glioblastomen beobachtet werden<sup>47</sup>. Besonders EGFRvIII-spezifische Therapeutika wecken große Hoffnungen für die Behandlung von Glioblastomen, weil durch die hohe Tumorselektivität die Nebenwirkungen für gesundes Gewebe verringert werden sollen. So zeigten Sampson et al. in einer Phase II Studie bei EGFRvIII-positiven Glioblastomen, dass eine Impfung mit einem Peptid, welches ein EGFRvIII-Epitop beinhaltet, sicher ist und die spezifische Immunabwehr gegen EGFRvIII-positive Glioblastomzellen aktiviert<sup>48</sup>. Diese Impfung, die nach Strahlentherapie verabreicht wurde, verlängerte die allgemeine Überlebenszeit signifikant von 15 auf 26 Monate im Vergleich zur Kontrollgruppe, die chemotherapeutisch behandelt wurde. Des Weiteren konnten in immunhistologische Untersuchungen keine EGFRvIII-positiven Tumorzellen in Rezidiven beobachtet werden. Jedoch können von dieser Behandlung nur Patienten mit EGFRvIII-positiven Gliomen profitieren. So zeigt diese Studie, dass eine molekulargenetische Stratifizierung der Patienten bei selektiven Zielstrukturen nötig ist, um die Wirkung spezifischer Inhibitoren besser vorherzusagen und Behandlungsergebnisse zu verbessern<sup>49-51</sup>.

## 1.2. Insulin-like Growth Factor Signalweg

Der Insulin-like Growth Factor Signalweg ist, wie der Name sagt, eng mit dem Insulin Signalweg verwandt. Der Insulin Rezeptor (IR) und der Insulin-like Growth Factor-1 Rezeptor (IGF-1R) sind tetramere Tyrosinkinaserzeptoren, die je aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Kette bestehen. Der IR tritt in der vollständigen Isoform, dem IR-B, und in der alternativ gespleißten Isoform IR-A auf, welchem die Aminosäuren fehlen, die durch Exon 11 codiert sind. Die klassische Funktion der Blutzuckerregulation wird hauptsächlich durch den IR-B vermittelt, der primär in der Leber, den Muskeln und im Fettgewebe exprimiert wird. Der IR-A wird vor allem in foetalen Geweben und in Krebszellen exprimiert und aktiviert Wachstumsprozesse. Die Insulinrezeptoren und der IGF-1R sind auf Ebene der Aminosäuresequenz zu über 50 % homolog<sup>52</sup>, sodass auch Hybridrezeptoren zwischen ihnen gebildet werden können (Abb. 2).



**Abbildung 2** Die Hauptkomponenten des Insulin- und IGF-Signalwegs. Modifiziert nach Pollak (2012) und Pandini et al. (2002)<sup>53,54</sup>.

Insgesamt existieren sechs verschiedene homodimere und heterodimere Rezeptoren: IR-A/IR-A, IR-B/IR-B, IGF-1R/IGF-1R und die Hybridrezeptoren. Die homo- und heterodimeren IGF-1 Rezeptoren sind ebenfalls Mitogenrezeptoren bis auf den Hybridrezeptor IGF-1R/IR-B, der metabolische Signale vermittelt. Neben dem IGF-1R existiert auch der IGF-2 Rezeptor, welcher mit hoher Affinität den entsprechenden Liganden IGF-2 bindet, aber keine Tyrosinkinasefähigkeit aufweist. Es wird vermutet, dass seine Funktion unter anderem darin besteht, die Aktivität von IGF-2 durch lysosomale Degradierung zu reduzieren<sup>53,55–57</sup>.

Zu den Liganden des IGF-Signalwegs gehören die Peptidhormone IGF-1 und IGF-2, die eine Sequenzhomologie von 62 % zueinander und von ca. 40 % zu Insulin aufweisen<sup>58</sup>.

Der Ligand IGF-1 bindet mit hoher Affinität an homo- und heterodimere IGF-1-Rezeptoren<sup>54</sup>. Er wird vor allem während der Pubertät exprimiert, um systemisches Wachstum zu stimulieren. Dabei führt die Ausschüttung des Wachstumshormons Somatropin in der Hypophyse zu der Produktion von IGF-1 in der Leber, welches über die Blutzirkulation in die Zielgewebe gelangt und dort seine mitogene Wirkung entfalten kann<sup>59</sup>. Zusätzlich findet auch auto- und parakrine Signalgebung in adulten Geweben statt. IGF-1-vermittelte Signaltransduktion ist im Erwachsenenalter weiterhin aktiv, jedoch nimmt die Konzentration an zirkulierendem IGF-1 im Blut mit zunehmendem Alter ab<sup>60</sup>. IGF-2 hingegen wird vor allem in der pränatalen Entwicklung exprimiert, während derer es das embryonale Wachstum stimuliert<sup>61</sup>. Auch IGF-2 hat eine sehr hohe Affinität zu homo- und heterodimeren IGF-1 Rezeptoren, jedoch bindet es außerdem den homodimeren IR-A, welcher ebenfalls vorwiegend in pränatalen Geweben exprimiert wird. Eine weitere Überschneidung des Insulin- und IGF-Signalwegs kann durch Bindung von Insulin an den Hybridrezeptor IGF-1R/IR-A erfolgen, wenn die Insulinkonzentration superphysiologische Werte erreicht<sup>54</sup>.

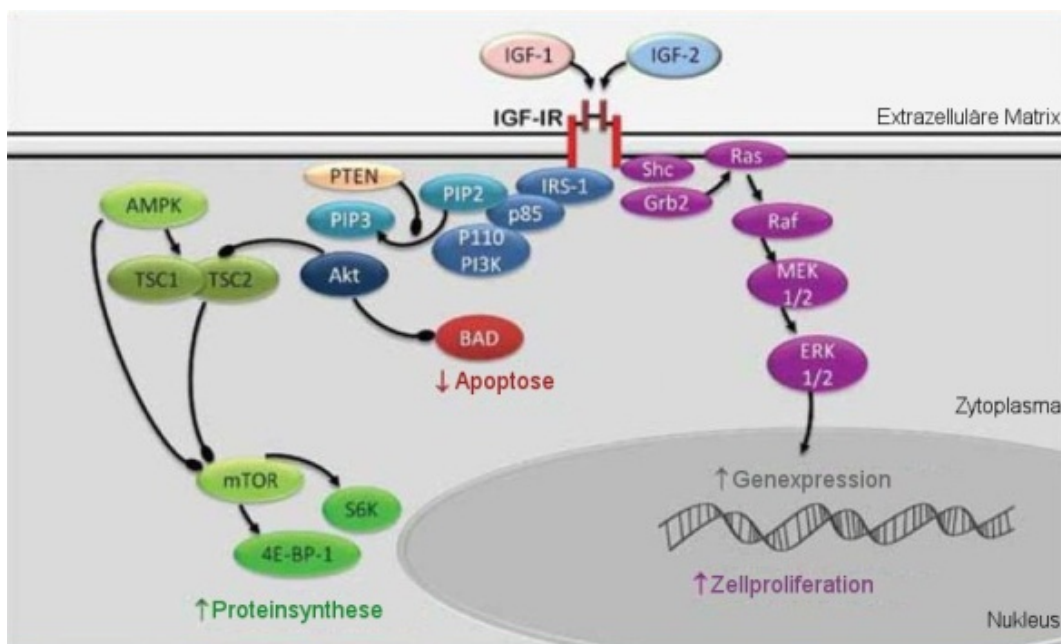
Reguliert wird der IGF-Signalweg von 6 verschiedenen IGF-Bindungsproteinen (IGFBP), die mit unterschiedlich hohen Affinitäten die IGF-1R-Liganden binden. Mit der Bindung der Liganden modulieren sie ihre Aktivität, indem sie den Transport vom Blut in periphere Gewebe ermöglichen, die Halbwertszeit der Liganden verlängern oder die Interaktion mit dem IGF-1R inhibieren oder erleichtern<sup>62</sup>. Zirkulierende IGFBP-Proteasen schneiden die IGF-Bindungsproteine proteolytisch und verringern dadurch die Affinität des Liganden, um diese für den IGF-1R oder andere IGFBP verfügbar zu machen. Diese durch Proteolyse entstandenen IGFBP-Fragmente können auch direkte IGF-unabhängige Effekte haben<sup>63</sup>.

Nach erfolgreicher Bindung von IGF-1 oder -2 an die  $\alpha$ -Ketten des homo- oder heterodimeren IGF-1R kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Die  $\beta$ -Ketten nähern sich einander, sodass die Tyrosinreste an den Positionen 1131, 1135 und 1136 der Aminosäurekette autophosphoryliert werden<sup>64</sup>. Dies führt zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase, die weitere Tyrosinreste phosphoryliert, welche als Bindungsstellen für verschiedene Rezeptorsubstrate fungieren (Abb. 3).

Einer der wichtigsten Tyrosinreste ist an Position 950 der Aminosäurekette, welche die Adapterproteine Insulinrezeptorsubstrat (IRS) 1-4 sowie Shc (Src homology 2 domain containing)-transformierendes Protein bindet, welche Phosphorylierungskaskaden auslösen<sup>65</sup>. Phosphoryliertes IRS-1 kann den Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg aktivieren, indem es die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K anregt. Dies führt zur Phosphorylierung des zentralen Signalproteins AKT (Proteinkinase B), welches einerseits das pro-apoptotische Protein BAD inhibiert und dadurch das Zellüberleben erhöht, andererseits mittels Aktivierung von mTOR und der p70 S6-Kinase die Proteinsynthese

induziert und damit Wachstum und Proliferation fördert. Gleichmaßen kann das Adapterprotein Shc die MAPK-Signaltransduktion aktivieren, indem in einer weiteren Phosphorylierungskaskade die Kinasen Ras, Raf, MEK 1/2 und ERK 1/2 phosphoryliert werden, die ebenfalls Zellwachstum und -proliferation induzieren<sup>66</sup>.

Wachstumsfaktoren, ihre Rezeptoren und die dazugehörigen intrazellulären Signaltransduktionswege sind in vielen Tumorentitäten überexprimiert oder mutiert, sodass Wachstums- und Überlebenssignale unkontrolliert vermittelt werden. In den folgenden Abschnitten soll die Rolle des IGF-1 Signalwegs in der Onkologie im Allgemeinen und in Gliomen im Speziellen erläutert werden.



**Abbildung 3** Signaltransduktion des IGF-1R. Nach erfolgreicher Ligandenbindung werden als Hauptsignalwege der PI3K-AKT- sowie der MAPK-Signalweg aktiviert, welche zu Zellwachstum und -proliferation sowie zu verringerter Apoptose führen. Modifiziert nach Gallagher et al. (2010)<sup>67</sup>.

### 1.2.1. Bedeutung des IGF-Signalwegs in der Onkologie

Im Gegensatz zu Insulin, welches fast ausschließlich von  $\beta$ -Zellen in der Bauchspeicheldrüse produziert wird und durch das Blut transportiert wird, werden IGF-1 und -2 neben der Leber auch in anderen Geweben und vermehrt in Tumoren exprimiert<sup>68</sup>. Es gibt verschiedene Ursachen, die dazu führen können, dass Komponenten des IGF-Signalwegs von neoplastischen Zellen überexprimiert werden. Zum einen unterliegt das *Igf2* Gen genomischem Imprinting, d.h. das maternale Allel ist stillgelegt. Wenn diese epigenetische Modifikation verloren geht, liegen beide Allele aktiv vor und es kommt zur Überexprimierung von IGF-2. Entdeckt wurde dieses Phänomen in einem Nephroblastom, einem Nierentumor im frühen Kindesalter<sup>69,70</sup> und als potenzieller Marker für kolorektale Karzinome<sup>71</sup>. Eine weitere häufige Ursache für die Überaktivierung des IGF-Signalwegs



kann im Verlust oder der Mutation von Tumorsuppressorgenen liegen. Der Wildtyp des Transkriptionsfaktors p53 (*TP53*) hat z.B. eine inhibitorische Wirkung auf die Expression von IGF-1R und IGF-2<sup>72-74</sup>. Wenn p53 wie in ca. 50 % aller Tumore mutiert ist, dann kann es zu einer Überaktivierung des IGF-Signalwegs kommen. Gleichmaßen verhält es sich mit dem Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor PTEN, welcher IGF-1R, IGF-1 und IGF-2 in einer Vielzahl von humanen und murinen Krebszellen herunterregulieren kann<sup>75,76</sup>. Des Weiteren wurde beobachtet, dass der IR-A, der normalerweise nur von foetalen Zellen exprimiert wird, in Brust-, Kolon- und Lungenkarzinomen überexprimiert wird<sup>77</sup>. Diese Tumorzellen haben den Wachstumsvorteil, dass sie durch IGF-2 stimuliert werden können, dem IGF-1R-Liganden mit der höchsten Konzentration im Blut.

Wegen des stimulierenden Effekts auf das Wachstum von Tumorzellen wird vermutet, dass die Konzentration an zirkulierendem IGF mit dem Krebsrisiko korrelieren kann. Individuen mit Akromegalie, die hohe Konzentrationen Somatropin und IGF-1 im Blut aufweisen, sollen ein erhöhtes Risiko besitzen an Kolon-, Brust- und Prostatakrebs zu erkranken<sup>78</sup>. Dementsprechend wurde publiziert, dass Menschen mit Laron-Syndrom, die eine Somatropininsensitivität und deshalb verringerte IGF-1 Werte besitzen, im Gegensatz zu ihren gesunden Verwandten ein geringeres Risiko haben an Krebs zu erkranken<sup>79,80</sup>. In weiteren epidemiologischen Studien konnte beobachtet werden, dass erhöhte IGF-Konzentrationen sowie verringerte IGFBP-3 Werte mit einem erhöhten Brust-, Prostata-, Lungen- und Kolorektalkrebsrisiko korrelieren<sup>71,81-84</sup>. Trotz dieser epidemiologischen Zusammenhänge existieren auch widersprüchliche Daten zur Relevanz des IGF-Signalwegs in malignen Tumoren. In immunhistologischen Untersuchungen von 210 Brustkrebspräparaten wurde zwar in 44 % der Tumore eine Überexpression des IGF-1R beobachtet, jedoch korrelierte diese nicht mit prognostischen Parametern wie z.B. der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus oder dem histologischen Grad<sup>85</sup>. In einer anderen Studie konnte eine prognostische Funktion des IGF-1R gezeigt werden<sup>86</sup>. Oestrogenrezeptor-negative und IGF-1R-positive Mammakarzinome hatten dabei eine schlechtere Prognose als doppelt negative Tumore. Für Prostatatumore existieren ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss des IGF-1R und Tumorprogression. Bei benignen und malignen Tumoren konnte keine Korrelation zwischen der Expression von Komponenten des IGF-Systems und dem Tumorgrad oder der perineuralen Invasion beobachtet werden<sup>87</sup>. Diese Beobachtung wurde in einer anderen Studie angefochten, bei der gezeigt wurde, dass die Expression von IGF-1R in malignen Prostatatumoren und Knochenmetastasen höher ist als in benignen Tumorgewebe<sup>88</sup>. Diese kontroversen Daten zeigen, dass der IGF-Signalweg nur bedingt als prognostischer Biomarker für die Therapie von bestimmten Tumorentitäten herangezogen werden kann. Zusätzlich zur Erhöhung der Proliferation und der

Reduzierung der Apoptose hat der IGF-Signalweg auch Einfluss auf die Tumorangio-genese, Migration und Invasion von Tumorzellen, Radio- und Chemo-resistenz sowie auf die Entwicklung und Versorgung von Tumorzellen mit Stammzell-eigenschaften<sup>89</sup>.

In mehreren Tumorzelllinien, wie z.B. Schilddrüsen-, Kolon- und Pankreaskarzinomzellen, konnte nachgewiesen werden, dass IGF-1 die Expression von VEGF *in vitro* aktiviert, welches der wichtigste angiogene Faktor für Endothelzellen ist<sup>90-92</sup>. In weiteren Studien mit kultivierten Zellen konnte ebenfalls eine IGF-induzierte Expression des hypoxischen Transkriptionsfaktors Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$  beobachtet werden, welcher die Expression von VEGF und weiteren angiogenen Zytokinen reguliert<sup>93,94</sup>. Umgekehrt wurde *in vivo* und in kultivierten Tumorzellen beobachtet, dass Stressfaktoren wie Hypoxie und Glukosearmut auch Einfluss auf die Expression von IGF-1 und -2 sowie IGF-1R haben<sup>95-97</sup>. Des Weiteren fördert IGF-1 die Motilität von Endothelzellen und die Differenzierung von Progenitorzellen zu Endothelzellen, beides wichtige Voraussetzungen für die Blutgefäßneubildung<sup>98-100</sup>. Endothelzellen sprechen auf Stimulation mit IGF-1 an, weil Endothelzellen von Makrogefäßen und Kapillaren den IGF-1R exprimieren<sup>101</sup>. Autokrine Signalgebung findet jedoch kaum statt, weil die Expression von IGF-1 in Endothelzellen sehr gering ist<sup>102</sup>.

Das Migrationsverhalten sowie die Invasion von Tumorzellen werden ebenfalls vom IGF-Signalweg beeinflusst. In mehreren Studien induzierte die Aktivierung des IGF-1R die Synthese der Matrix-Metalloprotease (MMP)-2, welches zu einer erhöhten Invasion von kultivierten Tumorzellen in dreidimensionalen Substraten führte<sup>103,104</sup>. In Brustkrebszellen steigerte IGF-1 die Aktivität von MMP-9 und erhöhte dadurch die Migration *in vitro*<sup>105</sup>. Diese Assoziation des IGF-Signalwegs mit erhöhter MMP-Expression wurde nur in der H-ras-transformierten Tumorzelllinie C3 beobachtet, welche durch eine hohe Malignität und Metastasenbildung charakterisiert ist, jedoch nicht in der morphologisch untransformierten Zelllinie NR3, die nur benigne Tumore *in vivo* bildet<sup>104</sup>. Somit wird in dieser Publikation ein Bezug zwischen dem IGF-Signalweg und der Malignität von Tumoren hergeleitet.

Tumorzellen, die solch ein erhöhtes Migrationspotenzial aufweisen, sind die sogenannten Tumorstammzellen, welche u.a. im Verdacht stehen, für die Metastasierung und Rezidivierung von Tumoren verantwortlich zu sein<sup>106</sup>. Die Gruppe um Sean Bendall hat beobachtet, dass IGF-2 die Entwicklung und Selbsterneuerung von human embryonalen Stammzellen fördert<sup>107</sup>. In neuralen Stammzellen wurde beobachtet, dass bei Hypoxie der Notch-Signalweg die Expression des Transkriptionsfaktors Oct-4 induziert, welcher essenziell für die Erhaltung von Stammzellcharakteristika ist<sup>108</sup>. In Lungenkrebszellen konnte beobachtet werden, dass die IGF-abhängige Signaltransduktion diese Notch-

Signalgebung induziert und dadurch das Überleben der Tumorzellen in Hypoxie erhöht<sup>109</sup>. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Erhaltung von Stammzeleigenschaften unter hypoxischen Bedingungen von der umgebenden Stammzellnische und vom IGF-Signalweg beeinflusst wird. Zudem erhöht IGF-1 die Proliferation von kultivierten Tumorstammzellen aus Kolorektal-, Leber- und Schilddrüsenkarzinomen<sup>110-112</sup>. Wie oben bereits erwähnt hat p53 eine inhibitorische Wirkung auf den IGF-1R. Andererseits induziert der IGF-Signalweg die Phosphorylierung und Inaktivierung von p53, was zur Folge hat, dass die Suppression der für Stammzellen wichtigen Transkriptionsfaktoren Oct-4 und Nanog aufgehoben wird<sup>113</sup>.

Der IGF-Signalweg reguliert Prozesse, welche Radio- und Chemoresistenzen erhöhen können und kann dadurch die Prognose von Tumorpatienten ebenfalls beeinträchtigen. In Brustkrebszellen wurde der zytostatische Effekt von Chemotherapeutika durch die IGF-1-abhängige Erhöhung des MAPK-Signalwegs aufgehoben<sup>114</sup>. In dieser Studie konnte ebenfalls beobachtet werden, dass apoptotische Prozesse durch die Aktivierung des PI3K-Signalwegs reduziert wurden. Weitere Untersuchungen in Brustkrebszellen lassen einen Zusammenhang zwischen IGF-1 und Radioresistenzen vermuten. Bestrahlte MCF-7-Zellen überexprimierten IGF-1, welches durch autokrine Signalgebung die Expression des sezernierten Proteins Clusterin aktivierte und deswegen die strahlenabhängige Apoptose hemmte<sup>115</sup>. Durch die Zugabe des inhibitorischen IGFBP-3 wurde bekräftigt, dass die erhöhte Expression von Clusterin und die verringerte Apoptose IGF-abhängig waren. In einer anderen Studie wurde beobachtet, dass Prostatakrebszellen *in vitro* durch Inhibition des IGF-1R gegenüber Bestrahlung sensitiviert wurden<sup>116</sup>. Es wurde eine Assoziation des IGF-Signalwegs mit Proteinen aufgezeigt, welche Doppelstrangbrüche in der DNA reparieren.

#### 1.2.2. Bedeutung des IGF-Signalwegs in Hirntumoren

Die Isolation von IGF-1 mRNA aus postnatalen Rattenhirnen<sup>117</sup> und die Entdeckung der Kolo-kalisation mit IGF-1R mRNA<sup>118</sup> führte früh zu der Annahme, dass auto- und parakrine IGF-Signalgebung für die Entwicklung des Gehirns benötigt wird<sup>119</sup>. Immunfärbungen ergaben, dass während der Embryogenese und postnatalen Entwicklung von Ratten IGF-1 von Neuronen im Mittelhirn, Hippocampus und der Großhirnrinde exprimiert wird<sup>120</sup>. In adulten Tieren verringert sich die Anzahl an immunreaktiven Zellen jedoch im Vergleich zu jungen postnatalen Ratten. IGF-2 mRNA hingegen wird von der frühen Embryogenese bis in adulte Stadien gleichmäßig hoch exprimiert und zwar nicht in neuronalen Geweben, sondern vor allem im Plexus choroideus, in dem der Liquor produziert wird, in den Meningen und in der Adventitia von Blutgefäßen<sup>121</sup>. Die Expression des IGF-1R ist weit verbreitet in Rattenhirnen und findet vor allem in Neuronen und Astrozyten statt<sup>122</sup>. Nach

Abschluss der Embryogenese reduziert sich das breite Expressionsmuster, bleibt aber in den Meningen und der vaskulären Adventitia von adulten Ratten weiterhin bestehen. Eine große Anzahl an *in vitro* Analysen zeigte, dass IGF-1 ein pleiotroper Faktor ist, welcher die Proliferation und Differenzierung von Astrozyten, Oligodendrozyten, Neuronen und adulten neuralen Stammzellen fördert sowie den Auswuchs von Neuriten anregt<sup>119,123-126</sup>. Aufgrund der Bedeutung des IGF-Signalwegs für die Entwicklung des zentralen Nervensystems wurde vermutet, dass eine Störung dessen zu Malignität führen könnte. So führten Expressionsanalysen zu der Beobachtung, dass Komponenten des IGF-Signalwegs in Tumoren des ZNS überexprimiert sind, u.a. in niedriggradigen Gliomen, Glioblastomen, Ependymomen und Meningiomen<sup>127,128</sup>. Im Vergleich zu Normalhirnproben war in Glioblastomgewebeproben die mRNA von IGF-1R und den Liganden überexprimiert<sup>129,130</sup>. Immunhistochemische Vergleichsanalysen von niedriggradigen Gliomen und Glioblastomen demonstrierten eine positive Korrelation zwischen der Expression von IGF-1, IGF-1R und dem WHO-Grad<sup>131</sup>. In dieser Untersuchung wurde ebenfalls beobachtet, dass die IGF-1 Expression mit dem Proliferationsindex korrelierte und dass in perivaskulären Bereichen die IGF-1 Immunreaktivität am Intensivsten war. Bei Untersuchungen der IGF-2 mRNA an foetalen Hirnen und Gliomen lag das Ausmaß der Überexpression zwischen einer 5- bis 50-fachen Erhöhung in 4 von 4 Gliomen<sup>130</sup>. Diesen Expressionsanalysen stehen aber auch widersprüchliche Studien glialer Tumore gegenüber, in denen keine Expression der IGF-1R-Liganden nachgewiesen werden konnte<sup>132,133</sup>. In kultivierten humanen Gliomzelllinien scheinen die Expressionsmuster eindeutiger zu sein. Expressionsanalysen verschiedener weit verbreiteter Gliomzelllinien (u.a. U87, U251, U373, T98G, A172) auf mRNA-Ebene ergaben, dass alle Zelllinien den IGF-1R exprimieren, wohingegen keine Zelllinie einen der IGF-1R-Liganden exprimiert<sup>134,135</sup>. Für die Gliomzelllinie U87 wurde in der ersten Studie der niedrigste Wert an IGF-1R Transkript beobachtet<sup>134</sup>. Trotz der vorhandenen IGF-1 Rezeptoren reagierten nicht alle Zelllinien auf eine IGF-1 Stimulation mit einer Steigerung der Proliferationsrate. Bei einigen Gliomlinien gab es keine Veränderung, bei anderen sanken die Werte bei erhöhter IGF-1 Konzentration sogar. Merrill und Edwards beobachteten in ihrer Studie, dass IGF-1 in 9 von 10 Gliomzelllinien das Zellwachstum konzentrationsabhängig steigerte<sup>129</sup>. IGF-1 hatte in weiteren Studien auch eine stimulatorische Wirkung auf die Migration und Invasion sowie einen anti-apoptotischen Effekt auf Gliomzelllinien<sup>136-138</sup>. Nach der Entdeckung von Gliomzellen mit Stammzeleigenschaften<sup>139-142</sup> wurden auch diese auf eine tumorfördernde Wirkung des IGF-Signalwegs hin untersucht. Lehtinen et al. beobachteten, dass die IGF-2 Konzentration im Liquor von Glioblastompatienten im Vergleich mit gesunden Probanden erhöht war und dass innerhalb der Glioblastompatienten diejenigen mit schlechtem Krankheitsverlauf höhere Konzentrationen hatten als

Patienten mit einem stabilem Verlauf<sup>143</sup>. Liquor förderte das Wachstum und die Erhaltung von neuronalen Stammzellen *in vitro*. Wenn allerdings IGF-2 mittels spezifischen Antikörpern aus der Flüssigkeit neutralisiert wurde, konnte kein Effekt mehr auf neurale Stammzellen beobachtet werden. Eine andere Publikation unterstützt diese Thesen und zeigte, dass IGF-2 die Selbsterneuerung von murinen neuronalen Stammzellen förderte<sup>144</sup>. Eine hohe Konzentration an IGF-2 mRNA wurde in der subventrikulären Zone von Mäusen beobachtet, welche die Nische für neurale Stammzellen darstellt. In Selbsterneuerungs- und Differenzierungsanalysen zeigte IGF-2 eine größere stammzellfördernde Wirkung als IGF-1. Des Weiteren erhöhte IGF-2 die Expression von Stammzellmarkern, was die Autoren zu der Schlussfolgerung führte, dass IGF-2 die Selbsterneuerung und den Stammzellstatus von neuronalen Stammzellen reguliert. Osuka et al. untersuchten den Einfluss von Strahlentherapie auf murine stammzellähnliche Gliomzellen<sup>145</sup>. Sie beobachteten nach fraktionierter Bestrahlung eine Erhöhung der IGF-1 Sekretion und eine Hochregulierung des IGF-1R. Diese adaptive Änderung des IGF-Signalwegs verlangsamte die Proliferation und erhöhte die Selbsterneuerung von Gliomstammzellen, welche radioresistente Tumore bildeten. *In vivo* konnte das Wachstum dieser radioresistenten Tumore durch Blockierung des IGF-Signalwegs verringert werden. Zusammenfassend zeigen diese Expressionsanalysen und experimentellen Ergebnisse, dass der IGF-1R an der Entstehung und dem Wachstum von Hirntumoren beteiligt ist und eine Inhibition des Rezeptors für die Behandlung von Gliomen sinnvoll wäre.

### 1.2.3. Inhibierung des IGF-Signalwegs

Eine Vielzahl von Inhibitoren des IGF-Signalwegs wurde und wird in präklinischen sowie klinischen Studien auf ihre antitumorale Wirkung untersucht. Dabei kamen niedermolekulare Therapeutika und monoklonale Antikörper zum Einsatz. Das niedermolekulare Therapeutikum Picropodophyllin (PPP) zum Beispiel wird in einer laufenden Phase I/II Studie zur Behandlung von malignen Astrozytomrezidiven verwendet (NCT01721577). PPP wird in einer oralen Suspension verabreicht und inhibiert die Phosphorylierung und Signaltransduktion des IGF-1R. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen wurde gezeigt, dass PPP eine antitumorale Wirkung in Gliomen besitzt<sup>146</sup>. Ein Nachteil von niedermolekularen Wirkstoffen wie PPP ist ihre geringere Spezifität. Bei der Verwendung von klinisch relevanten Dosen wird nicht nur die Signaltransduktion des IGF-1R blockiert, sondern auch die des IR, in manchen Fällen sogar noch von anderen Rezeptoren<sup>147</sup>. Eine höhere Spezifität erzielen monoklonale Antikörper, die gegen den IGF-1R oder die IGF-1R-Liganden gerichtet sind. Zurzeit ist MEDI-573 der einzige gegen die IGF-1R-Liganden gerichtete Antikörper, dessen Wirkung in einer Phase I/II Studie zur Blockierung von IGF-1 und -2 im metastasierenden Mammakarzinom untersucht wird

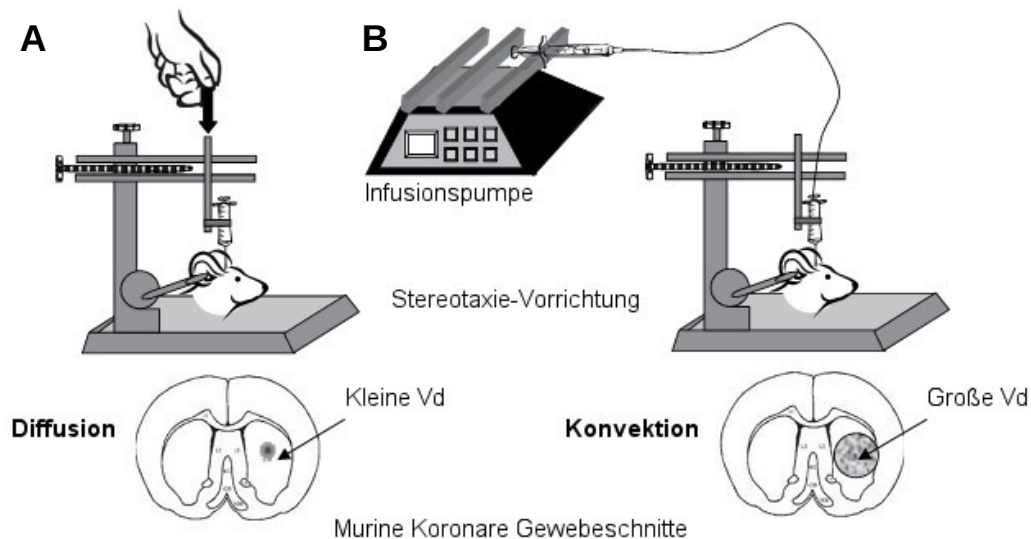
(NCT01446159). Bei subkutanen Ewing's Sarkom- und Rhabdomyosarkom-Xenografts bewirkte eine duale Behandlung mit MEDI-573 und einer Blockierung des IGF-1R (CP01-B02) eine Reduktion des Tumorwachstums<sup>148</sup>. Dabei wurde beobachtet, dass diese Inhibierung die Blutgefäßdichte *in vivo* sowie die Gefäßbildung von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) *in vitro* verringerte.

Dem einzigen gegen die IGF-1R-Liganden gerichteten Antikörper stehen in klinischen Studien 8 monoklonale Antikörper gegenüber, die den IGF-1R sowie die Hybridrezeptoren inhibieren. AMG-479 (Ganitumab, Amgen) führte bei einem Ewing's Sarkom zu einer kompletten Tumorreduktion<sup>149</sup>, erfüllte jedoch bei anderen Phase II Studien, wie z.B. bei pankreatischen neuroendokrinen Tumoren, nicht die Erwartungen der Forscher<sup>150</sup>. Eine Phase III Studie von AMG-479 in Kombination mit Chemotherapie beim metastatischem Adenokarzinom des Pankreas wurde aufgrund mangelnder Wirkung abgebrochen<sup>151</sup>. Auch der Antikörper CP-751,871 (Figitumumab, Pfizer) führte zu einer kompletten Tumorreduktion<sup>152</sup>. In einer Phase II Studie zeigte der Antikörper in Kombination mit Chemotherapie beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ebenfalls vielversprechende Ergebnisse, die im Nachhinein jedoch als überinterpretiert zurückgezogen wurden<sup>153,154</sup>. Daraufhin wurde auch die nachfolgende Phase III Studie abgebrochen (NCT00673049). Nachdem ebenfalls eine Phase III Studie aufgrund fehlender Verbesserung der allgemeinen Überlebenszeit beim kleinzelligen Lungenkarzinom abgebrochen wurde, wurden seitdem keine weiteren klinischen Studien mit diesem Antikörper durchgeführt<sup>155</sup>. Der Antikörper IMC-A12 (Cixutumumab, ImClone Systems), der in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ist ein vollständig humanisierter IgG1 Antikörper, welcher in bisher 41 klinischen Studien untersucht wurde (clinicaltrials.gov). Durch die hohe Affinität zu dem IGF-1R und den Hybridrezeptoren konnten beide zentralen Signaltransduktionswege *in vitro* effektiv blockiert werden<sup>156</sup>. Des Weiteren führte die Bindung des Antikörpers zur Internalisierung und intrazellulären Degradierung des Rezeptors. *In vivo* beobachteten Burtrum et al., dass das Wachstum verschiedener Tumorzellen, welche subkutan appliziert wurden, durch Behandlung mit IMC-A12 signifikant reduziert wurde. In klinischen Studien wurden mittlere Halbwertszeiten von über 8 Tagen beobachtet<sup>157</sup>. Trotz dieser Eigenschaften wurde wie bei den oben erwähnten Antikörpern gegen den IGF-1R in verschiedenen Phase II Studien keine Verbesserung der progressionsfreien und/oder der allgemeinen Überlebenszeit beobachtet (NCT00617708, NCT00684983, NCT00986674, NCT01142388). Bei metastatischen, rezidivierenden Weichgewebesarkomen konnte in einer Phase II Studie eine antitumorale Wirkung von IMC-A12 beobachtet werden<sup>158</sup>. Aussagekräftige Phase III Studien sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgewertet. Zur Behandlung von Gliomen wurden spezifische Antikörper gegen den IGF-1R in klinischen Studien bis dato nicht verwendet. Dies mag daran liegen, dass

die Blut-Hirn-Schranke, die bei Glioblastomen zwar stark beeinträchtigt aber teilweise noch funktionsfähig ist, für monoklonale Antikörper aufgrund ihres hohen Molekulargewichts nur gering permeabel ist. Für die Behandlung von Gliomen ist es daher von Vorteil Methoden zu entwickeln, um diese natürliche Barriere zu umgehen.

### 1.3. Konvektionstherapie

Zwei große Probleme in der medikamentösen Behandlung von Hirntumoren stellen die Umgehung der Blut-Hirn-Schranke und die langsame Diffusion der Wirkstoffe im Gehirn dar. Die meisten Chemotherapeutika und niedermolekularen Wirkstoffe können systemisch verabreicht werden, wohingegen Moleküle mit hohen Molekulargewichten wie Antikörper nur zu geringem Teil die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Eine Methode, diese zu umgehen, ist die Konvektionstherapie, bei der das Therapeutikum über eine implantierte Pumpe mittels Katheter intraparenchymal in das betroffene Gewebe appliziert wird<sup>159</sup>. Die konstante langsame Infusion des Wirkstoffes erzeugt einen positiven Druck, der die Diffusionsrate und die Verteilung des Therapeutikums im Gehirn stark erhöht (Abb. 4). Mit dieser Technik können größere Areale des Gehirns mit hoch konzentrierten Wirkstoffen behandelt werden als bei einer systemischen Therapie, die auf Diffusion beruht<sup>160</sup>.



**Abbildung 4** Schematischer Vergleich der stereotaktischen Injektion in murinen Gehirnen mittels herkömmlicher Diffusion (A) und mittels Konvektion (B). Durch Konvektion erhöht sich die Volumendistribution (Vd) des Infusats im Vergleich zur Diffusion. Modifiziert nach Allard et al. (2009)<sup>160</sup>.

Bisher wurde die Wirksamkeit der Methode vor allem in Tierexperimenten nachgewiesen, aber erste Studien in Menschen demonstrieren das Potenzial dieser Technik<sup>161</sup>. Dennoch müssen viele Parameter weiter optimiert werden, wie z.B. die Platzierung des Katheters und die Fließgeschwindigkeit, um Probleme wie Rückfluss der Flüssigkeit zu verhindern.

Weitere Studien und Fortschritte in der Konvektionstherapie und anderer alternativer Verabreichungsformen sind dadurch von großer Bedeutung für die Effektivität moderner Antikörper und anderer Wirkstoffe in der Behandlung von Glioblastomen.

#### 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Inhibition des IGF-1R durch den spezifischen monoklonalen Antikörper IMC-A12 in verschiedenen Glioblastommodellen zu untersuchen, um dessen präklinische Wirkung für die Behandlung von Glioblastomen zu evaluieren. IMC-A12 ist ein vollständig humanisierter Antikörper mit hoher Affinität für homo- und heterodimere IGF-1R, dessen blockierende Wirkung auf die Bindung von IGF-1 und -2 sowie auf die Internalisierung und Degradierung des Rezeptors mehrfach nachgewiesen wurde. Durch die Applikation des Antikörpers IMC-A12 wurde das Tumorwachstum in zwei verschiedenen Glioblastom-Xenograftmodellen in Mäusen signifikant inhibiert. Den Mäusen wurden adhärent wachsende humane U87-Glioblastomzellen oder neurosphärisch wachsende humane GS-12-Glioblastomzellen in das Gehirn injiziert und nach der Etablierung des Tumors wurde mit der IMC-A12-Behandlung begonnen. GS-Linien werden als stammzellähnliche Glioblastomzellen bezeichnet, da sie Markerproteine von neuronalen Stammzellen wie z.B. CD133 und Nestin exprimieren, sowie die Fähigkeit zur multilinealen Differenzierung in Neurone und Gliazellen besitzen<sup>162</sup>. Bei den U87-Tumoren, welche hoch proliferativ und non-invasiv wachsen, verringerte sich die Anzahl der Blutgefäße im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltumoren signifikant. Im Gegensatz dazu wachsen Tumore, die aus neurosphärisch wachsenden GS-Zelllinien gebildet werden, stark invasiv und diffus. GS-12-Tumoren eignen sich insofern besser als U87-Tumore, um die invasive Komponente von humanen Glioblastomen zu untersuchen. Die Blockierung des IGF-1R verringerte in diesem Modell die Proliferation der GS-12-Zellen und erhöhte die Anzahl an apoptotischen Zellen. Diese unterschiedlichen Mechanismen der Tumorreduktion ließen vermuten, dass die Blockierung des IGF-1R sowohl Auswirkungen auf das Wachstum von GS-Zellen als auch auf die mikrovaskuläre Zellen der Blutgefäße hatte. Dazu wurde zunächst der Expressionsstatus des IGF-1R in den beiden oben verwendeten Glioblastomzellen und in Endothelzellen anhand von immunhistologischen Schnitten *in situ* sowie anhand von RNA- und Proteinanalysen *in vitro* analysiert. Zudem sollte die klinische Relevanz des IGF-1R festgestellt werden, indem der immunhistologische Expressionsstatus des Rezeptors in einem Gliom-Gewebemikroarray mit den dazugehörigen Überlebensdaten verglichen wurde. Nach einer detaillierten *in vitro* und *in vivo* Expressionsanalyse wurden funktionelle Untersuchungen durchgeführt, um den Effekt einer Stimulation mit IGF-1 und -2 sowie einer Blockierung des IGF-1R mittels IMC-A12 auf Proliferation, Migration und



Apoptose von kultivierten Glioblastomzellen und Endothelzellen zu ermitteln. Diese funktionellen Zelleigenschaften wurden intrazellulär durch die Analyse der zentralen Signaltransduktionsproteine mechanistisch ergänzt, um zu untersuchen, ob die verschiedenen Mechanismen der Tumorzellreduktion auf die Aktivität unterschiedlicher Signaltransduktionswege zurückzuführen sind. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von primären stammzellähnlichen Glioblastomzellen aus frisch resezierten Tumoren sowie deren Kultivierung in definiertem Medium unter Einfluss von IGF-1 oder -2. Damit sollte die Abhängigkeit von humanen Primärzellen auf die IGF-1R-Liganden untersucht werden und gegebenenfalls Rückschlüsse auf das Tumorigenitätspotenzial des IGF-Signalwegs geführt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Tabelle 2 Geräte

| Gerät                                   | Hersteller                                            |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 7500 Fast Real-Time PCR System          | Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| -80°C Kühltruhe                         | Kryotec GmbH, Hamburg                                 |
| Agfa Curix 60 Entwicklungsmaschine      | Agfa HealthCare Corporation, Greenville, SC, USA      |
| Alzet Osmotische Minipumpe 2004         | Durect Corporation, Cupertino, CA, USA                |
| BD FACSCanto II Durchflusszytometer     | BD Biosciences, San Jose, CA, USA                     |
| Design Reiskocher Pro 42518             | Gastroback GmbH, Hollenstedt                          |
| Durchflusszytometer PAS                 | Partec GmbH, Münster                                  |
| FlexCycler Thermal Cycler               | Analytik Jena AG, Jena                                |
| Mikroskop „AxioSkop“ mit AxioCam „MRc5“ | Carl Zeiss AG, Oberkochen                             |
| Mikroskop „DM IL“                       | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar                      |
| Mikrotom „SM 2000R“                     | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar                      |
| Nanodrop 2000 Spectrophotometer         | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen                  |
| pH Meter „CG820“                        | Schott-Geräte GmbH, Ludwigshafen                      |
| Power Pac 200                           | BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA                |
| Präzisionswaage „440-33“                | Kern Sohn GmbH, Balingen                              |
| 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                   |
| SpectraFluor PLUS Microplate Reader     | Tecan Group Ltd., Männedorf, CH                       |
| Thermomixer compact                     | Eppendorf AG, Hamburg                                 |
| Tisch-Kühlzentrifuge „Biofuge Fresco“   | Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund                   |
| Tisch-Zentrifuge 5415C                  | Eppendorf AG, Hamburg                                 |
| Vortex                                  | Heidolph GmbH, Schwabach                              |
| Wasserbad                               | Köttermann GmbH, Uetze                                |
| Zellkulturbrutschrank HeraCell          | Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund                   |
| Zentrifuge „Megafuge 1.0R“              | Heraeus GmbH, Bad Grund                               |

#### 2.1.2. Zellkulturmedien & Zusätze

Tabelle 3 Zellkulturmedien

| Medium                                                                        | Hersteller                               |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| B27 Supplement (50x) minus Vitamin A                                          | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| B27 Supplement (50x) minus Insulin                                            | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1x) high Glucose, GlutaMAX, Pyruvate | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| DPBS (1x) minus Calcium, minus Magnesium                                      | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)                                          | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Neurobasal-A Medium (1x)                                                      | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Medium 199 (1x) with Earle's Salts, Glutamine                                 | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt |

## 2.1.3. Chemikalien

**Tabelle 4** Chemikalien

| <b>Chemikalie</b>                                            | <b>Hersteller</b>                                                    | <b>Artikelnummer</b> |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Aceton                                                       | Merck KGaA, Darmstadt                                                | 1.00013              |
| Alfazyme                                                     | PAA Laboratories GmbH, Pasching, A                                   | L11-012              |
| Antibody Diluent Reagent Solution                            | Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt                        | 003218               |
| Bench Mark Protein Ladder                                    | Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt                        | 10748-010            |
| Bromphenolblau                                               | Sigma-Aldrich, Steinheim                                             | B7021                |
| BSA, Fraction V, >99 %                                       | Sigma-Aldrich, Steinheim                                             | A-3059               |
| BSA, Fraction V                                              | PAA Laboratories / GE Healthcare Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, F | K41-001-100          |
| Cell Dissociation Solution, Non-enzymatic                    | Sigma-Aldrich, Steinheim                                             | C5914                |
| Chloroform                                                   | Merck KGaA, Darmstadt                                                | 102445               |
| Citronensäure-Monohydrat                                     | Fluka Chemie AG, Buchs, CH                                           | 27490                |
| Citifluor Antifadent Mountant Solution AF1                   | Agar Scientific, Stansted, GB                                        | R1320                |
| Collagenase/Dispase                                          | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim                                     | 11 097 113 001       |
| Collagen Solution                                            | StemCell Technologies, Grenoble, F                                   | 04902                |
| 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             |
| CyStain DNA 1 Step                                           | Partec GmbH, Münster                                                 | 05-5004              |
| Dako Pen                                                     | Agilent Technologies, Glostrup, DK                                   | S200230-2            |
| 4',6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI)         | Sigma-Aldrich, Steinheim                                             | D9542                |
| Diff Quik Stain Set                                          | Medion Diagnostics AG, Düringen, CH                                  | 130832               |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                      | MP Biomedicals                                                       | 196055               |
| Dithiothreitol (DTT)                                         | Sigma-Aldrich, Steinheim                                             | D-9779               |
| dNTP Set (100mM)                                             | Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt                        | 10297-018            |
| Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)                    | Sigma-Aldrich, Steinheim                                             | E2759                |
| Recombinant Human Epithelial Growth Factor (EGF)             | Peprotech, 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              |
| Etoposid                                                     | Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt                               | 341205               |
| Eukitt Eindeckmedium                                         | O. Kindler GmbH, Freiburg                                            |                      |
| Fötale Kälberserum (FCS)                                     | PAA Laboratories GmbH, Pasching, A                                   | A15-151              |
| Fibroblast Growth Factor (FGF)-basic, recombinant            | Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA                                       | 100-18B              |
| Fungizone Amphotericin B                                     | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt                             | 15290-026            |
| Formalin Lösung (10 %)                                       | Sigma-Aldrich, Steinheim                                             | HT501320             |
| 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               |
| Hämalaun, Mayer's Hemalum Solution                           | Merck KGaA, Darmstadt                                                | 109249               |
| Heparin                                                      | Rotexmedica GmbH, Trittau                                            | 20283                |

|                                                            |                                                       |            |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------|
| HEPES                                                      | Sigma-Aldrich, Steinheim                              | H-3375     |
| Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), recombinant          | Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA                        | 100-11     |
| Insulin-like Growth Factor-2 (IGF-2), recombinant          | Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA                        | 100-12     |
| Isopropanol                                                | Sigma-Aldrich, Steinheim                              | 24137-52-R |
| Kristallviolett                                            | Merck KGaA, Darmstadt                                 | 115940     |
| Laminin (Natural Mouse Protein)                            | Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt         | 23017-015  |
| Magermilchpulver                                           | Spinnrad GmbH, Bad Segeberg                           | 2231018    |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                                   | Sigma-Aldrich, Steinheim                              | M3148      |
| Methanol                                                   | Sigma-Aldrich, Steinheim                              | 65548      |
| 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                                            | Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany               |            |
| Paraformaldehyd                                            | Sigma-Aldrich, Steinheim                              | P6148      |
| PBS Tabletten                                              | ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA               | 2810307    |
| Penicillin/Streptomycin                                    | Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt              | 15140-122  |
| Restore Western Blot Stripping Buffer                      | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA                  | 21059      |
| RNase Out, Ribonuclease Inhibitor                          | Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt         | 10777-019  |
| Roti Block                                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                    | A151.1     |
| Salzsäure, 1mol/L (HCl)                                    | Merck KGaA, Darmstadt                                 | 1.09057    |
| SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate           | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA                  | 34080      |
| SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate          | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA                  | 34096      |
| SuperScript II Reverse Transcriptase                       | Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt         | 18064-014  |
| 2x TaqMan Fast Universal PCR Master Mix                    | Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt | 4352042    |
| Tris-Acetat-EDTA-Puffer (10x)                              | Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt         | 15558-026  |
| 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) (30 %) | Merck KGaA, Darmstadt                                 | 107209     |
| Xylol                                                      | Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen                    | 326.2500   |
| Ziegsenserum                                               | DakoDeutschland GmbH                                  | X0907      |

## 2.1.4. Antikörper und Isotypkontrollen

**Tabelle 5** Primärantikörper

| Primärantikörper                 | Spezies   | Konzentration       | Versuch        | Hersteller         | Artikelnummer |
|----------------------------------|-----------|---------------------|----------------|--------------------|---------------|
| Akt (pan)                        | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 4691          |
| phospho-Akt                      | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 4060          |
| Cleaved Caspase-3                | Kaninchen | unbekannt,<br>1:200 | IHC-P          | Cell Signaling     | 9661          |
| CD34                             | Ratte     | 8 µg/ml             | IHC-P          | Abcam              | ab8158        |
| IGF-1                            | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Abcam              | ab9572        |
| IGF-1 (H-70)                     | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Santa Cruz         | sc-9013       |
| IGF-1 clone Sm1.2                | Maus      | 0,2 µg/ml           | WB             | Merck<br>Millipore | 05-172        |
| IGF-1Rβ                          | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 3018          |
| IGF-1Rβ                          | Kaninchen | 4 µg/ml             | IHC-P          | Santa Cruz         | sc-713        |
| IGF-1R (IMC-A12)                 | Mensch    | siehe Methode       | FACS,<br>Block | ImClone<br>Systems |               |
| phospho-IGF-1Rβ                  | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 3918          |
| IGF-2                            | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Abcam              | ab9574        |
| IgG Kontrolle                    | Kaninchen | 4 µg/ml             | IHC-P          | Dako               | X0936         |
| IgG Kontrolle                    | Mensch    | 7 µg/ml             | FACS           | R&D Systems        | 1-001-A       |
| IgG1 Kontrolle                   | Maus      | 1,6 µg/ml           | IHC-P          | R&D Systems        | MAB002        |
| IgG2a Kontrolle                  | Ratte     | 8 µg/ml             | IHC-P          | BD<br>Pharmingen   | 553926        |
| Ki-67                            | Maus      | 1,6 µg/ml           | IHC-P          | Dako               | M7240         |
| MEK1                             | Maus      | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 2352          |
| phospho-MEK1/2                   | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 9154          |
| p44/42 MAPK<br>(Erk 1/2)         | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 9102          |
| phospho-p44/42<br>MAPK (Erk 1/2) | Maus      | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 9106          |
| PI3-Kinase p85                   | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 4257          |
| phospho-PI3-<br>Kinase p85       | Kaninchen | 0,2 µg/ml           | WB             | Cell Signaling     | 4228          |
| Tubulin                          | Maus      | 0,2 µg/ml           | WB             | Calbiochem         | CP06          |

**Tabelle 6** Sekundärantikörper

| Sekundär-<br>antikörper      | Gekoppelte<br>Substanz | Spezies | Verdünnung /<br>Konzentration | Versuch | Hersteller                                | Artikel-<br>nummer |
|------------------------------|------------------------|---------|-------------------------------|---------|-------------------------------------------|--------------------|
| α-Mensch<br>IgG              | FITC                   | Ziege   | 7 µg/ml                       | FACS    | Jackson<br>Immunoresearch                 | 109-095-<br>098    |
| Histofine<br>α-<br>Kaninchen | HRP                    | Ziege   | unverdünnt                    | IHC-P   | Nichirei<br>Biosciences Inc.<br>Tokyo, JP | 41414              |
| Histofine<br>α-Maus          | HRP                    | Ziege   | unverdünnt                    | IHC-P   | Nichirei<br>Biosciences Inc.<br>Tokyo, JP | 41413              |
| Histofine<br>α-Ratte         | HRP                    | Ziege   | unverdünnt                    | IHC-P   | Nichirei<br>Biosciences Inc.<br>Tokyo, JP | 41431              |
| α-<br>Kaninchen<br>IgG       | HRP                    | Schaf   | 1:80000                       | WB      | Sigma                                     | A0545              |
| α-Maus IgG                   | HRP                    | Schaf   | 1:20000                       | WB      | Sigma                                     | A9309              |

## 2.1.5. Kits

**Tabelle 7 Kits**

| Kit                                                  | Hersteller                                    |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay       | Promega Corporation, Madison, WI, USA         |
| FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I             | BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA        |
| NucleoSpin RNA                                       | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren           |
| SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR | Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt |

## 2.1.6. Puffer und Lösungen

**Tabelle 8 Puffer und Lösungen**

|                                                                     |                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Citratpuffer (10 mM, pH 6,0)                                        | Stammlösung A:<br>0,1 M Citronensäure-Monohydrat in aqua dest<br>Stammlösung B<br>0,1 M Natriumcitrat auf in aqua dest<br>Citratpuffer:<br>27 ml Stammlösung A + 123 ml Stammlösung B<br>+ 1350 ml aqua dest |
| Coomassie-Lösung                                                    | 25 % Isopropanol<br>10 % Eisessig<br>0,05 % (w/v) Coomassie<br>In aqua dest                                                                                                                                  |
| Entfärber-Lösung                                                    | 25 % Isopropanol<br>10 % Eisessig<br>In aqua dest                                                                                                                                                            |
| Eosin-Stammlösung (1 %)                                             | 1 L Ethanol (96 %)<br>10 g Eosin G                                                                                                                                                                           |
| Ethanol-HCl <sub>(aq)</sub><br>(Differenzierungslösung H&E-Färbung) | 21,6 ml HCl <sub>(aq)</sub> (25 %)<br>964 ml Ethanol (96 %)                                                                                                                                                  |
| Laemmli-Puffer (10x)                                                | 0,1 M Tris/HCl <sub>(aq)</sub> , pH 7,4<br>50 % (v/v) β-Mercaptoethanol<br>25 % (w/v) SDS<br>0,1 % (w/v) Bromphenolblau                                                                                      |
| Laufpuffer                                                          | 1,87 M Glycin<br>0,25 M Tris-HCl <sub>(aq)</sub><br>1 % (w/v) SDS                                                                                                                                            |
| Protein-Lysepuffer                                                  | 2 mM Orthovanadat<br>1 % Triton<br>1 Tablette CompleteProtease-Inhibitor auf 50 ml PBS                                                                                                                       |
| TBST                                                                | 0,15 M NaCl<br>10 mM Tris-HCl <sub>(aq)</sub><br>0,05 % Tween 20                                                                                                                                             |
| Transferpuffer                                                      | 1,92 M Glycin<br>0,5 M Tris-HCl <sub>(aq)</sub>                                                                                                                                                              |
| Tris-Triton-Puffer (TTP)                                            | 0,145 M NaCl<br>0,05 M Tris<br>0,1 % Triton<br>pH 7,6                                                                                                                                                        |

## 2.1.7. Verbrauchsmaterial

**Tabelle 9** Verbrauchsmaterial

| <b>Name</b>                                                          | <b>Hersteller</b>                                         |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Nunc Microwell 96-well Optical Bottom Platte für Proliferationsassay | Thermo Fischer Scientific, Rochester, NY, USA             |
| 96-well Multiply Fast PCR-Platte für qPCR                            | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht                              |
| Alzet Brain Infusion Kit 2                                           | Durect Corporation, Cupertino, CA, USA                    |
| 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 Porengröße 8 µm                         | Neuro Probe, Gaithersburg, Maryland, USA                  |
| Filtrationsröhrchen „Vivaspin 6“ 3000 Dalton                         | Sartorius AG, Göttingen                                   |
| Glasgeräte (Bechergläser, Kolben etc.)                               | Schott-Duran, Mainz                                       |
| 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 60 x 15 mm                                             | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht                              |
| Kulturplatten 100 x 20 mm „Cellstar“                                 | Greiner Bio One, Frickenhausen                            |
| Kryoröhrchen „Cryo Pure“ (1,6 ml)                                    | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht                              |
| Mikrotiterspritze zur Injektion (30 Gauge, 250 µl)                   | Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH                          |
| Mini-PROTEAN TGX Gels (4-15 %)                                       | Bio-Rad, Hercules, CA, USA                                |
| Neubauer Zählkammer                                                  | Rudolf Brand GmbH & Co., Wertheim                         |
| Objektträger SuperFrost                                              | Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig   |
| Pipettenspitzen (10 / 200 / 1000 µl)                                 | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht                              |
| Pipettten 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 Spritzenvorsatzfilter                                        | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                                 |
| Stericup & Steritop Vacuum-driven Filtration Systems                 | EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA             |
| Whatman Gel Blot Paper GB003                                         | GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SE                |
| Zellkulturflaschen „Cellstar“ (T-25, T-75, T-150)                    | Greiner Bio One, Frickenhausen                            |
| Zellkulturplatten „Cellstar“ (12-well) Primärzellen                  | Greiner Bio One, Frickenhausen                            |
| Zellschaber 16cm                                                     | Greiner Bio One, Frickenhausen                            |

## 2.2. Methoden

## 2.2.1. Tierversuche

Die folgenden Tierexperimente wurden von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt und nach den gesetzlichen Vorgaben und Richtlinien durchgeführt.

#### 2.2.1.1. Xenotransplantation von Tumorzellen und Explantation der Maushirne

Die im Folgenden beschriebene Xenotransplantation von Tumorzellen wurde von Dr. Tobias Martens aus der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Zur Erzeugung von orthotopen Glioblastomzelltumoren wurden  $3 \times 10^5$  U87-Zellen in serumfreiem DMEM gewaschen und intrazerebral in 24 immunkompromittierte Naval Medical Research Institute/Foxn1nu Nacktmäuse injiziert, die zwischen 6 und 8 Wochen alt waren. Zuvor wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) narkotisiert, die Kopfhaut desinfiziert und der Kopf in einem stereotaktischen Operationsrahmen fixiert. Durch einen sagittalen Mittellinienschnitt durch die Kopfhaut wurde der Schädelknochen im Bereich des Bregmas freigesetzt. Wenige Millimeter rechts lateral der Sagittalnaht und anterior des Bregmas wurde ein Loch in den Schädel gebohrt. In dieses Loch wurde eine Hamilton Spritze, die an der Stereotaxie-Vorrichtung befestigt war, intrazerebral ca. 2-3 mm tief in den Bereich des Striatum eingeführt. Die Zellsuspension ( $3 \times 10^5$  in 4  $\mu$ l sterilem PBS) wurde langsam über einen Zeitraum von ca. 5 Minuten injiziert, um ein Wiederaustrreten der Zellen aus dem Gewebe zu vermeiden. Anschließend wurde die Kopfhaut mit Gewebekleber verschlossen und die Maus zur Schmerzlinderung mit Carprofen (Rimadyl) 6 mg/kg subcutan sowie über 3 Tage mit 25 mg Novalgin in 20 ml Trinkwasser versorgt. Nach 7 Tagen wurden die Mäuse erneut narkotisiert und es wurde eine osmotische Minipumpe (Alzet Brain Infusion Kit II) subcutan auf dem Rücken platziert. Diese wurde mit einem Katheter verbunden, der in einer Kanüle endete, die mit ihrer Spitze in dem zuvor etablierten Tumor gelegen war. Das Pumpenreservoir war entweder mit sterilem PBS (Kontrollgruppe) oder mit 10 mg/ml IMC-A12 Antikörper in PBS befüllt. Diese Flüssigkeiten wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,25  $\mu$ l pro Stunde zugeführt (n = 12 Mäuse pro Gruppe). Die Behandlung wurde unter regelmäßiger Überwachung des Bewegungsverhaltens und des Gewichts fortgesetzt bis die Mäuse nach 3 Wochen mittels finaler CO<sub>2</sub>-Narkose getötet wurden. Um unnötiges Leiden der Tiere zu vermeiden, wurden verhaltensauffällige Mäuse und Mäuse mit hohem Gewichtsverlust (über 10 %) bereits vor Ablauf der 3 Wochen getötet. Nach Feststellung des Todes wurde der Schädel geöffnet und das Hirn in 4 % Formalin bei RT über Nacht fixiert. Am Folgetag wurden die Maushirne für spätere (immun-)histologische Versuche im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf automatisiert in Paraffinblöcke gegossen.

Die Transplantation der GS-12-Glioblastomzellen erfolgte wie oben beschrieben, jedoch wurden  $1,5 \times 10^5$  GS-12-Zellen pro Maus injiziert (n = 12 pro Gruppe). In diesem Tumormodell wurde nach 8 Wochen mit der Behandlung mittels osmotischer Minipumpen begonnen, um den langsamer wachsenden GS-12-Zellen mehr Zeit für die Etablierung



von Tumoren zu geben. Die Behandlungsdauer wurde im Vergleich zu U87-Tumoren auf 4 Wochen erhöht, bevor die Mäuse getötet wurden.

#### 2.2.1.2. Bestimmung der Tumorgroße bei U87-induzierten Tumoren

Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Maushirne wurden wie in 2.2.1.4 beschrieben geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Diese Schnitte wurden anschließend am AxioSkop (Zeiss) mikroskopiert und fotografiert, um eine digitale Bildanalyse durchführen zu können. Für jedes Maushirn wurde der Hirnschnitt mit der größten Tumorfläche (Höhe x Breite) verwendet, um mit der folgenden Formel das Volumen zu errechnen:  $\text{Tumolvolumen [mm}^3\text{]} = (\sqrt{\text{maximale Tumorfläche [mm}^2\text{]}})^3$

#### 2.2.1.3. Bestimmung der Tumorlast bei GS-12-induzierten Tumoren

GS-12-induzierte Tumore wachsen im Gegensatz zu U87-Tumoren invasiv und infiltrieren häufig beide Hirnhemisphären diffus, daher kann das Volumen nicht mit der oben genannten Formel für scharf begrenzte und knotenförmig wachsende Tumore berechnet werden. Für die Bestimmung der Tumorlast wurde eine durch Martens et al. in diesem Labor etablierte Methode verwendet<sup>163</sup>, welche jeweils 6 für Tumordinfiltration repräsentative Regionen auf 6 koronaren Ebenen analysiert. Die Ebenen erstrecken sich von rostral nach dorsal vom anterioren Corpus Callosum bis zum Hippocampus. Als repräsentative Regionen wurden z.B. zentrales und laterales Corpus Callosum, zentrales und laterales Striatum, Thalamus, sowie periventrikuläre, subventrikuläre und basale Regionen definiert (Abb. 6, siehe 3.1.2). Für diese Methode wurden besagte Regionen in H&E-gefärbten Schnitten mit einem 40x Objektiv fotografiert und mit dem ImageJ Bildbearbeitungsprogramm bearbeitet. Die .tif-Dateien wurden in schwarz-weiß Bilder konvertiert, anschließend invertiert, damit Zellkerne weiß abgebildet wurden, und die Gesamtfläche der Zellkerne innerhalb eines repräsentativen rechteckigen Feldes (0,036 mm<sup>2</sup>) quantifiziert. Ebenso wurden die Zellkerne von 3 gesunden unbehandelten Mäusehirnen quantifiziert und gemittelt, um diese Normalhirnwerte von den tumorbelasteten Hirnen zu subtrahieren, damit nur die effektive Tumorbelastung zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe verglichen wurde. Alle morphometrischen Analysen wurden geblindet durchgeführt.

#### 2.2.1.4. Histologische Untersuchungen (Hämatoxylin und Eosin Färbung)

Gewebeschnitte werden mit Hämatoxylin-Eosin (H&E-Färbung) gefärbt, um die Tumorlokalisation und -morphologie zu bestimmen. Diese Färbung beruht auf dem Prinzip, dass basisches Hämatoxylin an saure Zellorganellen bindet, vor allem Zellkerne, zum Farbstoff Hämatein oxidiert wird und diese durch Anhebung des pH-Wertes bei

Wasserzugabe blau färbt, wohingegen saures Eosin vor allem basische Zellplasma-proteine und Kollagenfasern rot färbt.

Mit einem Mikrotom (Leica) wurden 5 µm dicke Schnitte von fixierten paraffinierten Mäusehirnen angefertigt, auf Objektträger platziert und bei 37°C über Nacht getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Schnitte zunächst zweimal 10 min in Xylol entparaffiniert und für jeweils 2 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %) und 5 min in aqua dest rehydriert. Anschließend wurden sie 10 min in Hämalaun eingelegt und 5 min unter fließendem Leitungswasser blau gefärbt. Nach einer kurzen Differenzierung in Ethanol-HCl-Lösung (siehe 2.1.6) von 2 Sekunden wurden die Schnitte nochmals 5 min unter fließendem Wasser gebläut. Die Gewebeschnitte wurden 7 min in der 1 %-igen Eosinstammlösung (siehe 2.1.6) inkubiert und anschließend jeweils 1 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90 %, 96 %, 100 %) und für 10 min in Xylol dehydriert, bevor sie mit Eukitt Eindeckmedium beschichtet, eingedeckelt und mikroskopisch ausgewertet wurden.

#### 2.2.1.5. Immunhistologische Analyse

Bei immunhistochemischen Untersuchungen von in paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten (IHC-P) können Expressionsmuster und Lokalisationen von Proteinen nachgewiesen werden. Wie unter 2.2.1.4 beschrieben wurden auch in dieser Methode Schnitte von fixierten in Paraffin eingebetteten Mäusehirnen angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Des Weiteren wurden auch Gewebemikroarrays verwendet, die in Abschnitt 2.2.1.6 näher beschrieben sind. Diese Schnitte wurden zweimal für 10 min in Xylol entparaffiniert, für 2 min in purem Ethanol vom restlichen Xylol befreit und für 30 min in eine Lösung aus 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Ethanol inkubiert, um endogene Peroxidasen im Gewebe zu blockieren. Anschließend folgte die Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %) für jeweils 2 min pro Station und einer fünfminütigen Inkubation in aqua dest. Daraufhin wurden die Schnitte in einem Reiskocher für 1 Stunde in kochendem Citratpuffer (siehe 2.1.6) demaskiert, 15 min im ausgeschalteten Reiskocher abgekühlt und für 5 min in aqua dest gewaschen. Vor der Inkubation mit Primärantikörper wurden die Schnitte 5 min in TTP (siehe 2.1.6) äquilibriert. Die Primärantikörper und entsprechenden Isotypkontrollen (siehe 2.1.4) wurden in Blockierlösung (1 Teil Ziegenserum, 9 Teile TTP, 10 Teile Antibody Diluent Reagent) verdünnt und über Nacht bei 4°C in Feuchtkammern inkubiert. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper dreimal 5 min in TTP abgewaschen und daraufhin mit den entsprechenden HRP-konjugierten Histofine-Sekundärantikörpern 1 Stunde bei RT inkubiert und wiederum dreimal 5 min in TTP gewaschen. Die Schnitte wurden mit NovaRed-Lösung inkubiert, welches als Substrat für

die Peroxidase am Sekundärantikörper fungiert und in einen braunen Farbstoff umgesetzt wird. Nach dieser bis zu zehnminütigen Färbung werden die Schnitte 5 min in Leitungswasser gewaschen, die Zellkerne 30 Sekunden mit Hämalaun gefärbt, 10 min in Leitungswasser gebläut und anschließend jeweils 1 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90 %, 96 %, 100 %) und für 10 min in Xylol dehydriert bevor sie mit Eukitt Eindeckmedium beschichtet, eingedeckelt und mikroskopisch ausgewertet wurden.

#### 2.2.1.6. Gewebemikroarray

Ein Gewebearray ermöglicht die kostengünstige und zeitsparende Analyse von bis zu 1000 Gewebeproben auf einem Objektträger. Der in dieser Arbeit verwendete Gewebemikroarray beinhaltet ca. 400 Gliomproben aus Paraffinblöcken aus dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, die nach den WHO-Kriterien klassifiziert wurden. Für die Herstellung wurden zunächst für jede Tumorprobe repräsentative Strukturen anhand H&E-gefärbter Schnitte mikroskopisch identifiziert und auf den in Paraffin eingebetteten Ursprungsproben markiert. Diesen wurden dann an den markierten Positionen zylindrische Biopsien entnommen und in vorgestanzte Löcher eines Empfängerblocks übertragen. Dabei wurden die Positionen jeder Probe protokolliert, um eine Identifikation auf dem Array zu ermöglichen. Der fertige Empfängerblock wurde daraufhin mit einem Mikrotom in je 5 µm-dicke Schnitte geschnitten. Die immunhistologische Bestimmung der IGF-1R Expression des Gewebearrays erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben. Für die Auswertung wurden die Gliomproben in zwei Gruppen eingeteilt, mit starker oder schwacher IGF-1R Expression, und mit den dazugehörigen Überlebensdaten der Patienten verglichen.

#### 2.2.2. *In vitro* Versuche

##### 2.2.2.1. Zellkultur

Alle adhärent wachsenden Tumorzellen und sphärisch wachsenden GS-Zelllinien wurden in T25, T75 und T150 Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in Medium, das 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Fungizone enthielt, kultiviert. Die adhärent wachsenden Glioblastomzelllinien U87, T98G, U251, G44 und G55T2 wurden, wenn nicht anders beschrieben, in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. MCF-7-Brustkarzinom- und HepG2-Leberkarzinomzellen wurden ebenfalls in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Adhärente Zellen wurden subkonfluent kultiviert und im Verhältnis 1:10 gesplittet. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit Trypsin von der Kulturflasche gelöst. Sobald alle Zellen sich abgelöst hatten, wurde das Trypsin mittels serumhaltigen Mediums inaktiviert, die Zellen wurden zentrifugiert und in frischem Medium ausgesät.

Die sphärisch wachsenden Glioblastomzelllinien GS-8, GS-11, GS-12 und GS-13 wurden in Vorarbeiten im Labor für Hirntumorbiologie der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf aus frisch resezierten Glioblastomen isoliert und unter serumfreien Bedingungen in Neurobasal-A Medium kultiviert, das mit 2 % B27-Supplement, 1 % GlutaMAX, 20 ng/ml rekombinantem humanem EGF, 20 ng/ml rekombinantem humanem FGF und 32 IE/ml Heparin angereichert wurde. Zweimal pro Woche wurden die Zellen mit frischem Medium und Wachstumsfaktoren versorgt und bei einer Sphärengröße von 200-500 µm mechanisch dissoziiert. GS-Zellen wurden maximal bis zur 25. Passage kultiviert, um sicherzustellen, dass die Stammzellcharakteristika nicht durch eine dauerhafte *in vitro* Kultivierung verloren gingen. Zellen, bei denen bereits in früheren Passagen morphologische Veränderungen zu beobachten waren, wurden für weitere Untersuchungen nicht verwendet.

Cerebral Microvascular Endothelial Cells (CMEC), die zuvor aus Angiomen im Gehirn isoliert und umgehend eingefroren wurden, wurden in Medium 199 (Gibco) mit 20 % FCS, 2 IE/ml Heparin und 25 µg/ml ECGS kultiviert. Alle Zellkulturflaschen und -platten für CMECs wurden mind. 3 Stunden vor der Zellaussaat mit Collagen beschichtet (300 µg/ml in PBS).

#### 2.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden subkonfluente Zellen trypsinisiert bzw. im Falle von Neurosphären bei 1300 rpm herunterzentrifugiert und  $1 \times 10^6$  Zellen in 1,6 ml Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) in Kryo-Röhrchen aliquotiert. In einem isolierten Kryobehälter wurden die Zellen langsam im -80°C-Kühlschrank über Nacht eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die Röhrchen in Stickstofftanks bei -196°C aufbewahrt. Gefrorene Zellaliquots wurden so schnell wie möglich im Wasserbad aufgetaut, mit vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und bei 1300 rpm zentrifugiert. Danach wurde die komplette Flüssigkeit abgesaugt, um das DMSO und FCS zu entfernen, und die Zellen wurden in ihrem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert und ausgesät.

#### 2.2.2.3. RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen

$0,5 \times 10^6$  adhärent wachsende Zellen wurden in 5 ml DMEM mit 10 % FCS in 6 cm-Schalen ausgesät, wohingegen GS-Zellen in 5 ml Neurobasal-A Medium mit B27 Supplement in T25 Zellen ausgesät wurden. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die GS-Zellen pelletiert, das Medium abgesaugt und mit 350 µl RNA-Lysepuffer des Nucleospin RNA Kits laut Herstellerangaben lysiert. Adhärent wachsende Zellen wurden mit RNA-Lysepuffer von der Schale geschabt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte ebenfalls laut Protokoll des Nucleospin RNA Kits.

#### 2.2.2.4. Konzentrationsbestimmung von RNA

RNA-Konzentrationen wurden photometrisch mittels Nanodrop 2000 bestimmt. Dabei wird die Absorption für Nukleinsäuren bei 260 nm gemessen sowie bei 230 und 280 nm, um den Reinheitsgrad der RNA-Extraktion zu ermitteln. Verunreinigende Bestandteile wie Kohlenhydrate und Phenol absorbieren bei 230 nm, wohingegen Proteine eine starke Absorption bei 280 nm aufweisen. Die Quotienten aus 260/280 nm und 260/230 nm geben Auskunft, ob eine Kontamination mit z.B. Proteinen besteht. Für das Verhältnis von 260 zu 280 gilt bei RNA ein Richtwert von 2, wohingegen der 260/230-Quotient etwas höher bei 2 - 2,2 liegen darf. Die Reinheit aller RNA-Proben, die verwendet wurden, entsprach den oben genannten Richtwerten.

#### 2.2.2.5. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Synthetisierung von cDNA aus isolierter RNA wurde das SuperScript First-Strand Synthesis System unter Verwendung von oligo-dT Primern benutzt. Für einen Ansatz von 100 µl wurden 5 µg RNA, 2,5 µg oligo-dT Primer und 500 µM dNTPs in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit DNase/RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 60 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde dann für 5 min bei 65°C im Thermocycler inkubiert und danach wurden auf Eis 20 µl 5x Reaktionspuffer, 10 µl DTT (100 mM), 5 µl RNaseOUT (40 U/µl) und 5 µl SuperScript II Reverse Transkriptase hinzugefügt. Für die reverse Transkription wurden die Proben für 54 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 15-minütige Hitze-Inaktivierung bei 70°C abgebrochen und die cDNA bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 2.2.2.6. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die quantitative Real-Time-PCR ermöglicht die Vervielfältigung von Nukleinsäuren sowie ihre Quantifizierung mittels fluoreszierender Sonden. Die Methode beruht auf dem Prinzip der gewöhnlichen PCR-Zyklen, bei denen das doppelsträngige DNA-Template zunächst denaturiert und nach Hybridisierung der Primer an die einzelsträngigen Nukleinsäureketten durch die DNA-Polymerase elongiert wird. Die hier verwendeten TaqMan-Sonden besitzen an einem Ende des Primers einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Donor) und am andern Ende einen sogenannten Quencher (Akzeptor). Solange sich Donor und Akzeptor auf dem Primer in räumlicher Nähe befinden, nimmt der Akzeptor die Energie des Donors auf, was unter dem Begriff Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) bekannt ist. Bei der Elongation der Nukleinsäurekette wird durch die 5'-3'-Exonukleasefunktion der Polymerase, der Donor von der Sonde abgespalten. In Folge dessen nimmt das Fluoreszenzsignal des abgespaltenen Donors zu, sodass am Ende

jedes Elongationszyklus eine Steigerung des Reportersignals und proportional dazu die Menge des PCR-Produkts gemessen werden kann.

In dieser Arbeit wurde das 7500 Real-Time PCR System mit FAM-markierten TaqMan-Sonden der Firma Applied Biosystems verwendet. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass diese Exon-Exon-überspannend sind, um Hintergrundsignale genomischer DNA zu reduzieren. Für die Auswertung der Amplifizierung wurde der Ct-Wert verwendet, welcher den Schwellenwert angibt, an dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Um verschiedene Gruppen miteinander vergleichen zu können (relative Quantifizierung) muss zunächst der Ct-Wert des zu untersuchenden Gen-Transkripts vom Ct-Wert einer internen Kontrolle, in diesem Falle das ribosomale Haushaltsgen RPL13A, abgezogen werden, um den  $\Delta\text{Ct}$ -Wert zu erhalten. Anschließend wird die Differenz der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Gruppen, z.B. behandelt und unbehandelt, gebildet, um den  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert zu errechnen. Zuletzt wird die unterschiedliche Expression als x-fache Expression durch die Formel  $x=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  angegeben. Für alle Ansätze, die als Triplikate durchgeführt wurden, wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Für jeden Ansatz wurden pro Well der 96-well Multiply Fast PCR Platte 1  $\mu\text{l}$  cDNA-Template, 1  $\mu\text{l}$  TaqMan-Sonde, 8  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser und 10  $\mu\text{l}$  2x TaqMan Fast Universal PCR Master Mix pipettiert. Es wurden die Standardbedingungen der Firma Applied Biosystems verwendet, welche 40 Zyklen mit folgenden Einstellungen beinhalten:

**Tabelle 10** qPCR Zyklen

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

Die folgende Tabelle listet alle verwendeten TaqMan-Primer der Firma Applied Biosystems.

**Tabelle 11** TaqMan-Primer

| Humanes Gen | Applied Biosystems ID |
|-------------|-----------------------|
| IGF-1       | Hs01547656_m1         |
| IGF-1R      | Hs99999020_m1         |
| INS-IGF-2   | Hs01005963_m1         |
| RPL-13a     | Hs01578312_m1         |

#### 2.2.2.7. Gewinnung von konditioniertem Medium und Proteinen aus Zelllysaten

Nach der Trypsinierung der adhärennten Zellen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen dreimal in PBS gewaschen und anschließend in 5 ml DMEM ohne FCS in 10 cm-Schalen ausgesät. GS-12-Zellen wurden zentrifugiert, mechanisch dissoziiert und ebenfalls dreimal in PBS gewaschen, bevor  $1 \times 10^6$  Zellen in 5 ml Neurobasal-A Medium ohne B27-Supplement in T25-Flaschen ausgesät wurden. Nach 24 Stunden wurde der Überstand zentrifugiert um eine Kontamination des konditionierten Mediums mit Zellen zu vermeiden. Danach wurde der zellfreie Überstand in Filtrationsröhrchen mit einer Porengröße von 3 kDa bei 4°C von 5 ml auf ca. 100 µl konzentriert. Für die Isolierung von Proteinen aus Zelllysaten wurden die Zellen mit 200 µl Protein-Lysepuffer (siehe 2.1.6) von der Schale abgeschabt und 30 min in Lysepuffer auf Eis schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 4°C 30 min bei 13.000 x g zentrifugiert, um unerwünschte Zelltrümmer zu entfernen.

#### 2.2.2.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im Laemmliverfahren wurden die Zelllysate im Protein-Lysepuffer und die konditionierten Medienkonzentrate mit 10x Laemmli-puffer (siehe 2.1.6) vermischt (1x Endkonzentration) und 5 min bei 96°C aufgeköcht. Das enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol bricht Disulfidbrücken auf, wohingegen SDS nichtkovalente Bindungen zerstört und die Proteine auf eine einheitliche negative Ladung bringt. Für die Auftrennung wurden kommerzielle Gradientengele (Bio-Rad) und der Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad) mit einem Größenspektrum von 10 – 250 kDa verwendet. Pro Geltasche wurden bis zu 20 µl der Probe aufgetragen und bei 120 V in Laufpuffer (siehe 2.1.6) aufgetrennt bis die blaue Markerlaufront das Ende des Gels erreicht hatte.

#### 2.2.2.9. Western Blot

Während der Elektrophorese wurde pro Gel eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran kurz in Methanol aktiviert und in Transferpuffer (siehe 2.1.6) auf einem Schüttler äquilibriert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel ebenfalls kurz in Transferpuffer gewaschen und für den Proteintransfer zwischen zwei Glasfasermatten und vier in Puffer getränkte Whatmanfilter geklemmt und in eiskaltem Transferpuffer bei 100 V für 30 min geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran mindestens für 1 Stunde mit 1x Roti Block in TBST (siehe 2.1.6) oder 5 % Magermilchpulver in TBST zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen geblockt, bevor sie mit einem entsprechenden Primärantikörper (siehe 2.1.4) mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml in TBST verdünnt über Nacht bei 4°C oder mindestens für 2 Stunden bei RT schüttelnd inkubiert wurde. Um zu kontrollieren, dass gleichmäßige Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde bei

Zelllysaten immer auch ein Antikörper gegen das Haushaltsprotein Tubulin verwendet. Ungebundene Primärantikörper wurden durch dreimalige Inkubation in TBST für jeweils 10 min schüttelnd bei Raumtemperatur (RT) abgewaschen. Danach wurde der entsprechende Sekundärantikörper (siehe 2.1.4) in TBST mit 5 % Magermilchpulver verdünnt und die Membran darin 1 Stunde bei RT schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmal dreimal für 10 min in TBST und einmal kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Entwicklung wurde die Membran mit Chemilumineszenzreagenz (SuperSignal West Pico oder Femto) für 5 min inkubiert und zur Detektion in einer Dunkelkammer mit Röntgenfilmen bei unterschiedlichen Expositionszeiten in der Entwicklungsmaschine entwickelt.

Um gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen wurde die Membran 5 min in TBST gewaschen und 15 min mit dem Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) bei RT inkubiert und anschließend nochmal 5 min mit TBST gewaschen. Nach dem Strippen wurde die Membran zunächst wieder für mind. 1 Stunde geblockt bevor sie mit neuen Primärantikörpern inkubiert wurde.

Nach der letzten Antikörperdetektion wurde als zusätzliche Kontrolle der Gelbeladung die Membran mind. 15 min in Coomassie-Lösung inkubiert und anschließend in Entfärber-Lösung gewaschen, bis die unspezifische Färbung verschwunden war und nur noch blau gefärbte Proteinbanden zu sehen waren.

Für eine densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten wurden die gescannten Röntgenfilme mit dem ImageJ Bildbearbeitungsprogramm bearbeitet. Dafür wurden die Bilddateien in schwarz-weiß konvertiert und invertiert, sodass Proteinbanden weiß und der Hintergrund schwarz abgebildet wurden. Um die Bandenintensität der unterschiedlichen Zelllinien vergleichen zu können, wurden für ein Protein immer Banden mit der gleichen Expositionszeit verwendet. Das zu untersuchende Protein wurde daraufhin mit der dazugehörigen Tubulinbande normalisiert.

#### 2.2.2.10. Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Diskriminierung von Zellpopulationen anhand ihrer physikalischen Eigenschaften wie Zellgröße, -morphologie und -granularität, sowie ihrer biochemischen Merkmale, z.B. die Expressionsmuster von Oberflächen- und intrazellulären Proteinen. Die Zellen werden dabei einzeln, fokussiert in einer Messkammer durch verschiedene Laserstrahlen geleitet. Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC), die bei der Laserbestrahlung entstehen, korrelieren mit der Größe der Zelle und der Granularität, also der Anzahl der Vesikel innerhalb der Zelle. Für Expressionsuntersuchungen können fluorochromgekoppelte Moleküle wie z.B. Antikörper verwendet werden, die durch Anregung mit



Laserstrahlen bestimmter Wellenlänge Fluoreszenzlicht emittieren, welches im Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt und verstärkt wird. Die Auswertung der verschiedenen Signale kann in einer Einparameterdarstellung als Histogramm oder in einer Zweiparameterdarstellung als Punkthistogramm erfolgen. Einparameterhistogramme werden bei der Bestimmung von relativen Expressionsmustern mit einem Fluorophor benutzt (siehe 2.2.2.10.1). Punkthistogramme kommen in Systemen mit zwei Fluorophoren vor wie z.B. bei Untersuchungen des programmierten Zelltodes mit Rot- und Grünfluoreszenz (siehe 2.2.2.10.2).

#### 2.2.2.10.1. Bestimmung der IGF-1R Expression

Für die Quantifizierung des Oberflächenrezeptors IGF-1R wurden pro Probe  $2,5 \times 10^5$  Zellen im Falle von adhärennten Tumorklinien mit Zellschabern von der Kulturschale gelöst und im Falle von GS-Zellen herunterzentrifugiert und mechanisch dissoziiert. Dies erfolgte in 0,01 % PBS-Azid, welches den intrazellulären Abbau des Proteins verlangsamt. Zusätzlich wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 20 min schüttelnd in 4 % PFA fixiert und in 0,1 % BSA/0,1 % Saponin in PBS 5 min bei 4000 rpm in der auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 0,5 % BSA/0,1 % Saponin in PBS 30 min schüttelnd geblockt und wiederum wie zuvor gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 7 µg/ml Primärantikörper (IMC-A12) in Waschpuffer für 1 Stunde schüttelnd inkubiert. Als Isotypkontrolle wurde humanes IgG in der gleichen Konzentration verwendet. Nach einem erneuten Waschschrift, diesmal mit PBS-Azid und einer Unterschichtung der Zellen mit FCS, erfolgte die einstündige Inkubation mit FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper (1,5 µg/ml) in Waschpuffer und anschließendem Waschschrift in PBS-Azid und FCS. Vor der Analyse am Durchflusszytometer (Partec) wurden die Zellen in CyStain resuspendiert, welches die nukleäre DNA mit DAPI färbt. Alle für die Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper sind im Abschnitt 2.1.4 zu finden.

Neben der Immunreaktivität wurde die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen erfasst, um die Stärke der Expression des Zielproteins von positiven Zellpopulationen mit anderen positiven Proben vergleichen zu können. Dies ermöglicht eine qualitative Aussage über die Proteinexpression pro Zelle. Dafür wurde die gemittelte Intensität der Isotypkontrollen von der Fluoreszenzintensität der IMC-A12-Proben subtrahiert und anschließend der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

#### 2.2.2.10.2. Annexin V Apoptose-Assay

Beim programmierten Zelltod ist eine der ersten Veränderungen der Verlust der Zellmembranintegrität, bei der das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der

Innenseite zur Außenseite der Membran transloziert wird. Annexin V bindet Phospholipide wie PS mit hoher Affinität und durch eine Koppelung an das Fluorophor FITC kann dieser frühe apoptotische Prozess im Durchflusszytometer gemessen werden. Bei der Annexin V-Färbung allein kann man aber nicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden, daher wird zusätzlich eine Propidiumiodid (PI)-Färbung durchgeführt. PI ist ein fluoreszierender DNA-Interkalator, welcher erst in späteren Phasen der Apoptose die Zellmembran passieren kann. Dadurch können Zellen, die gerade mit Apoptose begonnen haben (Annexin V positiv, PI negativ), von Zellen, die bereits in der Endphase der Apoptose sind (Annexin V und PI positiv), und nekrotischen Zellen (Annexin V negativ, PI positiv) unterschieden werden. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen keinen der beiden Farbstoffe auf.

$0,3 \times 10^6$  U87-Zellen wurden in 6 cm-Schalen ausgesät und es wurde gewartet, bis diese sich an die Schale angeheftet haben. GS-12-Zellen wurden dissoziiert und  $1 \times 10^6$  Zellen in T25-Flaschen in NBM low Insulin ausgesät. Für 72 Stunden wurden die Zellen mit IMC-A12 (50 nM, 200 nM) oder Etoposid (25  $\mu$ M) behandelt oder unbehandelt inkubiert. Etoposid, welches die Topoisomerase II und somit die Zellteilung hemmt, fungierte als positive Kontrolle für diesen Apoptose-Assay. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und von der Schale geschabt bzw. die Neurosphären dissoziiert und mit 1x Binding Buffer auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden mit 5  $\mu$ l PI und 0,5  $\mu$ l FITC-Annexin V für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend innerhalb einer Stunde analysiert. Für diesen Versuch wurden die Proben am FACS Canto II in der FACS Sorting Core Unit des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf untersucht.

#### 2.2.2.11. Proliferationsassay

Für die Bestimmung der Proliferation wurde ein kolorimetrischer Assay verwendet, der auf der Messung von ATP beruht. Die Menge an gemessenem ATP ist proportional zur Anzahl der Zellen und kann daher über einen bestimmten Zeitraum Rückschlüsse auf die Proliferationsrate einer Zellpopulation geben. Um den Einfluss von IGF-1 und -2 auf die Zellteilung messen zu können, müssen die Experimente unter serumfreien Bedingungen stattfinden, da im Serum hohe Konzentrationen an IGF-1 und -2 und Insulin vorhanden sind. Dafür müssen U87-Zellen und CMECs nach der Trypsinierung mehrmals in Medium ohne Serum gewaschen werden, bevor sie in optischen 96-well Platten in einer Konzentration von 2000 Zellen pro Well in 100  $\mu$ l Medium mit 2 % FCS ausgesät und über Nacht kultiviert werden können. Am nächsten Tag wurde das Medium mit frischem serumfreien Medium ersetzt, welches verschiedene Konzentrationen IGF-1 oder -2 beinhaltete (1 - 20 nM), und für 4 Tage bis zur Messung kultiviert. Medium mit 10 %

Serum diene als positive Kontrolle. Inhibitionsexperimente mit IMC-A12 (12,5 – 400 nM) wurden für U87-Zellen wie oben beschrieben, jedoch in DMEM mit 10 % FCS über 4 Tage durchgeführt, wohingegen CMECs in der wachstumsstimulierenden IGF-Konzentration von 5 nM über 4 Tage mit IMC-A12 kultiviert wurden.

Für GS-12-Zellen musste die Insulinkonzentration im definierten Neurobasalmedium verringert werden, um ungewünschte Insulin-abhängige Effekte auf die Messung zu verhindern. Dafür wurde ein B27-Supplement verwendet, welches kein Insulin enthält, und anschließend die üblichen Wachstumsfaktoren (EGF, FGF, Heparin) sowie eine physiologische Menge<sup>144</sup> (4,4 nM) an Insulin hinzugefügt. Die GS-12-Zellen wurden für Experimente mit niedriger Insulinkonzentration mindestens über zwei Passagen in diesem Medium kultiviert (nachfolgend „NBM low Insulin“ genannt), damit sich die Zellen an die Kulturbedingungen adaptieren konnten. Die Zellen wurden mechanisch dissoziiert und in einer Konzentration von 2500 Zellen pro Well in 50 µl NBM low Insulin mit verschiedenen IGF-Konzentrationen (1 - 20 nM) ausgesät und insgesamt 8 Tage kultiviert, weil die Zellen langsamer proliferieren als adhärenente Zellen. Am 4. Tag wurde in jedes Well 50 µl frisches Medium mit Wachstumsfaktoren und 4,4 nM Insulin hinzugegeben. Nachdem 5 und 10 nM IGF-1/-2 als wachstumsstimulierende Konzentrationen für GS-Zellen bestimmt wurden, wurden die Zellen für das Inhibitionsexperiment mit IMC-A12 darin ausgesät und steigende Konzentrationen von IMC-A12 (25 - 200 nM) zugesetzt. In diesem Assay wurden die Zellen ebenfalls 8 Tage kultiviert und am 4. Tag frisches Medium mit Inhibitor hinzugefügt. Alle Experimente wurden mit mind. 5 Replikaten pro Bedingung durchgeführt. Der CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt und die Platten am SpectraFluor PLUS Microplate Reader (Tecan) ausgelesen.

#### 2.2.2.12. Migrationsassay

Die Fähigkeit der Zellen sich fortzubewegen kann durch chemotaktische Faktoren stimuliert werden und wird gerichtete Migration bzw. Chemotaxis genannt. Um den Einfluss von IGF-1 und -2 auf die Zellmigration zu analysieren wurden modifizierte Boyden Kammer-Assays durchgeführt. Dabei werden die Zellen in eine Kammer pipettiert, die durch eine poröse Filtermembran mit einer unterliegenden Kammer verbunden ist, welche die chemotaktische Substanz beinhaltet. Wenn die Zellen durch die 8 µm großen Poren migrieren, bleiben sie auf der Unterseite der Membran haften und können anschließend gefärbt und quantifiziert werden. Damit spezifische Effekte gemessen werden können, wurden U87-Zellen in serumfreien DMEM ausgesät, welches neben den üblichen antibakteriellen und antimykotischen Beigaben zusätzlich 0,1 % BSA beinhaltet. GS-12-Zellen wurden langfristig in NBM low Insulin kultiviert und darin ausgesät, jedoch

mit 0,1 % BSA versetzt und ohne die üblichen Wachstumsfaktoren (EGF, FGF, Heparin). Damit sich die Zellen für die Migration in einem optimalen Vitalzustand befinden, wurden GS-12- zwei Tage und U87-Zellen ein Tag vor dem Experiment vereinzelt. Einen Tag vor dem Versuch wurde die poröse Membran (8 µm Porengröße, Neuro Probe) für U87-Versuche mit 105 µg/ml Kollagenlösung (Stemcell Technologies) in 0,1 % Essigsäure in einem 37°C Wärmeschrank und für GS-12-Versuche in 5 µg/ml Laminin (Invitrogen) in PBS in einem Brutschrank über Nacht beschichtet. Am folgenden Tag wurde die Membran mit 100 ml 0,1 % BSA in PBS gewaschen und getrocknet. Am Versuchstag wurden IGF-1 und -2 in verschiedenen Konzentrationen (1 - 20 nM) in dem jeweiligen Assaymedium verdünnt und zu jeweils 30 µl in die Wells der unteren Kammer pipettiert. Als positive Migrationskontrolle wurde Assaymedium mit 10 % FCS verwendet. Die Zellen wurden trypsinisiert oder mechanisch dissoziiert und dreimal mit Assaymedium gewaschen, um restliches Kulturmedium zu entfernen. Daraufhin wurde die Zellzahl auf  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Well in 50 µl Assaymedium eingestellt. Nachdem die Testlösungen in die untere Kammer pipettiert wurden, wurde die getrocknete Filtermembran vorsichtig darauf platziert und mit der oberen Kammer fixiert. Anschließend wurden in die Wells oberhalb der Testsubstanzen mind. 5 Replikate der Zellsuspension eingefüllt und im Falle von U87-Versuchen 6 Stunden bzw. bei GS-12-Versuchen 20 Stunden unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Bei Inhibitionsversuchen wurden die U87- und GS-12-Zellen 48 Stunden vor dem Versuchstag mit verschiedenen Konzentrationen (50 - 200 nM) IMC-A12 präinkubiert. Am Versuchstag wurde frischer Antikörper in den gleichen Konzentrationen auch in die oberen und unteren Wells gegeben, damit sich kein Antikörpergradient bilden konnte, der die Migration negativ beeinflusst. Die Inkubationszeit der Inhibitionsversuche war genauso lang wie bei den Stimulationsversuchen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran von der Kammer getrennt und die Oberseite dieser mit einem Wattestäbchen von aufliegenden Zellen befreit. Nach Anleitung wurde die Membran jeweils drei Minuten in den drei Lösungen des Diff Quik Stain Sets (Medion Diagnostics) gefärbt, anschließend mit aqua dest gespült, die Zellen in 10 Feldern pro Well in 40-facher Vergrößerung ausgezählt und der Mittelwert der Replikate mit Standardabweichung berechnet.

#### 2.2.2.13. Isolierung und Etablierung von primären Glioblastomstammzelllinien

Nach Einwilligung des Patienten wurden frisch resezierte Glioblastome aus der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit steriler Schere und Skalpell zerkleinert und in 1 mg/ml Collagenase/Dispase in HBSS für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde diese Zellsuspension mit einem 100 µm Zellsieb filtriert und der Durchfluss bei 1300 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden nochmals in HBSS

resuspendiert und zentrifugiert bevor sie in NBM und den in 2.2.2.1 genannten Wachstumsfaktoren und Zusätzen in 12-well Platten ausgesät wurden.

### 2.2.3. Auswertung und Statistik

Die Datenaufarbeitung, Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Corporation). Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Zum Vergleich zweier Gruppen, unabhängiger oder abhängiger Stichproben, wurde der t-Test verwendet. Ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. *In vivo* Untersuchungen zur Inhibierung des Tumorwachstums

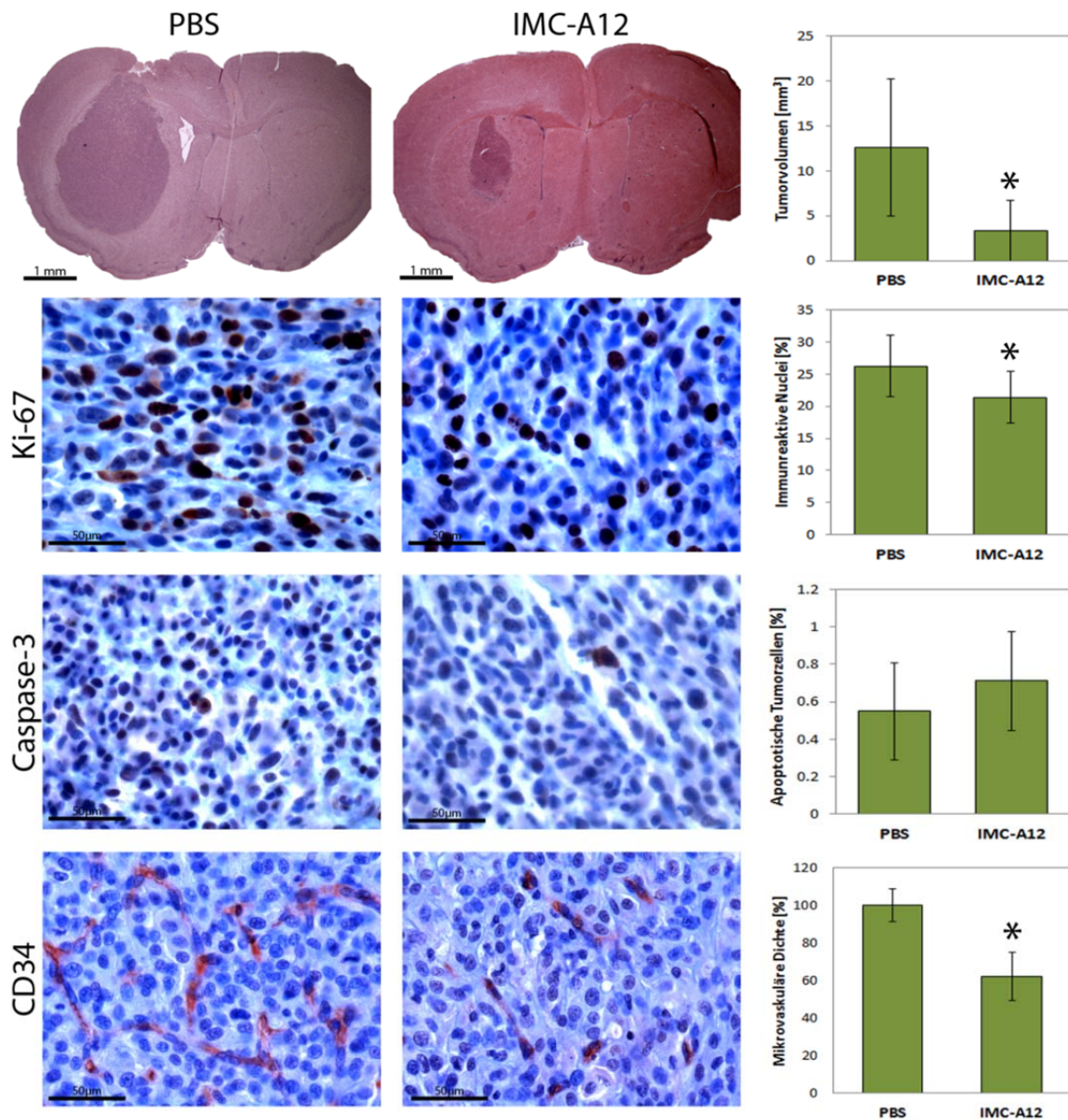
Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper IMC-A12 wurde von ImClone Systems Inc. zur Verfügung gestellt. Mit der Antikörper-vermittelten Blockierung des IGF-1R wurde die Wirkung auf das Wachstum zweier verschiedener Glioblastommodelle in Mäusen untersucht. In die Gehirne von Nacktmäusen (NMRI/Foxn1nu) injiziert, unterscheiden sich diese orthotopen Glioblastome in ihrem Wachstumsmuster voneinander. Die adhärent wachsende und weltweit vielfach verwendete humane Glioblastomzelllinie U87 bildet *in vivo* rasch wachsende, nicht invasive Tumore, die weitgehend scharf vom gesundem Gewebe abgegrenzt sind (Abb. 5). Charakteristisch für solche knotenförmig wachsenden Tumore ist, dass sie stark Angiogenese-abhängig sind, also auf die Blutgefäßneubildung angewiesen sind. Im zweiten orthotopen Tumormodell wurde die im Labor für Hirntumorbiologie etablierte humane Glioblastomzelllinie GS-12 verwendet. Diese zeichnet sich durch ein neurosphärisches Wachstum in Suspension aus, wenn sie in serumfreien Medium in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und FGF kultiviert wird. GS-Linien werden als stammzellähnliche Glioblastomzellen bezeichnet, da sie Markerproteine von neuronalen Stammzellen wie z.B. CD133 und Nestin exprimieren sowie die Fähigkeit zur multilinealen Differenzierung in Neurone und Gliazellen besitzen<sup>162</sup>. Im Gegensatz zu U87-induzierten Xenografttumoren wachsen GS-12-Tumore *in vivo* deutlich langsamer und stark invasiv (Abb. 7). Dabei infiltrieren sie das umliegende Gewebe sowie die gegenüberliegende Hirnhemisphäre durch die Migration entlang des Corpus Callosum. Invasive wachsende GS-12-Tumoren eignen sich besser als U87-Tumore, um die invasive Komponente von humanen Glioblastomen zu untersuchen.

##### 3.1.1. Wirkung von IMC-A12 auf das Wachstum von U87-Tumoren *in vivo*

Nach einer siebentägigen Etablierung der Tumore wurde mit der lokalen, intratumoralen Antikörperbehandlung mittels osmotischer Minipumpen begonnen. Die dreiwöchige Behandlung mit IMC-A12 (2,5 µg/Stunde) führte im Vergleich mit der Vehikelkontrolle (PBS) zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens um 73,7 % ( $3,3 \pm 3,4 \text{ mm}^3$  zu  $12,6 \pm 7,7 \text{ mm}^3$ ,  $p = 0,003$ ). Nach diesen drei Wochen hatten 7 der 11 Tiere in der Kontrollgruppe einen Gewichtsverlust von  $\geq 10 \%$  erlitten, jedoch keine in der Behandlungsgruppe. Von diesen 7 symptomatischen Mäusen hatten 3 zusätzlich motorische Beeinträchtigungen.

Um die Mechanismen für die Verlangsamung des Tumorwachstums zu ergründen, wurden die U87-Tumore in immunhistochemischen Analysen auf ihren Proliferationsindex,

die vaskuläre Dichte und den Anteil apoptotischer Tumorzellen untersucht. Die Quantifizierung proliferierender Tumorzellen erfolgte mittels einer Immunfärbung für das Ki-67 Antigen, welches in der Interphase sich teilender Zellen im Zellkern exprimiert wird, und wurde als prozentualer Anteil proliferierender Zellen bezogen auf die Zellgesamtzahl (Proliferationsindex) angegeben. Unbehandelte Tumore hatten einen Proliferationsindex von  $26,2 \pm 4,8 \%$ , der durch die Behandlung mit IMC-A12 signifikant um 18,6 % auf  $21,4 \pm 4,1 \%$  reduziert wurde ( $p = 0,046$ ; Abb. 5).



**Abbildung 5** Auswirkung der IGF-1R Blockierung auf das Wachstum von orthotopen U87-Tumoren. Die Behandlung mit IMC-A12 ( $2,5 \mu\text{g}/\text{Stunde}$ ) reduzierte das Tumorzellenwachstum signifikant um 73,7 %. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die Proliferation der Tumorzellen und die mikrovaskuläre Dichte signifikant verringert waren. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

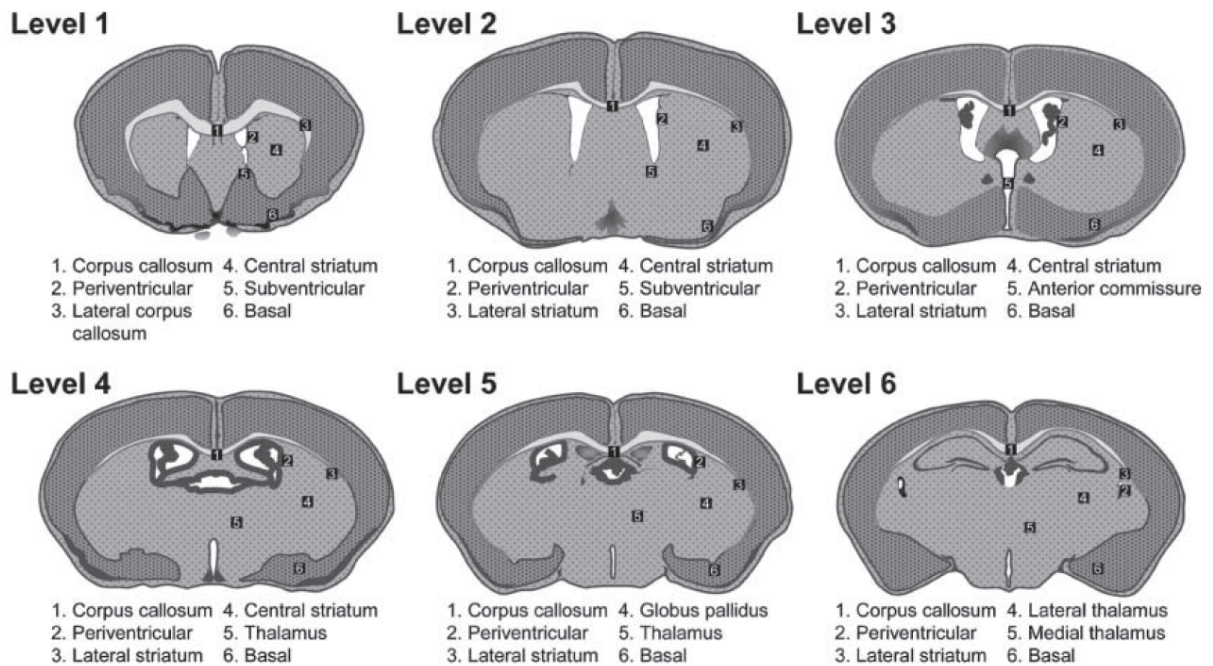
Um eine quantitative Aussage über den Anteil apoptotischer Tumorzellen treffen zu können, wurde das apoptose-spezifische Protein cleaved Caspase-3 immunhistochemisch untersucht. Generell war der Anteil an Tumorzellen mit positivem Signal für Caspase-3 gering und lag bei unter 1 % (Abb. 5). Außerdem führte die Behandlung mit IMC-A12 zu keiner signifikanten Änderung im Vergleich zur Vehikelkontrolle ( $0,6 \pm 0,3$  % zu  $0,7 \pm 0,3$  %;  $p = 0,27$ ). Des Weiteren wurden intratumorale Blutgefäße quantifiziert, weil aus der Literatur bekannt ist, dass auch Endothelzellen IGF-1R exprimieren können und dieser Rezeptor auch an der Angiogenese beteiligt ist<sup>101</sup>. Dafür wurden die Gewebeschnitte auf CD34-Immunreaktivität untersucht. Es wurden Blutgefäße mit positivem Signal in 10 zufällig ausgesuchten Tumorarealen gezählt und mit der Anzahl der Blutgefäße in der Vehikelkontrolle verglichen. Hier zeigte sich bei behandelten Tumoren eine starke, signifikante Reduktion der Blutgefäße um 37,9 % ( $62,1 \pm 12,8$  % zu  $100,0 \pm 8,9$  %;  $p = 0,0001$ ; Abb. 5). Die Ergebnisse der Antikörper-vermittelten IGF-1R Blockierung deuten darauf hin, dass bei diesem Tumormodell, welches vom Wachstums-muster her repräsentativ ist für die solide Komponente von humanen Glioblastomen, die Inhibierung des Wachstums vor allem durch Reduktion der Blutgefäße bewirkt wird.

### 3.1.2. Wirkung von IMC-A12 auf das Wachstum von GS-12-Tumoren *in vivo*

Bei den orthotopen GS-12-Tumoren wurden wegen der langsameren Etablierung der Tumore im Vergleich zu den U87-Tumoren erst nach 8 Wochen osmotische Minipumpen mit IMC-A12 oder Vehikelkontrolle implantiert und die Behandlung ( $2,5 \mu\text{g}/\text{Stunde}$ ) dann über 4 Wochen durchgeführt. Nach diesen 4 Wochen hatten 4 von 12 Mäusen der Kontrollgruppe einen Gewichtsverlust entwickelt, jedoch keine in der Behandlungsgruppe. Wegen der hohen Invasivität dieser Tumore konnte das Tumolvolumen nicht berechnet werden, stattdessen wurde der Tumorzellanteil in 6 verschiedenen Regionen auf 6 unterschiedlichen koronaren Ebenen von rostral nach dorsal mittels einer Pixelanalyse der Zellnuklei quantifiziert (Abb. 6)<sup>163</sup>. Dabei wurde die Gesamtfläche der Zellkerne von murinen Normalhirnproben von der Zellkernfläche tumorbelasteter Hirne subtrahiert, um die effektive Tumorbelastung im experimentellen Modell festzustellen.

Diese Analyse zeigte eine signifikante Verringerung des Tumorzellanteils in allen individuellen Regionen (Tabelle 12) sowie bei kumulativer Analyse aller 36 Regionen um 50,2 % in der IMC-A12-Behandlungsgruppe ( $270,1 \pm 57,4$  % zu  $441,7 \pm 66,5$  %;  $p < 0,0001$ ; Abb. 7). Eine vergleichende Analyse der einzelnen Regionen zeigte, dass vor allem die Regionen, welche weit entfernt von der Injektionsstelle lagen (Level 6, Regionen 5 und 6; -73,5 % und -70,5 %; Tabelle 12), eine stärkere Inhibierung der Tumorlast aufwiesen als Regionen proximal zur Injektionsstelle (Level 2, Region 4; -39,5 %).





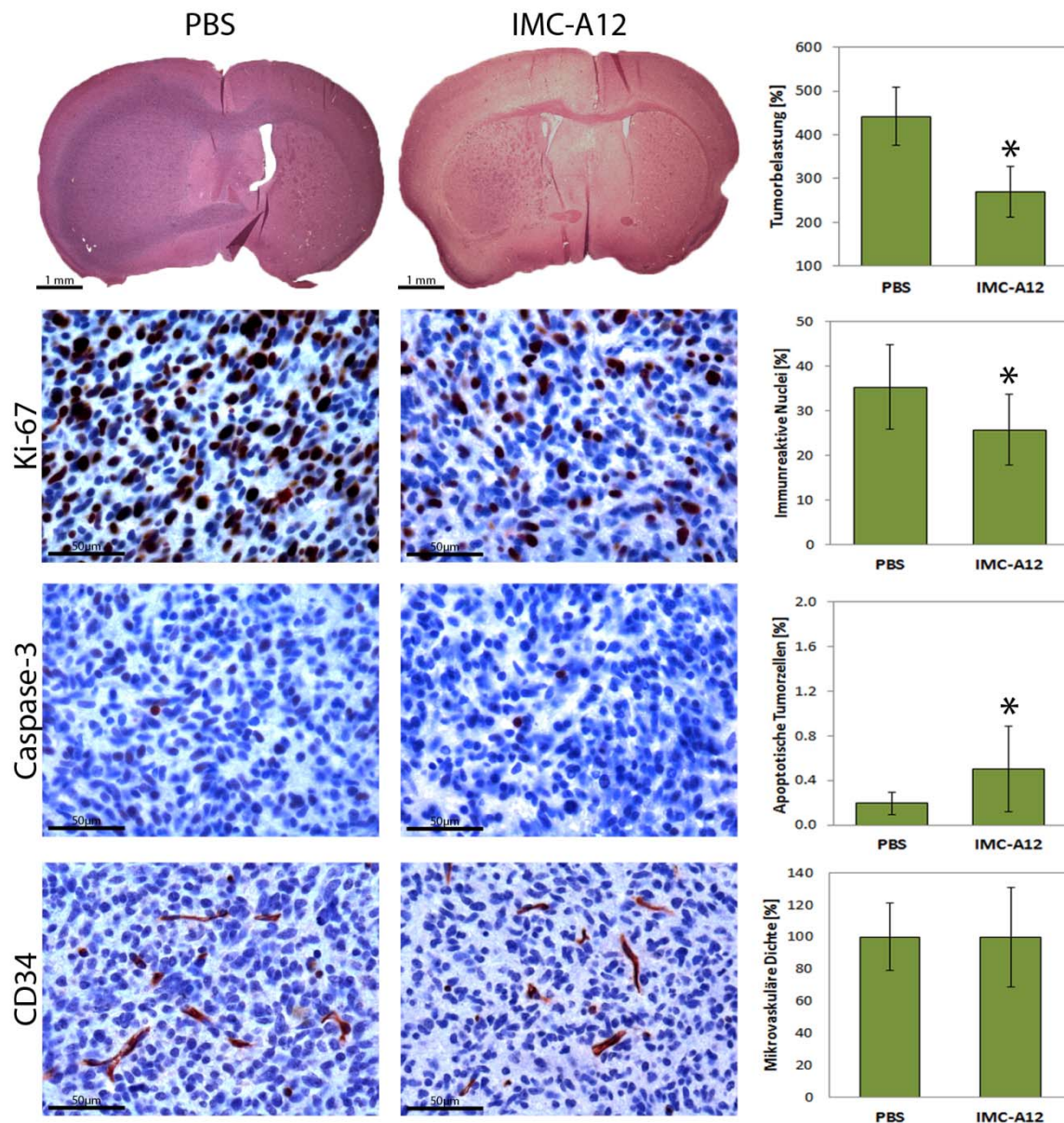
**Abbildung 6** Bestimmung der Tumorbelastung in invasiven orthotopen GS-12-Tumoren. Für die Quantifikation der Tumorbelastung wurden 6 repräsentative Regionen auf 6 koronaren Ebenen systematisch analysiert. Modifiziert nach Martens et al. (2008)<sup>163</sup>.

**Tabelle 12** Reduktion der Tumorlast der IMC-A12-Behandlungsgruppe relativ zur Kontrollgruppe in 36 repräsentativen Regionen der orthotopen GS-12-Tumore [in %]

| Koronarlevel | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Region 1     | -44.8 | -42.3 | -58.3 | -50.2 | -57.0 | -59.0 |
| Region 2     | -49.6 | -39.4 | -49.5 | -58.1 | -48.2 | -54.6 |
| Region 3     | -46.7 | -41.9 | -39.8 | -51.7 | -47.2 | -60.2 |
| Region 4     | -50.1 | -39.5 | -40.1 | -50.5 | -50.3 | -58.1 |
| Region 5     | -66.8 | -42.9 | -44.0 | -81.1 | -71.2 | -73.5 |
| Region 6     | -53.8 | -35.1 | -39.5 | -36.1 | -45.4 | -70.6 |

Immunhistochemische Untersuchungen in Bereichen, die eine hohe Tumorzellichte aufwiesen, zeigten eine signifikante Inhibierung der Proliferation um 27,1 % in behandelten Tumoren ( $25,7 \pm 7,9$  % zu  $35,3 \pm 9,5$  %;  $p = 0,02$ ; Abb. 7). Die Immunreaktivität für den Apoptose-spezifischen Marker cleaved Caspase-3 lag auch bei GS-12-Tumoren unter 1 %, jedoch konnte im Gegensatz zu U87-Tumoren eine signifikante 2,5-fache Erhöhung der Apoptose von  $0,2 \pm 0,1$  % auf  $0,5 \pm 0,4$  % ( $p < 0,05$ ) in behandelten Tumoren beobachtet werden (Abb. 7). Im Gegensatz zu U87-Tumoren wurde hingegen keine signifikante Veränderung der Anzahl an Blutgefäßen durch die Behandlung mit IMC-A12 festgestellt ( $99,6 \pm 31,0$  % zu  $100,0 \pm 20,9$  %;  $p = 0,97$ ; Abb. 7). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die diffus infiltrierenden GS-12-Zellen weitestgehend unabhängig von Angiogenese wachsen. So wurden keine mikrovaskulären Proliferate

beobachtet. Darüber hinaus wurden in unbehandelten GS-12-Tumoren ca. 25 % weniger Blutgefäße detektiert als in unbehandelten U87-Tumoren ( $48,4 \pm 10,1$  zu  $64,8 \pm 5,8$  Blutgefäße pro Bild;  $p = 0,004$ ; ohne Abbildung). Den immunhistologischen Analysen zufolge scheinen die GS-12-Zellen direkt durch die Blockierung des IGF-1R mittels IMC-A12 in ihrer Proliferation, Invasion und Apoptose beeinflusst zu werden. Im Gegensatz zu den U87-Tumoren hat die Behandlung mit IMC-A12 in GS-12-Tumoren jedoch keine Wirkung auf die Blutgefäßneubildung.



**Abbildung 7** Auswirkung der IGF-1R Blockierung auf das Wachstum von invasiven orthotopen GS-12-Tumoren. Die Behandlung mit IMC-A12 (2,5 µg/Stunde) reduzierte das Tumolvolumen signifikant um 50,3 %. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die Proliferation der Tumorzellen reduziert und die Anzahl apoptotischer Zellen gesteigert wurden. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

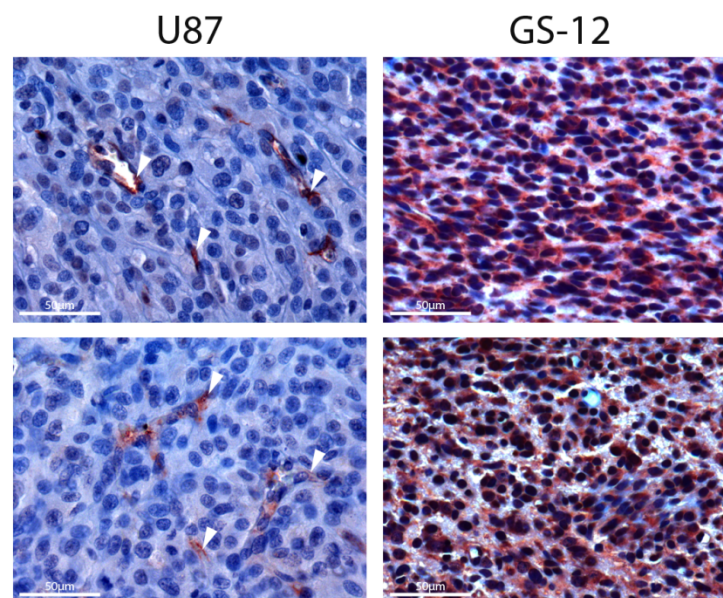


### 3.2. Expressionsanalyse des IGF-Signalwegs in Glioblastomzelllinien und -gewebe

Die voneinander abweichenden Auswirkungen der Blockierung des IGF1R auf das Wachstum von U87- und GS-12-Tumoren *in vivo*, könnten auf Unterschiede in der Expression des *IGF1R* zurückzuführen sein. Für eine Erklärung dieser differentiellen *in vivo* Mechanismen wurden Glioblastomgewebeschnitte und -zelllinien auf ihre Expressionsintensität des *IGF1R* untersucht.

#### 3.2.1. Expressionsanalyse des IGF-1R an Glioblastomgewebeschnitten

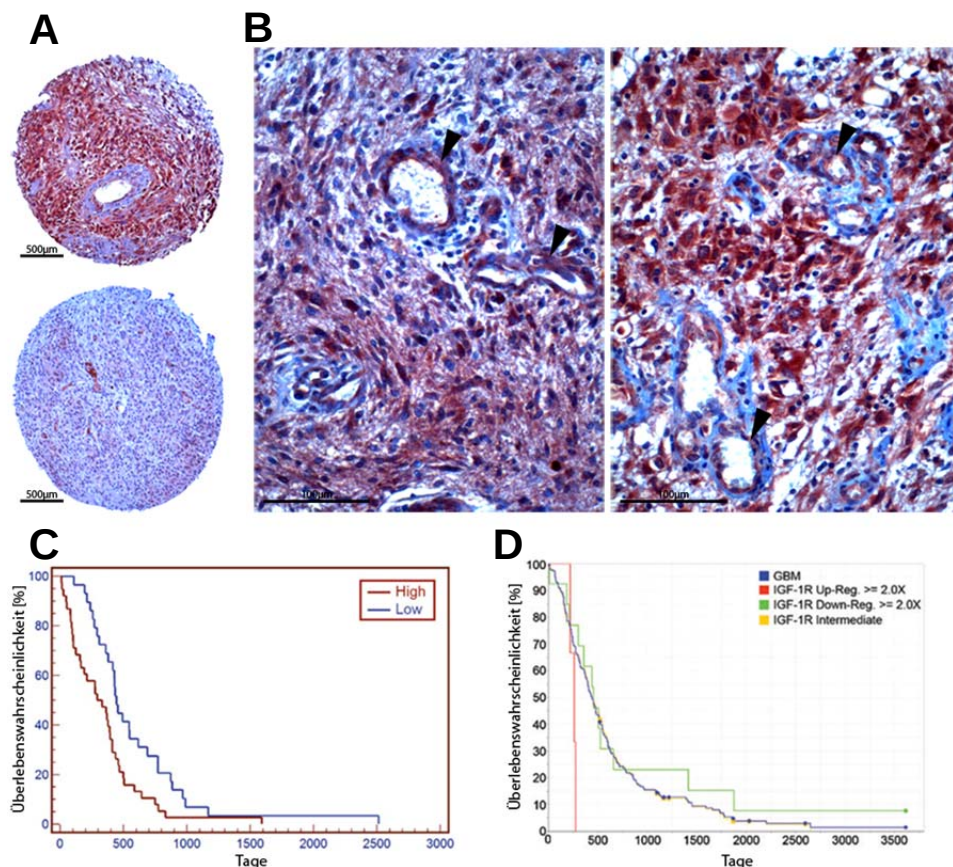
Für eine Analyse des IGF-1R-Status *in vivo* wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten der Xenografttumore vorgenommen. Diese zeigten eine starke Immunreaktivität für IGF-1R im Zytoplasma und auf der Zellmembran in GS-12-Tumorzellen, welche im gesamten Bereich der Tumorausdehnung zu beobachten war (Abb. 8, rechts). Im Gegensatz dazu waren in U87-Tumoren nur vereinzelt Tumorzellen gefärbt, stattdessen zeigten Blutgefäße eine positive Färbung (Abb. 8, links). In U87-Tumoren waren vor allem größere Blutgefäße mit positiver Färbung zu beobachten, wohingegen in GS-12-Tumoren teilweise nur kleine Kapillargefäße schwach gefärbt waren. In GS-12-Tumoren wurden keine großen Blutgefäße mit Immunreaktivität beobachtet.



**Abbildung 8** Immunhistologische Expressionsanalyse des IGF-1R in den orthotopen Glioblastommodellen. Die weißen Markierungen weisen auf Blutgefäße mit IGF-1R Expression in U87-Tumoren hin.

Obwohl die U87- und GS-12-Zelllinien aus humanen Glioblastomen isoliert und *in vivo* implantiert wurden, können diese Xenotransplantattumore nicht mit humanen Glioblastomen gleichgesetzt werden, weil diese sich den Kulturbedingungen *in vitro* stark

angepasst haben. Darüberhinaus spiegeln auch beide Modelle jeweils nur Teilaspekte von humanen Glioblastomen wider, zum einen die solide, hoch proliferative und Angiogenese-abhängige und zum anderen die hoch invasive Komponente. Um die klinische Relevanz des IGF-1R zu evaluieren, wurden zusätzlich zu den Tierversuchen humane Tumorgewebeschnitte sowie ein humaner Gliom-Gewebemikroarray auf ihre Immunreaktivität für IGF-1R hin untersucht. In den humanen Glioblastomschnitten ließen sich immunreaktive Tumorzellen sowie IGF-1R exprimierende intratumorale Blutgefäße beobachten (Abb. 9B).



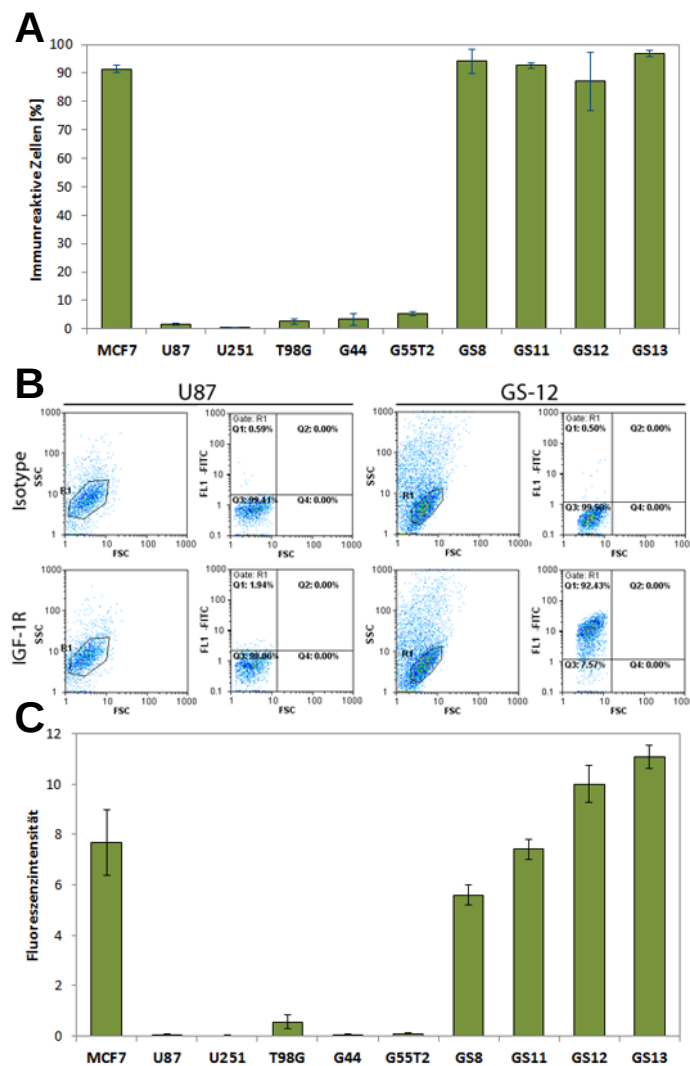
**Abbildung 9** Immunhistologische Expressionsanalyse des IGF-1R in humanen Glioblastomgewebeschnitten und einem Gliomgewebemikroarray. (A) Repräsentative Aufnahmen des Gewebemikroarrays für Glioblastome mit starker (oben) und schwacher (unten) IGF-1R Expression. (B) Repräsentative Aufnahmen von humanen Glioblastomgewebeschnitten, welche IGF-1R-positive Tumorzellen sowie Blutgefäße aufweisen (schwarze Markierungen). (C) Kaplan-Meier Überlebenskurve der Glioblastome aus dem Gewebemikroarray. Patienten mit starker IGF-1R-Expression (rot) haben eine signifikant kürzere Lebenserwartung als Patienten mit schwacher Expression (blau;  $p=0,01$ ). (D) REMBRANDT Datenbankanalyse der Überlebenswahrscheinlichkeiten von Glioblastompatienten. Patienten mit niedriger mRNA-Expression von *IGF1R* (grün) haben eine signifikant längere Überlebenserwartung als Patienten mit hoher Expression (rot;  $p=0,04$ ).

Auf dem Gewebemikroarray, der u.a. 400 Gliome von niedrigem bis hohem Malignitätsgrad auf einem Objektträger beinhaltet, befanden sich insgesamt 67 Glioblastome. Diese wurden in zwei Gruppen mit starker und schwacher IGF-1R-

Expression eingeteilt und mit den dazugehörigen Überlebensdaten der Patienten verglichen (Abb. 9A). Diese Analyse zeigte, dass die Patientengruppe mit starker IGF-1R-Expression ein kürzeres medianes Überleben hatte (311 Tage) als die Gruppe mit schwacher Expression (Median = 442 Tage;  $p = 0,01$ ; Abb. 9C). Diese Gewebearraydaten wurden mit der Repository of molecular brain neoplasia data (REMBRANDT) Datenbank verglichen, welche die klinische Überlebensdaten von über 1000 Patienten und die Genexpressionsdaten von über 500 Patienten enthält. Diese Datenbankanalyse zeigte, dass Glioblastompatienten mit mehr als 2-fach höherer *IGF1R*-mRNA-Expression ( $n=181$ ) ein signifikant kürzeres Überleben als Patienten mit 2-fach herunterregulierter Expression hatten (Abb. 9D;  $p = 0,04$ ). Diese Überlebensdaten auf mRNA-Basis stützen die Beobachtungen aus dem Gewebemikroarray auf Proteinebene.

### 3.2.2. Expressionsanalyse des IGF-1R und der Liganden in Glioblastomzelllinien

Über die Expression von *IGF1R* in Glioblastomzelllinien gibt es, wie in der Einleitung beschrieben, in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. In vielen Fällen wurde nur die Expression auf mRNA-Ebene untersucht, die sich jedoch von der Expression auf Proteinebene deutlich unterscheiden kann. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Spektrum adhärenter Zelllinien und eigens etablierter stammzellähnlicher Glioblastomzelllinien auf die Proteinexpression des IGF-1R durchflusszytometrisch untersucht. Die Brustkrebszelllinie MCF-7 diente dabei als positive Kontrolle, da vielfach publiziert wurde, dass diese den IGF-1R hoch exprimiert. Die Glioblastomzelllinien U87, T98G und U251 wurden als adhärente Linien ausgewählt, da sie weltweit vielfach verwendet werden und gut charakterisiert sind. Darüberhinaus wurden die im Labor für Hirntumorbiologie etablierten adhärenenten Zelllinien G44 und G55T2 sowie die sphärisch wachsenden Glioblastomlinien GS-8, -11, -12 und -13 verwendet. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass in den GS-Zelllinien sowie in der Kontrolllinie jeweils  $87 \pm 10 \%$  bis  $97 \pm 1 \%$  der Zellen IGF-1R-positiv waren, wohingegen maximal ein Anteil von  $5 \pm 1 \%$  der Zellen in den adhärenenten Glioblastomzelllinien den IGF-1R exprimierten (Abb. 10A). Bei der mittleren Fluoreszenzintensität, welches ein Maß für die Anzahl der IGF-1-Rezeptoren pro Zelle ist, waren die Unterschiede zwischen adhärenenten und neurosphärisch wachsenden Glioblastomzellen ebenfalls groß. Die stark immunreaktiven GS-Zelllinien und die positive Kontrolle MCF-7 haben mittlere Fluoreszenzintensitätswerte zwischen 5 und 11 und somit eine 10- bis 20-fach höhere Expression des IGF-1R pro Zelle als die adhärenent wachsenden Glioblastomzelllinien (Abb. 10C).



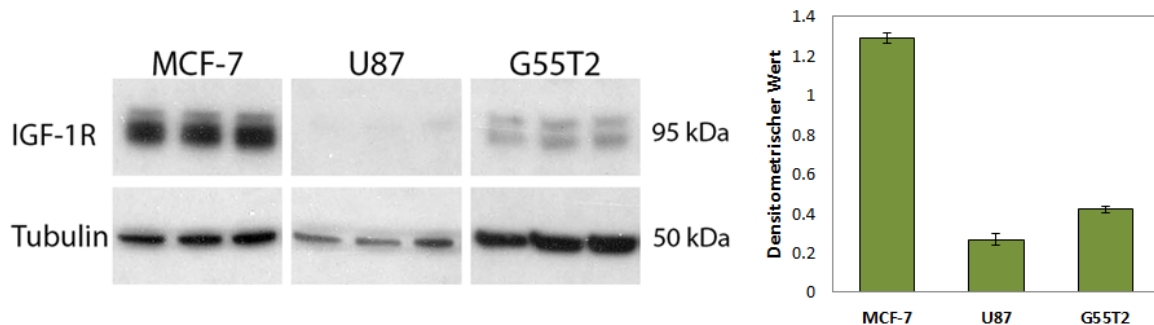
**Abbildung 10** Durchflusszytometrische Analyse der IGF-1R-Expression von adhären und sphärisch wachsenden Glioblastomzelllinien und der Brustkrebszelllinie MCF-7 (Kontrolle). (A) Über 87 % der sphärisch wachsenden GS-Zellen zeigen eine Immunreaktivität für IGF-1R, wohingegen weniger als 1 % der adhären Zellen den IGF-1R exprimieren. (B) Repräsentative Histogramme für U87- und GS-12-Zellen. Die Immunreaktivität in GS-12-Zellen beträgt 0,5 % in der Isotypkontrolle (oben, Quadrant 1) und 92,4 % bei Verwendung des spezifischen IGF-1R-Antikörpers IMC-A12 (unten, Quadrant 1). (C) Fluoreszenzintensitätswerte des IGF-1R pro Zelle. MCF-7- und GS-Zellen haben eine ca. 10- bis 20-fach höhere Expression des IGF-1R pro Zelle als adhären wachsende Glioblastomzelllinien. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen.

Um diese durchflusszytometrische Expressionsanalyse mit einer weiteren Methode auf Proteinebene zu validieren, wurden Western Blot-Untersuchungen mit ausgewählten Zelllinien durchgeführt. Als repräsentative, adhären Zelllinien wurden U87- und G55T2-Zellen sowie MCF-7-Zellen als positive Kontrolle ausgewählt. Eine Expressionsanalyse der Aktivierung des IGF-1R und der wichtigsten dazugehörigen Signaltransduktionsproteine in GS-12-Zellen ist zudem in Abschnitt 3.4 ausführlich beschrieben.

Für die Analyse des Rezeptorstatus in den adhären Zelllinien wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen ausgesät und nach der Proteinaufreinigung in Triplikaten im SDS-PAGE und Western



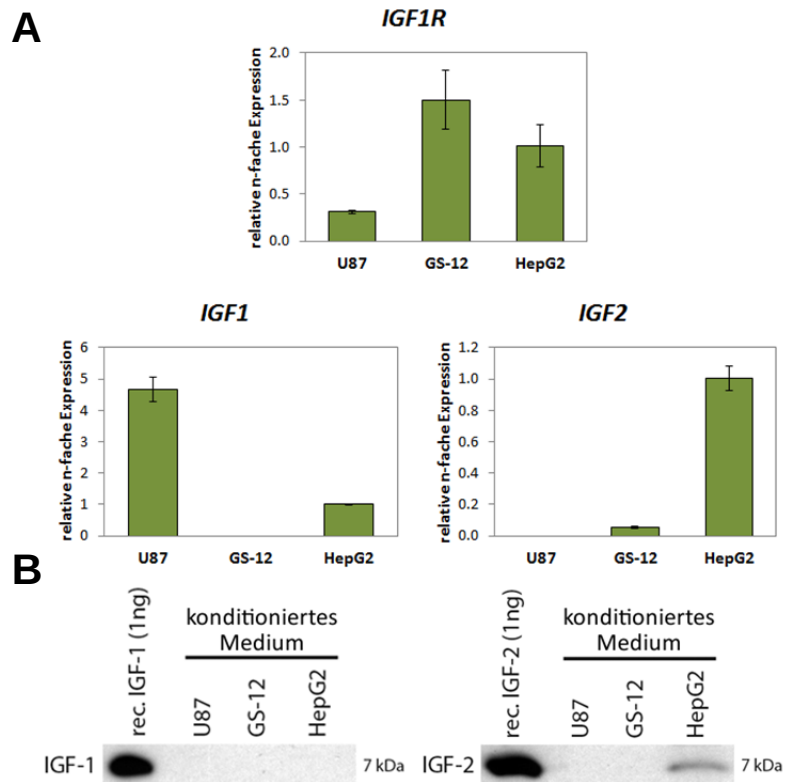
Blot-Verfahren untersucht, um Mittelwert und Standardabweichung für die densitometrische Quantifikation berechnen zu können. Es wurden zwei Banden knapp unterhalb und oberhalb von 100 kDa beobachtet (Abb. 11A). Aufgrund der bekannten Größe des IGF-1R von 95 kDa, wurde für die densitometrische Quantifizierung (Abb. 11B) nur die untere der beiden Banden evaluiert. Die obere Bande könnte einerseits ein unspezifisches Signal des verwendeten Antikörpers sein oder eine größere Variante des IGF-1R aufgrund einer posttranslationalen Modifikation.



**Abbildung 11** Expressionsanalyse des IGF-1R in adhären wachsenden Glioblastomlinien auf Proteinebene. (A) Western Blot-Analyse des IGF-1R in U87- und G55T2-Glioblastomzellen sowie der Brustkrebslinie MCF-7 (positive Kontrolle). Tubulin wurde als Ladekontrolle aufgetragen. (B) Die densitometrische Quantifizierung der Western Blot-Banden. Um die Bandenintensität der unterschiedlichen Zelllinien vergleichen zu können, wurden die Blots parallel durchgeführt und die gleiche Expositionszeit für das jeweilige Protein verwendet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Es wurde beobachtet, dass MCF-7-Zellen bei gleicher Expositionszeit eine deutlich stärkere IGF-1R Expression als U87- und G55T2-Zellen zeigten. Die U87-Proben hatten im Vergleich mit MCF-7 und G55T2 weniger Protein geladen (siehe Tubulin Ladekontrolle), jedoch war auch bei längerer Exposition kaum eine Bande für IGF-1R erkennbar. Die densitometrische Analyse ergab nach einer Normalisierung mit der Tubulinbande, dass mit dieser Methode MCF-7-Zellen eine 4,8-fach höhere IGF-1R-Expression als U87- und eine 3-fach höhere als G55T2-Zellen aufwiesen ( $1,29 \pm 0,03$  zu  $0,27 \pm 0,03$  zu  $0,42 \pm 0,02$ ;  $p < 0,001$ ). Diese Western Blot-Daten bestätigen den Eindruck aus der FACS-Analyse, dass adhären Glioblastomzelllinien kaum bis gar kein IGF-1R exprimieren. Die erhöhte IGF-1R-Expression in GS-Zelllinien im Vergleich zu adhären Glioblastomzelllinien, welche in der FACS-Analyse beobachtet wurde, ist auch auf mRNA-Ebene zu beobachten. Mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurden die *in vivo* verwendeten Zellen U87 und GS-12 auf ihre mRNA Expression von *IGF1R*, *IGF1* und *IGF2* analysiert. Als positive Kontrolle wurde die Leberkarzinomzelllinie HepG2 hinzugezogen, weil diese bekanntlich den Rezeptor sowie auch beide Liganden exprimiert. HepG2 hatte dabei eine dreimal höhere *IGF1R* Expression als U87-Zellen

( $1,0 \pm 0,2$  zu  $0,3 \pm 0,0$ ), bei denen mRNA-Transkripte erst sehr spät im 38. Zyklus der qPCR detektiert wurden. GS-12-Zellen ( $1,5 \pm 0,3$ ) im Vergleich exprimierten fünfmal mehr *IGF1R* mRNA als U87-Zellen und 1,5-mal mehr als HepG2 (Abb. 12A).



**Abbildung 12** Relative Quantifizierung der *IGF1R*, *IGF1* und *IGF2* Transkripte mittels qPCR und Expressionsanalysen der Liganden auf Proteinebene in Western Blot-Analysen. (A) Die Leberkarzinomlinie HepG2 (Kontrolle) exprimiert sowohl *IGF1R* mRNA als auch Transkripte der Liganden *IGF1* und *IGF2*, jedoch ca. 1000-fach mehr *IGF2* als *IGF1*. (B) Für die Western Blot-Analysen wurden die Kulturmedien der Zelllinien nach 24-stündiger Inkubation 50-fach aufkonzentriert. Es konnte nur rekombinantes IGF-1 und -2 (positive Kontrolle) sowie endogenes IGF-2 im konditionierten Medium von HepG2 nachgewiesen werden. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die Expression der Liganden wurde untersucht, um herauszufinden, ob ein autokriner Loop den IGF-Signalweg in diesen Zellen aktiviert. Wie aus der Literatur bekannt, konnte in einer qPCR-Analyse bestätigt werden, dass HepG2-Zellen *IGF1* und *IGF2* exprimieren, jedoch ca. 1000-fach mehr *IGF2* mRNA als *IGF1* (Detektion im 22. Zyklus gegenüber dem 32. Zyklus). U87-Zellen exprimierten 4,6-mal mehr *IGF1* als HepG2 ( $4,6 \pm 0,4$  zu  $1,0 \pm 0,1$ ; Abb. 12A), jedoch konnte kein *IGF2* Transkript detektiert werden (Abb. 12A). GS-12 hingegen exprimierten kein *IGF1* (Abb. 12A) sowie 16-mal weniger *IGF2* mRNA als HepG2 ( $0,06 \pm 0,01$  zu  $1,0 \pm 0,1$ ; Abb. 12A). Um diese Ergebnisse auf Proteinebene zu validieren, wurden Western Blot-Versuche mit konditioniertem, serumfreiem Medium durchgeführt, welches zuvor 50-fach aufkonzentriert wurde. Mit allen drei verwendeten



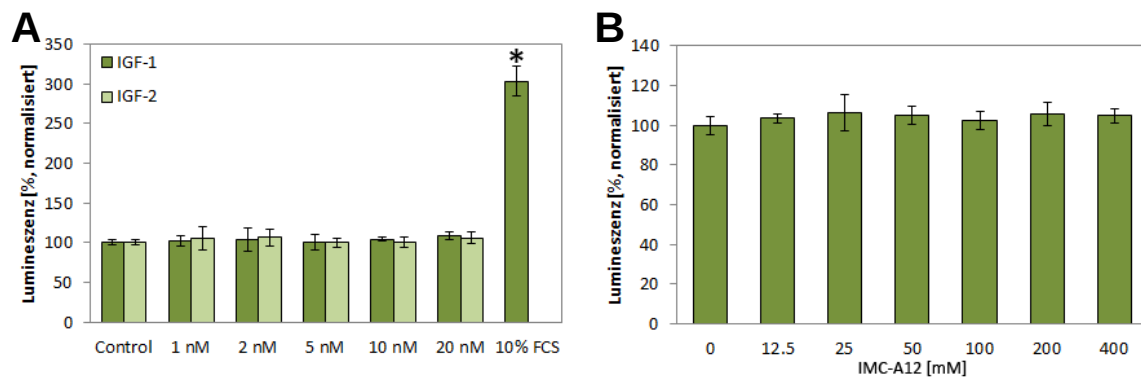
IGF-1-Antikörpern konnte nur rekombinantes IGF-1 (1 ng) bei der erwarteten Laufbande von 7 kDa detektiert werden, was zusammen mit den qPCR-Ergebnissen darauf hindeutet, dass in allen Zelllinien die IGF-1 Expression sehr schwach ist (Abb. 12B). Der IGF-2-Antikörper hat sowohl die rekombinante IGF-2-Bande (1 ng) als auch die Bande für IGF-2 im konditionierten Medium der positiven Kontrolle HepG2 detektiert (Abb. 12B). Die *in vitro* Ergebnisse für die Expression von IGF-1R-Liganden sprechen somit dagegen, dass ein autokriner IGF-1R Aktivierungskreislauf besteht.

### 3.3. Funktionelle *in vitro* Untersuchungen zur Inhibierung des Wachstums von Glioblastomzelllinien

Eine Aktivierung des IGF-1R durch eine Stimulation mit IGF-1R-Liganden kann in anderen Zelltypen zu erhöhter Proliferation, verringerter Apoptose und erhöhter Migration führen<sup>65,164</sup>. In den folgenden Abschnitten sollte untersucht werden, welche Effekte die IGF-1R-Liganden auf U87- und GS-12-Zellen haben und ob eine Aktivierung des IGF-1R durch eine Antikörper-vermittelte Blockade inhibiert werden kann. Diese funktionellen Untersuchungen können Rückschlüsse auf die Effekte des Antikörpers IMC-A12 in den *in vivo* Experimenten erlauben.

#### 3.3.1. Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Proliferation

Für eine Untersuchung eines Effekts der IGF-1R-Liganden auf die Wachstumsrate von U87- und GS-12-Zellen wurden 96-well Platten mit je 2000 - 2500 Zellen ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen der IGF-1R-Liganden (1 - 20 nM) stimuliert. Damit der Einfluss anderer Wachstumsfaktoren ausgeschlossen werden konnte, wurden die U87-Zellen in serumfreiem Medium analysiert (Abb. 13A). Dabei konnte keine veränderte Proliferationsrate in Anwesenheit von IGF-1R-Liganden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden ( $p > 0,05$ ). Nur die Positivkontrolle mit 10 % foetalem Kälberserum (FCS) induzierte eine signifikante Steigerung der Proliferation um 200 % ( $p = 0,01$ ). Dieses Experiment wurde anschließend in Medium mit 1 % Serum wiederholt, jedoch konnten gleichfalls keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (ohne Abbildung). Weil Serum unter anderem auch die IGF-1R-Liganden enthalten kann, ist nicht auszuschließen, dass diese trotzdem einen Einfluss auf die Proliferation von U87 haben könnten. Aus diesem Grund wurde auch ein Inhibitionsexperiment durchgeführt, bei dem verschiedene Konzentrationen des Antikörpers IMC-A12 (12,5 - 400 nM) zu Serum-stimulierten U87-Zellen hinzugegeben wurden (Abb. 13B). Bei diesem Versuch konnte keine signifikante Veränderung der Proliferationsrate durch die Blockierung des IGF-1R beobachtet werden.

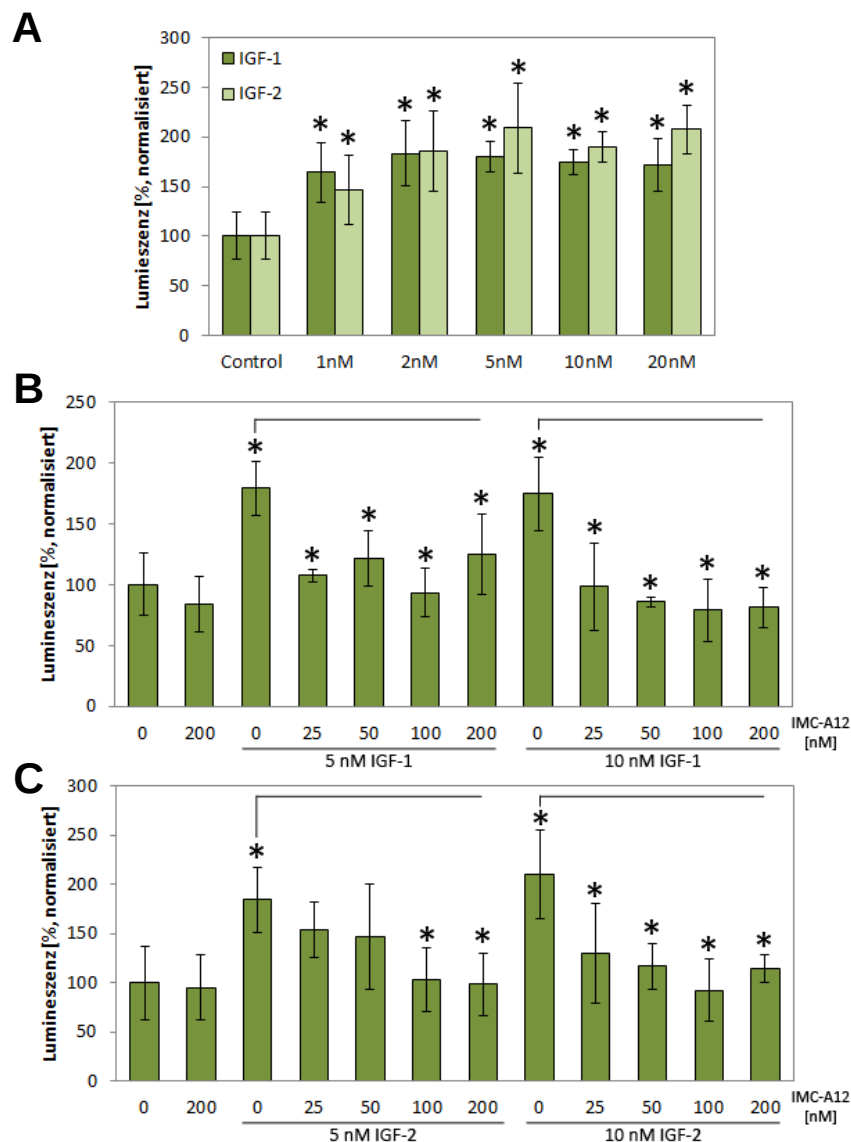


**Abbildung 13** Proliferation von U87-Glioblastomzellen nach Stimulation mit IGF-1 und -2 sowie Inhibition mit IMC-A12. (A) U87-Zellen wurden in serumfreien Medium für 4 Tage mit IGF-1, -2 oder mit 10 % Kälberserum (Kontrolle) stimuliert. Die IGF-1R-Liganden haben keinen Effekt auf die Proliferation von U87-Zellen. (B) Die Blockierung des IGF-1R mit verschiedenen Konzentrationen IMC-A12 in serumhaltigem Medium hat ebenfalls keine Auswirkungen auf die Proliferation. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Fünffachbestimmungen. \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

Für die GS-Zellen, die zwar in serumfreien Medium aber mit dem Zusatzmedium B27 kultiviert wurden, dem Insulin in unbekannter Menge beigelegt ist, musste die Insulinkonzentration vorsichtshalber reduziert werden, weil Insulin in superphysiologischer Konzentration an den Insulin-IGF-1-Hybridrezeptor binden kann. Ein Überschuss an Insulin würde ungewünschte Insulin-abhängige Effekte hervorrufen, die die Messungen der IGF-induzierten Effekte beeinträchtigen könnten. Deswegen wurden die funktionellen Experimente der GS-12-Zellen in Medium mit einer physiologischer Insulinkonzentration von 4,4 nM durchgeführt (NBM low Insulin). Es wurden bereits bei 1 nM IGF-1 und IGF-2 eine signifikant erhöhte Proliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen ( $164 \pm 30$  % für IGF-1;  $147 \pm 35$  % für IGF-2;  $p < 0,02$ ), die bei 2 nM IGF-1 mit einem Anstieg von 83,2 % ein Plateau erreichte, bei der das Wachstum nicht weiter erhöht wurde (Abb. 14A). Die Stimulation mit IGF-2 erreichte bei einer Konzentration von 5 nM das Maximum mit einem Anstieg des Wachstums um 108,9 %. Diese IGF-induzierte Wachstumssteigerung wurde in Inhibitionsversuchen mit verschiedenen Konzentrationen IMC-A12 (25 - 200 nM) gehemmt (Abb. 14B, 14C). Dabei wurden die Zellen mit 5 oder 10 nM IGF-1 (Abb. 14B) oder -2 (Abb. 14C) stimuliert und gleichzeitig mit IMC-A12 inhibiert.

In den Inhibierungsversuchen konnte bereits eine Konzentration von 25 nM IMC-A12 das IGF-1-induzierte Wachstum signifikant auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle reduzieren ( $107,3 \pm 4,7$  % für 5 nM IGF-1;  $98,3 \pm 35,5$  % für 10 nM IGF-1;  $p < 0,02$ ). Auch die IGF-2-induzierte Stimulation der Proliferation wurde durch die Inhibition des IGF-1R signifikant verringert ( $p < 0,05$ ). Diese Ergebnisse zeigen, dass die IGF-1R-Liganden die Proliferation von GS-12-Zellen stark erhöhen und diese Stimulation durch IGF-1R Blockierung auf das Niveau von unstimulierten Zellen reduziert werden kann. Diese

Beobachtungen sind in Einklang mit den *in vivo* Resultaten der immunhistochemischen Analysen für den Proliferationsmarker Ki-67, die gezeigt hatten, dass IMC-A12 die Proliferation von GS-Zellen signifikant reduzierte (Abb. 7).

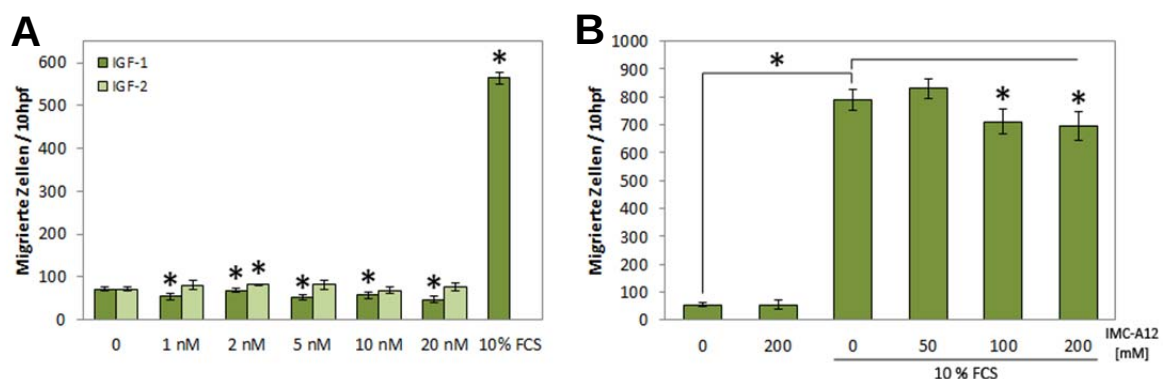


**Abbildung 14** Proliferation von GS-12-Glioblastomzellen nach Stimulation mit IGF-1 und -2 sowie Inhibition mit IMC-A12. (A) GS-12-Zellen wurden in serumfreien Medium mit nur 4,4 nM Insulin (NBM low Insulin) für 8 Tage mit IGF-1 und -2 inkubiert. Die IGF-1R-Liganden haben einen stimulatorischen Effekt auf die Proliferation von GS-12-Zellen. (B+C) Dieser mitogene Effekt von 5 und 10 nM IGF-1 (B) und IGF-2 (C) wurde durch Blockierung des IGF-1R mit verschiedenen Konzentrationen IMC-A12 inhibiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Fünffachbestimmungen. \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

### 3.3.2. Auswirkungen der Stimulation und Inhibition des IGF-1R auf die Migration

Die Inhibition der Tumorzellmigration bzw. -invasion stellt ein zentrales Ziel für die Behandlung von Glioblastomen dar, deswegen wurden auch Migrationsexperimente *in vitro* durchgeführt, um die Wirkung der IGF-1R-Liganden und des Antikörpers IMC-A12

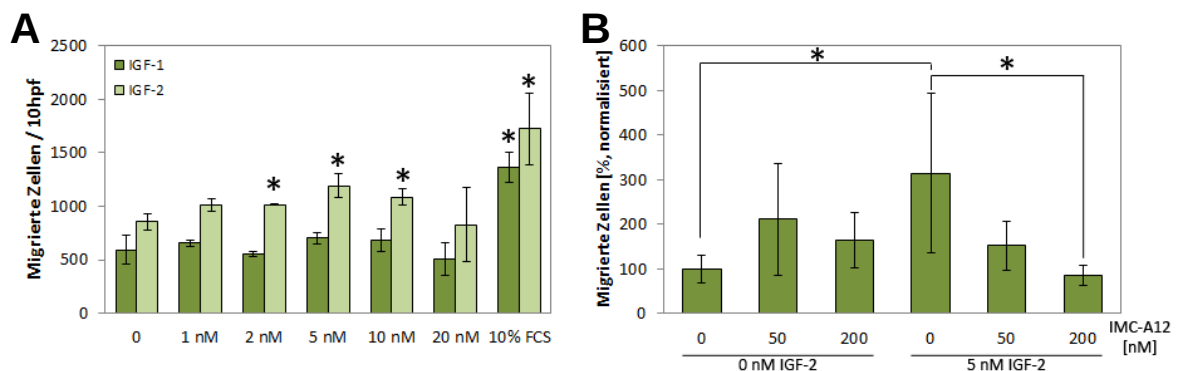
auf U87 und GS-12 zu analysieren. In Transmigrationsassays (Boyden Kammern) wurden die chemotaktischen Eigenschaften von 1 - 20 nM IGF-1 und -2 auf U87-Zellen unter serumfreien Bedingungen untersucht. Die positive Kontrolle (10 % FCS) steigerte die Migration der Zellen von der oberen in die untere Kammer um 683,3 % im Vergleich zu unbehandelten U87-Zellen ( $564,0 \pm 13,0$  migrierte Zellen pro 10 high power fields (hpf) zu  $72,0 \pm 5,8$ ;  $p < 0,0001$ ), wohingegen die IGF-1R-Liganden keinen signifikanten Anstieg bewirkten (Abb. 15A). In einer Untersuchung von foetalem Kälberserum, das verschiedene mitogene und chemotaktische Faktoren enthält, fanden Honegger und Humbel 50 - 150 ng/ml IGF-1 (das entspricht 6,7 – 20 nM) sowie ca. 450 - 750 ng/ml IGF-2 (60 - 100 nM)<sup>165</sup>. Da für die Kontrolle 10 % FCS verwendet wurde, waren dementsprechend 0,67 - 2 nM IGF-1 und 6 - 10 nM IGF-2 im Serum enthalten. Da diese IGF-Konzentrationen in den Versuchen verwendet wurden, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die U87-Zellen auf andere pro-migratorische Wachstumsfaktoren im Serum reagieren. Für die IGF-1R-Liganden konnte vielmehr beobachtet werden, dass durch IGF-1 die Migration geringfügig verringert wurde (Abb. 15A). Ebenso gab es keine konzentrationsabhängige, chemotaktische Wirkung bei der Verwendung von IGF-2, welches nur bei 2 nM eine leichte Steigerung um 13,9 % verursachte ( $82,0 \pm 1,6$ ;  $p < 0,008$ ). Bei Wiederholungen dieses Versuchs, unter anderem in Anwesenheit von 1 % Serum (ohne Abbildung), wurden geringfügig andere Ergebnisse für die jeweiligen Konzentrationen und ebenfalls nur leichte Erhöhungen und Reduktionen gemessen, was zu dem Schluss führt, dass die IGF-1R-Liganden keinen konsistenten oder nur geringen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von U87-Zellen *in vitro* haben.



**Abbildung 15** Migration von U87-Glioblastomzellen nach Stimulation mit IGF-1 und -2 sowie Inhibition mit IMC-A12. (A) U87-Zellen wurden in serumfreien Medium für 4 Tage mit IGF-1, -2 oder mit 10 % Serum (Kontrolle) stimuliert. IGF-1 hat eine leicht inhibierende Wirkung auf die Migration. Lediglich bei 2 nM hat IGF-2 signifikante Auswirkungen auf die Migration, bei der die Migration von U87-Zellen leicht erhöht wird. (B) Für die Untersuchung der Migration bei Blockierung des IGF-1R mit IMC-A12 wurde die Migration mit 10 % Serum stimuliert. Bei 100-200 nM IMC-A12 ist eine leichte Reduzierung der Migration zu beobachten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Fünffachbestimmungen. \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

Aus diesem Grund wurde bei dem darauffolgenden Inhibitionsversuch mit 50 - 200 nM IMC-A12 die Migration mit 10 % FCS induziert (Abb. 15B). Dabei kam es zu einer FCS-induzierten Steigerung der Migration um über 1300 % ( $788,0 \pm 37,8$  zu  $54,3 \pm 7,8$ ;  $p < 0,0001$ ). Im Vergleich zu dieser FCS-Kontrolle konnte eine leichte signifikante Verringerung der Migration um 9,8 und 11,9 % bei 100 und 200 nM IMC-A12 beobachtet werden ( $711,0 \pm 43,7$  und  $694,5 \pm 52,2$  zu  $788,0 \pm 37,8$ ;  $p < 0,02$ ).

Bei GS-12-Zellen hatte die Zugabe von 1 - 20 nM IGF-1 ebenfalls keinen signifikanten chemotaktischen Effekt ( $509,6 - 703,2$  zu  $594,0$ ;  $p > 0,05$ ), wohingegen 10 % FCS die Migration um 129,4 % steigerte (Abb. 16A;  $p = 0,0002$ ). IGF-2 hingegen steigerte die Migration signifikant um maximal 34,0 % bei einer Konzentration von 5 nM ( $1192,4 \pm 110,8$  zu  $890,0 \pm 100,0$ ;  $p = 0,002$ ). Dabei wurde eine konzentrationsabhängige Steigerung von 1 - 5 nM gemessen. Ab 10 nM nahm die Migration im Vergleich zu 5 nM IGF-2 wieder ab ( $1082,5 \pm 75,4$ ), sodass bei 20 nM keine signifikante Steigerung der Migration zur unbehandelten Kontrolle beobachtet wurde ( $825,2 \pm 345,1$ ;  $p = 0,70$ ). Da das FCS laut Literaturangaben 6 - 10 nM IGF-2 enthalten soll<sup>165</sup>, deutet dieser Versuch darauf hin, dass GS-12-Zellen sowohl durch IGF-2 als auch durch andere im Serum enthaltene chemotaktische Faktoren stimuliert wurden.



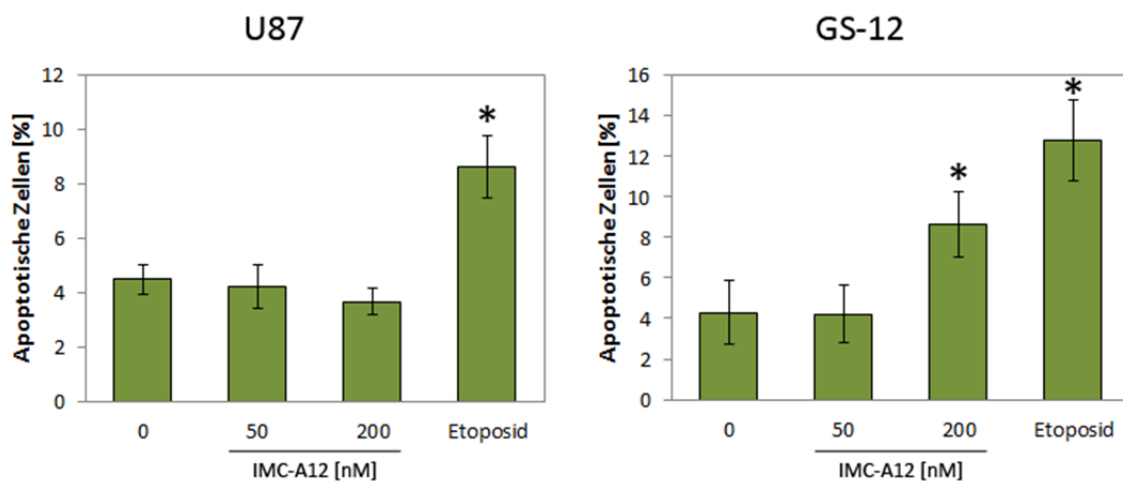
**Abbildung 16** Migration von GS-12-Glioblastomzellen nach Stimulation mit IGF-1 und -2 sowie Inhibition mit IMC-A12. GS-12-Zellen wurden in serumfreiem Medium mit nur 4,4 nM Insulin (NBM low Insulin) für 8 Tage mit IGF-1 und -2 stimuliert. IGF-2 hatte bei 2, 5 und 10 nM einen positiven Effekt auf die Migration von GS-12-Zellen. Dieser chemotaktische Effekt wurde durch Blockierung des IGF-1R mit 200 nM IMC-A12 inhibiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Fünffachbestimmungen. \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

Bei den Inhibitionsversuchen mit GS-12-Zellen war im Gegensatz zu den Versuchen mit U87-Zellen die IGF-2-induzierte Migration mittels IMC-A12 blockierbar. Diese Blockierung führte zu einer signifikanten Reduktion der Migration bei einer Konzentration von 200 nM IMC-A12 ( $83,5 \pm 22,5$  zu  $308,4 \pm 176,0$ ;  $p = 0,04$ ; Abb. 16B). Bei unstimulierten Zellen wurde bei Zugabe von 50 und 200 nM IMC-A12 beobachtet, dass es zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Erhöhung der Migrationsrate kam. In diesem Falle erzeugte der Antikörper möglicherweise selbst eine geringfügige Aktivierung des Rezeptors, was auf

eine intrinsische Aktivität des Antikörpers hindeutet, d.h. dass die Bindung des Antikörpers eine Dimerisierung der Halbrezeptoren und Aktivierung des IGF-1R hervorrufen kann. Zusammenfassend wurde die Migration von U87-Zellen nicht durch die IGF-1R-Liganden und nur schwach durch Blockierung des IGF-1R reguliert, wohingegen IGF-2 die Migration von GS-12-Zellen erhöhte, welche wiederum durch IGF-1R Blockade inhibiert wurde.

### 3.3.3. Auswirkungen der Inhibierung des IGF-1R auf die Apoptose

Eine weitere Funktion der Signaltransduktion des IGF-1R ist den programmierten Zelltod (Apoptose) zu verhindern. Deswegen wurden die U87- und GS-12-Zellen mit IMC-A12 inkubiert und mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Apoptotische Zellen, deren Zellmembranintegrität verloren geht, nehmen fluorophormarkiertes Annexin V in ihre Membran auf, wohingegen sich das fluoreszierende Propidiumiodid in die DNA von nekrotischen Zellen interkaliert. U87 und GS-12-Zellen wurden 72 Stunden mit IMC-A12 oder mit dem Topoisomeraseinhibitor Etoposid inkubiert, welcher als positive Kontrolle fungierte. Etoposid erzeugte in U87-Zellen eine signifikante Erhöhung der Apoptose um 91,9 % ( $8,6 \pm 1,1$  % zu  $4,5 \pm 0,5$  %;  $p = 0,0004$ ; Abb. 17). IMC-A12 hingegen zeigte sowohl bei einer Konzentration von 50 nM als auch bei 200 nM keine pro-apoptotische Wirkung.



**Abbildung 17** Durchflusszytometrische Untersuchung der Apoptose von U87- und GS-12-Zellen nach Blockierung des IGF-1R mit 50 und 200 nM IMC-A12 bzw. Inkubation mit Etoposid (positive Kontrolle). U87-Zellen wurden in Medium mit 10 % FCS und GS-12 in NBM mit 4,4 nM Insulin (NBM low Insulin) für 72 Stunden mit IMC-A12 oder Etoposid inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer auf Apoptose untersucht. Eine Blockierung des IGF-1R hatte keinen Apoptose-stimulierenden Effekt auf U87-Zellen, wohingegen 200 nM IMC-A12 den programmierten Zelltod von GS-12-Zellen steigerte. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Fünffachbestimmungen. \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

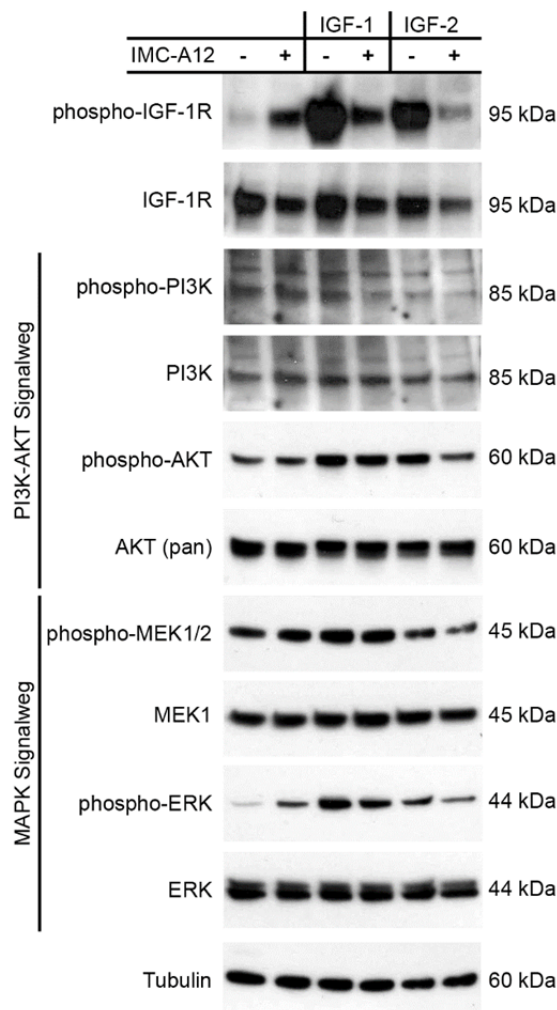
In GS-12-Zellen steigerte Etoposid die Apoptose signifikant um 197 % ( $12,8 \pm 2,0$  % zu  $4,3 \pm 1,6$  %;  $p < 0,0001$ ). Eine Konzentration von 50 nM IMC-A12 bewirkte auch bei GS-12-Zellen keine Änderung, wohingegen sich der Anteil der apoptotischen Zellen bei 200 nM IMC-A12 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verdoppelte ( $8,6 \pm 1,6$  %;  $p = 0,02$ ). In Einklang mit den *in vivo* Beobachtungen erhöht sich der Anteil apoptotischer GS-12-Zellen durch Blockierung des IGF-1R. In U87-Zellen hat die Blockierung keinen Einfluss auf die Apoptose.

### 3.4. Analyse der Liganden-induzierten Aktivierung und Blockierung des IGF-Signalwegs

Den oben beschriebenen Veränderungen von funktionellen Zelleigenschaften gehen intrazelluläre Signalkaskaden voraus, in denen spezifische Signaltransduktionsproteine von Kinasen phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung kann mit Antikörpern, die gegen die phosphorylierte Variante eines Proteins gerichtet sind, in Western Blot-Analysen semi-quantitativ beurteilt werden. Für diese Untersuchungen wurde eine 6-Well Platte mit jeweils  $1 \times 10^6$  GS-12-Zellen pro Well in Medium mit 4,4 nM Insulin (NBM low Insulin) ausgesät, um die Aktivierung des IGF-1R durch Insulin zu verhindern. Nach 48 Stunden wurden drei Wells mit 200 nM IMC-A12 für zwei Stunden präinkubiert, anschließend wurden jeweils zwei Wells (eine mit IMC-A12 und eine ohne) mit 10 nM IGF-1 oder mit 10 nM IGF-2 für 10 Minuten stimuliert oder unstimuliert gelassen. Nach dieser Inkubation wurden Proteine aus den Zelllysaten isoliert und mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Stimulation mit IGF-1 und -2 erzeugte ein starkes Signal für den phosphorylierten IGF-1R im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle, bei der nur eine schwache Bande beobachtet werden konnte (phospho-IGF-1R, Abb. 18). Die Präinkubation mit IMC-A12 reduzierte diese gesteigerte Phosphorylierung drastisch. Im Falle der unstimulierten Zellen weist die erhöhte Phosphorylierung des Rezeptors auf eine intrinsische Aktivität des Antikörpers hin. Die Bindung des Antikörpers kann eine Dimerisierung der Halbrezeptoren hervorgerufen haben, die zu einer Aktivierung und Phosphorylierung des Rezeptors geführt hat. Bei der Ladekontrolle für den Rezeptor (IGF-1R, Abb. 18) wurde beobachtet, dass der Antikörper die Menge an IGF-1R reduzierte bei gleichbleibender Menge am Haushaltsprotein Tubulin (Tubulin, Abb. 18). Dies deutet auf den Effekt hin, dass eine Bindung des Antikörpers an den Rezeptor die Internalisierung und Degradierung dessen fördert. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich der IGF-1R in GS-12-Zellen durch IGF-1 und -2 aktivieren lässt und diese Aktivierung durch Blockierung des Rezeptors reduziert wird. Dem IGF-1R sind hauptsächlich zwei Signalkaskaden nachgeschaltet, der PI3K-AKT- und der MAPK-Signalweg (Einleitung Abschnitt 1.3). Für beide Signalkaskaden wurden jeweils zwei wichtige Proteine für die



Untersuchung im Western Blot ausgewählt. PI3K und AKT sind zentrale Proteine für den gleichnamigen Signalweg, wohingegen MEK und ERK wichtige MAP-Kinasen darstellen, die durch Aktivierung des IGF-1R phosphoryliert werden.



**Abbildung 18** Analyse der Liganden-induzierten Stimulation und Inhibition des IGF-1R in GS-12-Zellen. Die Zellen wurden 2 Stunden mit IMC-A12 präinkubiert und anschließend 10 Minuten mit IGF-1 oder -2 (10 nM) stimuliert und im Western Blot auf Phosphorylierung zentraler Proteine des PI3K-AKT- und MAPK-Signalwegs untersucht. IMC-A12 inhibiert die Phosphorylierung des IGF-1R und nachgeschalteter Signalproteine durch die Liganden.

Im ersten Signalweg zeigte die Stimulation mit IGF-1 oder -2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine Phosphorylierung der PI3K (phospho-PI3K). Trotzdem konnte beobachtet werden, dass die Blockierung des IGF-1R die Phosphorylierung der PI3K in Anwesenheit von IGF-1 reduzierte. Beim Protein AKT hingegen konnte man in beiden mit IGF-stimulierten Proben eine eindeutig erhöhte Phosphorylierung von AKT im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachten (phospho-AKT). Präinkubation mit IMC-A12 reduzierte diese Aktivierung, vor allem im Falle der IGF-2-Stimulation. Demzufolge



konnte gezeigt werden, dass die PI3K-AKT-Signalkaskade durch IGF-Stimulation aktiviert und mittels IGF-1R-Blockade gehemmt wird.

Auch im zweiten Signaltransduktionsweg konnten Veränderungen der Phosphorylierung von MEK und ERK beobachtet werden. Ähnlich wie bei PI3K wurde auch MEK1/2 durch IGF-1 stärker phosphoryliert als durch IGF-2 (phospho-MEK1/2). Auch hier konnte eine erhöhte Phosphorylierung von MEK allein durch Anwesenheit des Antikörpers beobachtet werden, was ebenfalls an der intrinsischen Aktivität des Antikörpers liegen kann. Präinkubation mit IMC-A12 bei gleichzeitiger Ligandenstimulation des IGF-1R reduzierte das Signal der Bande im Vergleich zur stimulierten Probe. Die Ergebnisse des Transkriptionsfaktors ERK ähnelten denen von AKT. Hier konnte bei beiden IGF-1R-Liganden eine eindeutig erhöhte Phosphorylierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden (phospho-ERK). Wiederum zeigte auch die alleinige Hemmung des IGF-1R mit IMC-A12 eine erhöhte Aktivierung von ERK. Jedoch inhibierte IMC-A12 auch die Liganden-induzierte Phosphorylierung von ERK deutlich, was zu dem Schluss führt, dass beide zentralen Signalwege unterhalb des IGF-1R an der Signaltransduktion beteiligt sind und durch IMC-A12 erfolgreich gehemmt werden.

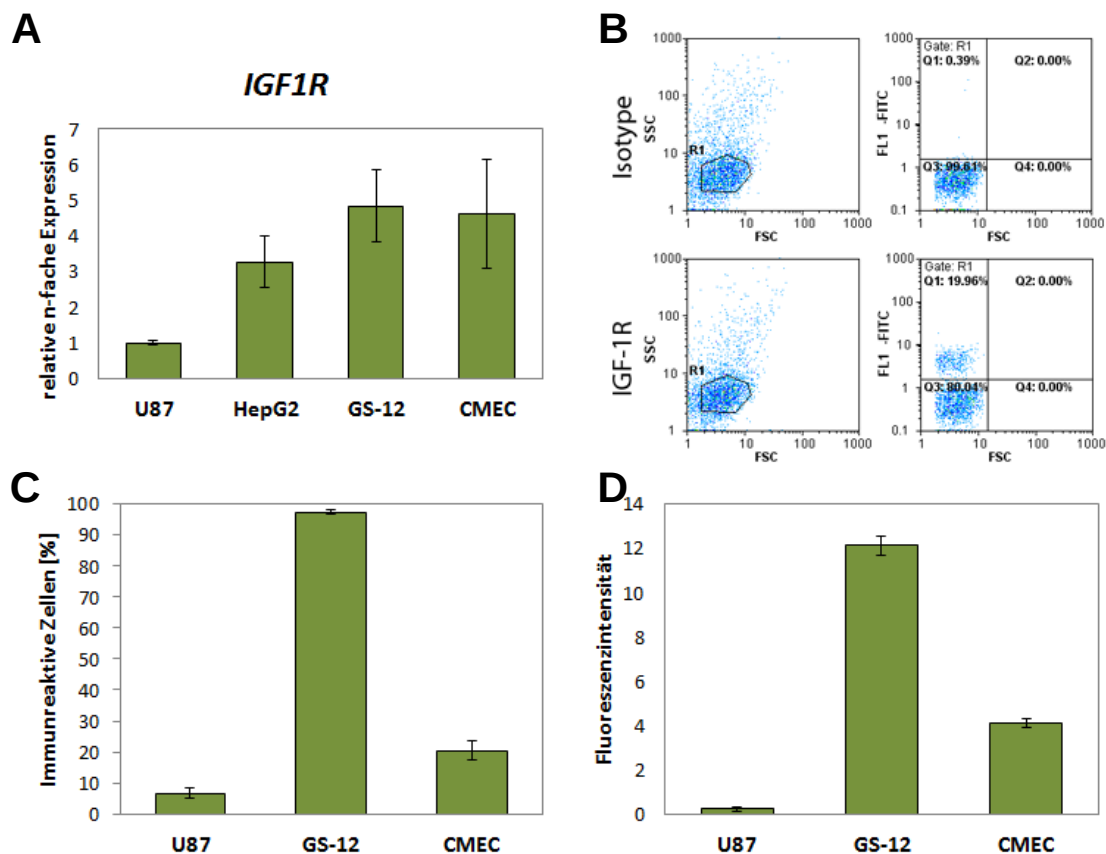
### 3.5. Untersuchungen zum IGF-1R in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen

In den U87 *in vivo* Tumoren wurde eine Reduktion der Blutgefäßdichte durch Blockierung des IGF-1R beobachtet (Abb. 6). In den folgenden Abschnitten sollen zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen (CMEC), die zuvor im Labor für Hirntumorbiologie der Klinik für Neurochirurgie aus Angiomen isoliert wurden, auf ihren Expressionsstatus des IGF-1R untersucht werden, sowie funktionelle Analysen durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die *in vitro* Ergebnisse mit den *in vivo* Beobachtungen korrelieren.

#### 3.5.1. Expressionsanalyse des IGF-1R in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen

Im Vergleich zu der oben untersuchten positiven Kontrolle HepG2 exprimieren diese Endothelzellen 41,2 % mehr *IGF1R* mRNA ( $1,4 \pm 0,5$  zu  $1,0 \pm 0,2$ ) und somit vergleichbar viel *IGF1R* wie die Glioblastomzelllinie GS-12 ( $1,5 \pm 0,3$ ) und fast 5-mal mehr als U87-Zellen ( $0,3 \pm 0,0$ ; Abb. 14A). Für die IGF-1R-Liganden konnten jedoch keine Transkripte detektiert werden (ohne Abbildung). Auf Proteinebene ist das Resultat nicht so eindeutig wie auf RNA-Ebene. Eine FACS-Untersuchung zeigte, dass eine Population von  $20,4 \pm 3,1$  % der CMECs IGF-1R exprimierte. Somit waren es 3-mal so viele IGF-1R-positive Zellen wie bei U87-Zellen ( $6,7 \pm 1,8$  %), jedoch fast 5-mal weniger als bei GS-12-Zellen ( $97,4 \pm 0,6$  %; Abb. 19C). Anders als bei den positiven GS-12-Zellen zeigten die CMEC-Histogramme, dass nur eine Subpopulation eine erhöhte Immunreaktivität für IGF-1R aufwies (Abb. 19B). Die positiv gemessene CMEC-Subpopulation hatte eine ca. 20-fach

höhere durchschnittliche Fluoreszenzintensität als U87-Zellen ( $4,1 \pm 0,2$  zu  $0,2 \pm 0,1$ ; Abb. 19D). Die Fluoreszenzwerte betrugen jedoch nur ein Drittel der Intensität von GS-12-Zellen. Dass eine Subpopulation von Endothelzellen den IGF-1R in hohem Maß exprimiert, sollte daraufhin durch funktionelle Untersuchung der Proliferation untermauert werden. Deswegen wurden Stimulations- und Inhibierungsversuche durchgeführt, um die *in vivo* Beobachtungen und die Expressionsanalysen zu validieren.

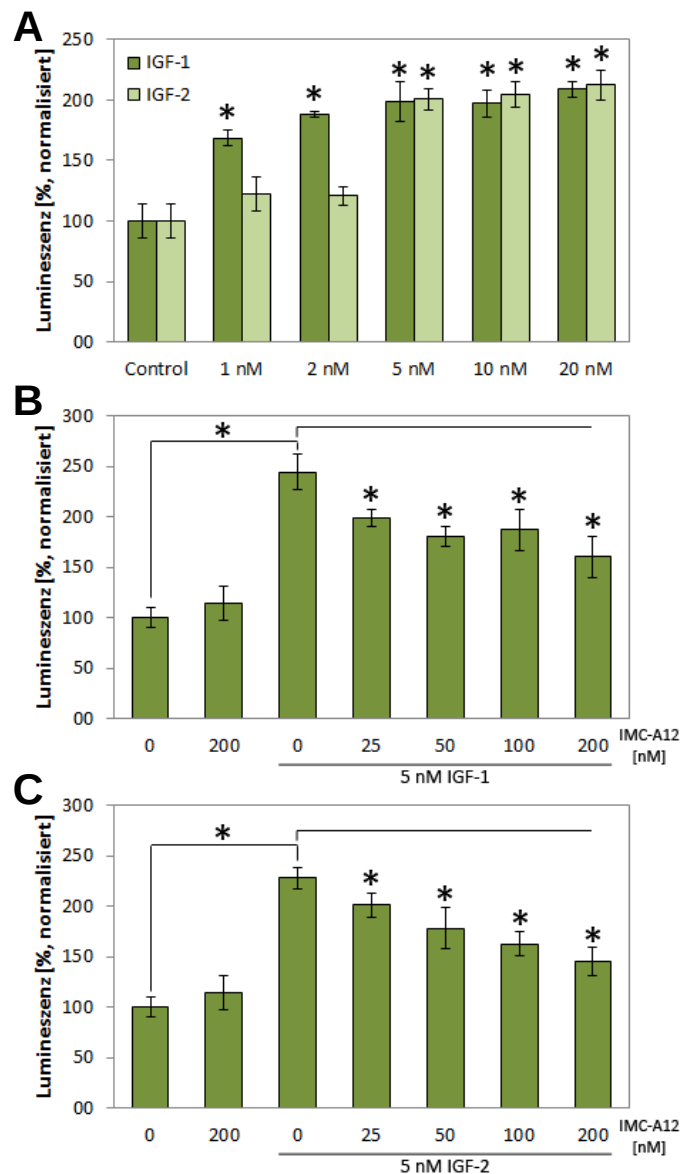


**Abbildung 19** Expressionsanalyse des IGF-1R in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (CMEC) mittels qPCR- und FACS-Analysen. (A) CMECs exprimieren vergleichbare Mengen an *IGF1R*-Transkripten wie GS-12-Zellen. (B) Ein repräsentatives Histogramm einer FACS-Analyse der Endothelzellen zeigt, dass eine Subpopulation IGF-1R exprimiert. (C) Die Population an IGF-1R-positiven CMECs beträgt 20 %, wohingegen 6,7 % der U87-Zellen und 97,4 % der GS-12-Zellen IGF-1R exprimieren. (D) Fluoreszenzintensitätswerte der FACS-Analyse. CMECs haben eine ca. 20-fach höhere Expression des IGF-1R pro Zelle als U87-Zellen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen (qPCR) und Vierfachbestimmungen (FACS).

### 3.5.2. Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Proliferation von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen

Die zerebralen Endothelzellen wurden wie in Abschnitt 3.3.1 mit IGF-1 und -2 stimuliert und auf ihre Proliferationsrate untersucht. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bewirkte die Zugabe von 1 nM IGF-1 bereits eine signifikante Erhöhung der Proliferation um 68,3 % ( $168,3 \pm 6,4$  % zu  $100,0 \pm 13,9$  %,  $p < 0,0001$ , Abb. 20A), die bei maximaler

Konzentration von 20 nM um 108,5 % im Vergleich zur Kontrolle anstieg ( $208,5 \pm 6,5$  %,  $p < 0,0001$ ). IGF-2 stimulierte die Proliferation der CMECs erst ab einer Konzentration von 5 nM signifikant auf  $200,5 \pm 8,9$  % des Kontrollwerts ( $p < 0,0001$ ). Ab einer Konzentration von 5 nM konnten für beide Liganden ähnliche Lumineszenzwerte detektiert werden, deswegen wurde für den anschließenden Inhibierungsversuch mit IMC-A12 die Proliferation mit 5 nM IGF-1 oder -2 stimuliert.



**Abbildung 20** Proliferation von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen nach Stimulation mit IGF-1 und -2 sowie Inhibition mit IMC-A12. (A) CMECs wurden in serumfreiem Medium für 4 Tage mit IGF-1 und -2 stimuliert. Die IGF-1R-Liganden haben einen positiven Effekt auf die Proliferation von GS-12-Zellen. (B+C) Dieser mitogene Effekt von 5 nM IGF-1 (B) und IGF-2 (C) wurde durch Blockierung des IGF-1R mit verschiedenen Konzentrationen IMC-A12 inhibiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Fünffachbestimmungen. \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$

Die Blockierung des IGF-1R bewirkte bereits bei einer Konzentration von 25 nM IMC-A12 eine signifikante Reduktion der Proliferation um 18,8 % bei IGF-1 ( $198,4 \pm 8,7$  %,  $p < 0,05$ ).

$p = 0,0008$ ; Abb. 20B) sowie um 11,7 % bei IGF-2 ( $201,1 \pm 12,3$  %,  $p = 0,01$ ; Abb. 20C) im Vergleich zur IGF-stimulierten Kontrolle ohne Antikörper ( $244,2 \pm 17,6$  % bei IGF-1-Stimulation,  $227,8 \pm 10,4$  % bei IGF-2-Stimulation, Abb. 20B, 20C). Diese stärkere Inhibierung in den IGF-1-stimulierten Zellen erreichte bei 200 nM IMC-A12 die Maximalwirkung mit einer Reduktion um 34,3 % ( $160,6 \pm 20,2$  %,  $p = 0,0001$ ). Bei den IGF-2 stimulierten CMECs begann die Inhibierung zunächst schwächer, steigerte sich aber konzentrationsabhängig bei 200 nM auf eine Inhibierung von 36,2 % ( $145,3 \pm 13,5$  %,  $p < 0,0001$ ). Diese signifikante Hemmung der Proliferation der Endothelzellen war nicht so drastisch wie die Inhibierung bei GS-12-Zellen, bei denen der Antikörper die Stimulation komplett auf den Wert der unbehandelten Kontrolle inhibieren konnte (Abb. 14B, 14C). Begründet werden kann dies dadurch, dass im Falle der Endothelzellen wahrscheinlich nur die IGF-1R exprimierende Subpopulation inhibiert wird, wohingegen 90 % der GS-12-Zellen gehemmt werden. Schlussfolgernd bestätigen diese Proliferationsassays, dass zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen durch die IGF-1R-Liganden stimuliert werden und eine Blockierung des IGF-1R dieses Wachstum inhibiert.

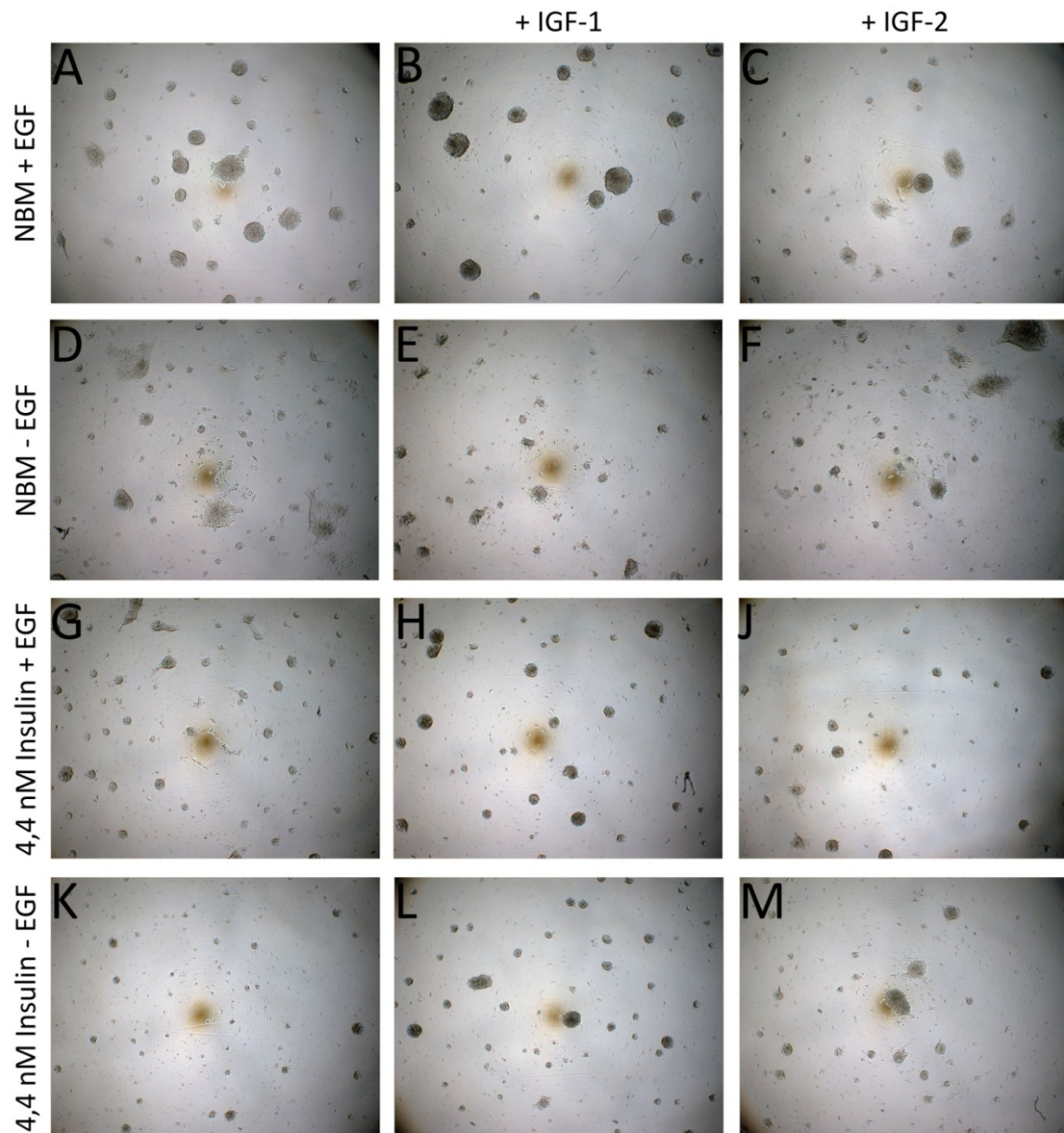
### 3.6. Untersuchung der IGF-Abhängigkeit von Glioblastom-Primärzellen

In der Literatur wurde beschrieben, dass bei stammzellähnlichen Glioblastomzelllinien und Primärzellkulturen EGF durch IGF-2 ersetzt werden kann<sup>166</sup>. Der Wachstumsfaktor EGF wird üblicherweise für die Etablierung und Langzeitkultivierung von neuronalen Stammzellen und stammzellähnlichen Glioblastomzelllinien verwendet. Um die These der Substituierung von EGF durch IGF-2 zu prüfen und die Abhängigkeit primärer Glioblastomzellen von EGF und von IGF-1R-Liganden zu untersuchen, wurden Tumorzellen aus frisch resezierten Glioblastomen isoliert und in 12 unterschiedlichen Kulturbedingungen ausgesät. Die Zellen wurden in NBM mit hohem ( $4,4 \mu\text{M}$ ) und physiologischem ( $4,4 \text{ nM}$ ) Insulingehalt mit und ohne IGF-1R-Liganden ( $20 \text{ ng/ml}$ ) sowie mit und ohne EGF ( $20 \text{ ng/ml}$ ) kultiviert (Abb. 21). Die Ausbeute an sphärisch wachsenden Glioblastomzellen, die nach der ersten mechanischen Dissoziation wieder Neurosphären bildeten, war äußerst gering, sodass erst nach einem Jahr von 104 Tumorproben nur eine primäre Tumorzelllinie etabliert werden konnte, die in allen Kulturbedingungen wuchs und Neurosphären bildete. Diese Linie, nachfolgend N207-14 benannt, wurde aufgrund ihres langsamen Wachstums rein morphologisch auf ihre Fähigkeit Neurosphären zu bilden untersucht.

In NBM mit hohem Insulingehalt und EGF (Abb. 21A) wuchsen die Zellen morphologisch betrachtet ähnlich wie die bereits etablierten GS-Zelllinien und bildeten Neurosphären. Zusätzliches IGF-1 bewirkte keinen Unterschied im Vergleich zum Kontrollmedium (Abb. 21 B vs. A). Bei Zugabe von IGF-2 (Abb. 21C) wurden weniger und kleinere

Sphären beobachtet. In Medium mit physiologischem Insulingehalt, in dem aufgrund der geringeren Affinität von Insulin an den IGF-1R keine kompetitive Hemmung erwartet werden sollte, konnte man bei Zugabe von IGF-1 größere Neurosphären beobachten als im Kontrollmedium (Abb. 21 H vs. G). Zellen, die mit IGF-2 kultiviert wurden (Abb. 21J), bildeten ebenfalls weniger und kleinere Sphären. Im Vergleich wuchsen Zellen in Medium mit 4,4  $\mu$ M Insulin (Abb. 21 A-F) schneller als mit 4,4 nM, jedoch waren die Zellen mit physiologischem Insulingehalt vermehrt in Suspension (Abb. 21 G-M). Generell wurde beobachtet, dass die Zellen am schnellsten wuchsen und gleichmäßige runde Neurosphären bildeten, wenn dem Medium sowohl EGF als auch IGF-1 zugegeben wurde. Eine Langzeitkultivierung mit IGF-2 führte tendenziell dazu, dass die Zellen ein semi-adhärentes Wachstum am Boden der Kulturflasche aufwiesen (Abb. 21 C, F, J, M). In Medium mit superphysiologischem Insulingehalt konnte die These aus der Literatur, dass IGF-2 EGF substituieren kann, nicht beobachtet werden (Abb. 21 A vs. F und G vs. M). Allein die Neurosphären in Medium mit physiologischem Insulingehalt und IGF-1 waren größer und wuchsen vorwiegend in Suspension im Vergleich zum Kontrollmedium mit EGF (Abb. 21 H, L vs. G, K). Diese Beobachtungen scheinen den Proliferationsergebnissen der GS-12-Zellen zu entsprechen (Abb. 14A), dass IGF-1 das Wachstum von sphärisch wachsenden Glioblastomzellen erhöht. IGF-2 hatte auf die Linie N207-14 keinen oder nur einen geringfügig inhibierenden Einfluss bezogen auf die Anzahl und Größe der Neurosphären.

## N207-14



**Abbildung 21** Primäre Glioblastomzellen in 12 verschiedenen Kulturbedingungen mit hohem (4,4  $\mu$ M) und physiologischem (4,4 nM) Insulingehalt mit und ohne EGF (20 ng/ml) sowie mit und ohne IGF-1R-Liganden (20 ng/ml).

#### 4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung der Inhibition des IGF-1R durch den spezifischen monoklonalen Antikörper IMC-A12 in verschiedenen orthotopen Glioblastommodellen zu untersuchen. U87-Tumore wachsen *in vivo* sehr schnell und stark Angiogenese-abhängig, sodass sie ein Modell für die hochzelluläre, zentrale Tumorkern-Komponente sind. Dagegen sind GS-12-Tumore hinsichtlich ihres Wachsmusters vergleichbar mit der diffusen, invasiv wachsenden Tumorperipherie bei humanen Glioblastomen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstandes der Tumorbilogie diskutiert.

##### 4.1. *In vivo* Untersuchungen zur Inhibierung des Tumorwachstums

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass eine Blockierung des IGF-1R in zwei orthotopen Glioblastommodellen das Tumorwachstum reduzierte. Dabei wurden zwei verschiedene Wirkungsmechanismen beobachtet. In U87-Tumoren wurde die Blutgefäß-dichte verringert, wohingegen in GS-12-Tumoren die Proliferation der Tumorzellen inhibiert wurde. Diese Beobachtungen wurden durch *in vitro* Untersuchungen bestätigt, welche zeigten, dass die Blockierung des IGF-1R die Proliferation und Migration von GS-12-Zellen sowie die Proliferation von Endothelzellen inhibierte. Das *in vitro* Wachstum von U87-Zellen wurde hingegen durch den Antikörper IMC-A12 nicht beeinflusst.

##### 4.1.1. Wirkung von IMC-A12 auf das Wachstum von U87-Tumoren *in vivo*

Das Wachstum von orthotopen U87-Tumoren wurde durch die konvektionsunterstützte Applikation des gegen den IGF-1R gerichteten Antikörpers IMC-A12 um 73,7 % inhibiert. In der Literatur beobachteten Yin et al. eine Inhibierung des Wachstums von soliden subkutanen und intrakraniellen Glioblastom-Xenografttumoren durch intraperitoneale Injektion des gegen den IGF-1R gerichteten niedermolekularen Wirkstoffs Picropodophyllin (PPP)<sup>146</sup>. In ihren *in vivo* Experimenten beobachteten die Autoren eine Reduktion des Tumolvolumens sowie eine verringerte Expression und Phosphorylierung des IGF-1R, führten jedoch keine weiterreichenden Untersuchungen zur Identifizierung des Inhibierungsmechanismus durch. In einer anderen Studie zeigten Kolb et al., dass die Blockierung des IGF-1R mittels des monoklonalen Antikörpers SCH 717454 das Wachstum von soliden intrakraniellen Glioblastom-Xenografttumoren inhibiert<sup>167</sup>. Auch in dieser Publikation wurden keine Hinweise auf einen Mechanismus der Wachstumsreduktion aufgezeigt.

U87-Glioblastome sind aufgrund ihres soliden, knotenförmigen Wachstums sehr von der Neubildung von Blutgefäßen abhängig, die sich insbesondere in der Nähe von hypoxischen Arealen bilden, um die dortigen unterversorgten Zellen mit Sauerstoff und

Nährstoffen zu versorgen. Die signifikante Reduktion der vaskulären Dichte um 37,9 % in IMC-A12-behandelten Xenografttumoren verglichen mit Kontrolltumoren weist darauf hin, dass dieser Prozess der Angiogenese inhibiert wurde. Für Glioblastomen wurde bislang in der Literatur noch nicht davon berichtet, dass die Blockierung des IGF-1R die Angiogenese inhibiert. Allerdings wurde ein solcher Mechanismus bei anderen Tumorentitäten beschrieben. Hinweise auf eine Reduktion der Angiogenese durch Blockierung des IGF-1R fanden Menu et al. in einem Mausmodell des Multiplen Myeloms<sup>168</sup>. In ihrer Studie verwendeten sie den niedermolekularen Wirkstoff PPP und beobachteten dabei eine signifikante Reduktion der intratumoralen mikrovaskulären Dichte. Eine weitere Studie, in der eine duale Inhibition des IGF-1R und der IGF-1R-Liganden bei subkutanen Ewing's Sarkom- und Rhabdomyosarkom-Xenografts *in vivo* untersucht wurde, zeigte, dass diese Behandlung das Tumorwachstum signifikant inhibierte<sup>148</sup>. Dabei beobachteten die Autoren eine Reduktion der Blutgefäßdichte *in vivo* sowie auch eine Reduktion der Bildung gefäßähnlicher Strukturen bei humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) *in vitro*. Des Weiteren zeigten Wang et al. in einer Untersuchung bei orthotopen Schilddrüsen-Xenografttumoren, dass eine intraperitoneale Behandlung mit IMC-A12 zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen sowie einer verringerten Blutgefäßdichte *in vivo* führte<sup>169</sup>. Im Vergleich mit unbehandelten Tumoren reduzierte die Blockierung des IGF-1R das Tumorwachstum dabei signifikant um über 50 %.

Zusätzlich zu der starken Reduktion der Blutgefäßdichte wurde in der vorliegenden Arbeit eine Reduktion der Tumorzellproliferation um 19 % beobachtet. Es fand sich jedoch kein Unterschied der Apoptoserate von Tumorzellen in behandelten versus unbehandelten Tumoren. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von der Literatur insofern, als dass in mehreren Studien eine erhöhte Apoptose durch IGF-1R-Inhibition beschrieben wurde. In diesen Publikationen wurden allerdings subkutane Tumore untersucht, wohingegen in der vorliegenden Arbeit intrazerebrale Tumore behandelt wurden, welche aufgrund des orthotopen Wachstums eine höhere Vergleichbarkeit mit humanen Glioblastomen aufweisen. In einer Studie, in der subkutane U87-Xenografttumoren untersucht wurden, beobachteten Seely et al. eine um mehr als 60 % verringerte Tumorangehrate bei Mäusen, die beginnend am dritten Tag nach Tumorzellinjektion mit dem intraperitoneal applizierten IGF-1R-spezifischen Antikörper IR3 behandelt worden waren<sup>170</sup>. Anhand von Gewebeschnitten wurde gezeigt, dass die Inhibition des IGF-1R zu einer erhöhten Tumorzellapoptose führte. Auch in einer Publikation von Bielen et al. ist ein anti-apoptotischer Effekt durch Blockierung des IGF-Signalwegs beschrieben. Die Autoren untersuchten die Wirkung einer oral applizierten Kombination des IGF-1R-Antikörpers NVP-AEW541 mit Imatinib, einem niedermolekularem Inhibitor des PDGFR, auf das Wachstum von



subkutanen, pädiatrischen Glioblastom-Xenografttumoren<sup>171</sup>. Diese Behandlung inhibierte die Phosphorylierung mehrerer Signaltransduktionsmoleküle des IGF-Signalwegs und führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens *in vivo*. Des Weiteren zeigten die Autoren eine durch IGF-1R-Inhibition vermittelte erhöhte Expression des Apoptosemarkers cleaved Caspase-3 *in vitro*.

Zusammenfassend zeigt die Literaturrecherche, dass in subkutanen Glioblastom-Xenografttumoren die Reduktion des Tumorwachstums mit einer anti-apoptotischen Wirkung der IGF-1R-Blockierung assoziiert ist. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt jedoch im orthotopen U87 Xenograftmodell nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde - ähnlich wie zuvor für Ewing's Sarkom- und Schilddrüsen-Xenograftmodelle beschrieben - eine signifikante Reduktion der intratumoralen Blutgefäßdichte durch Blockierung des IGF-1R beobachtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen somit einen inhibitorischen Effekt einer Blockierung des IGF-1R auf die Blutgefäßneubildung in einem stark Angiogenese-abhängigen intrakraniellen Glioblastom-Xenograftmodell.

#### 4.1.2. Wirkung von IMC-A12 auf das Wachstum von GS-12-Tumoren *in vivo*

GS-12 Tumore wachsen diffus und hoch infiltrativ, somit ist dieses Tumormodell vergleichbar mit der invasiven Komponente humaner Glioblastome. Durch die IMC-A12-Behandlung wurde die Ausdehnung der GS-12-Tumore verglichen mit unbehandelten Kontrolltumoren signifikant um 50,2 % reduziert. Im Gegensatz zu den U87-Tumoren wurde hierbei jedoch die Anzahl der Blutgefäße durch die Blockierung des IGF-1R nicht beeinflusst. Der Unterschied lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die diffus infiltrativen GS-12-Tumore weitaus weniger abhängig sind von Angiogenese als die hoch proliferativen, nodulär wachsenden U87-Tumore. So zeigte auch eine Studie von Martens et al., in der invasive Glioblastom-Xenografttumore mit dem gegen den VEGFR2 gerichteten Antikörper DC101 behandelt wurden, dass die anti-angiogenetische Therapie das Wachstum der diffus infiltrativen Tumore nicht verringerte und dass keine Zeichen angiogenetischer Aktivität wie z.B. proliferierende Endothelzellen im Tumor nachweisbar waren<sup>163</sup>. Dagegen ließ sich das Wachstum nodulärer, stark Angiogenese-abhängiger Glioblastom-Xenografttumore durch DC101 hocheffizient inhibieren<sup>42</sup>. Interessanterweise wurde in einer Studie von Sakariassen et al. beobachtet, dass sich die angiogenetische Aktivität humaner Glioblastomzellen im Verlauf seriell aufeinanderfolgender Tumorexplantationen und Re-Transplantationen ändern kann<sup>172</sup>. Tumorzellen, die nur wenige Tage nach erstmaliger Inkulturnahme (aus frisch resezierten Glioblastomen) in das Hirn von Ratten implantiert wurden, bildeten Tumore, die Angiogenese-unabhängig und diffus invasiv wuchsen und stammzellähnliche Eigenschaften aufwiesen. Nach mehreren *in vivo* Passagen veränderten sie jedoch ihren Phänotyp hin zu einem hoch proliferativen,

non-invasiven und Angiogenese-abhängigen Tumorwachstum. Da die Autoren die Tumorbiosien zwischen den seriellen Re-Transplantationen kurzfristig in serumhaltigem Medium kultivierten, kann es möglich sein, dass sich die Zellen partiell differenzierten und Stammzeleigenschaften mit jeder weiteren Passage zunehmend verloren gingen. Die Daten von Sakariassen et al. könnten den Unterschied zwischen den *in vivo* Wachstumsmustern der in Serum kultivierten U87- und den serumfrei kultivierten stammzellähnlichen GS-12-Glioblastomzellen *in vivo* erklären.

Die immunhistologische Untersuchung von GS-12-Tumorgewebeschnitten zeigte des Weiteren eine 27 %-ige Reduktion der Proliferationsrate sowie eine 2,5-fache Erhöhung der prozentualen Anzahl apoptotischer Zellen. Es ist unwahrscheinlich, dass allein diese Effekte die Tumorausdehnung um 50 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltumoren reduzieren konnten. Vermutlich wurde auch die Invasion bzw. die Migration der Tumorzellen in das Hirngewebe hinein durch die Blockierung des IGF-1R inhibiert. Einen Hinweis hierauf lieferte die Auswertung der verschiedenen Tumorregionen (Tabelle 12, siehe 3.1.2). Dabei wurde deutlich, dass vor allem die Regionen, welche weit entfernt von der Injektionsstelle lagen, eine stärkere Inhibierung der Tumorlast aufwiesen als Regionen proximal zur Injektionsstelle, was auf eine verminderte Tumorzellinvasion hindeutet. Die Hypothese, dass IMC-A12 die Migration von GS-12-Zellen *in vivo* inhibiert, lässt sich allerdings histologisch nicht definitiv klären, da die Gesamttumorzellausdehnung auch durch die Proliferations- und Apoptoserate mit beeinflusst wird und diese einzelnen zusammenwirkenden Parameter nicht präzise individuell quantifizierbar sind. Migrationsversuche *in vitro* zeigten jedoch darüber hinausgehend, dass IMC-A12 die Migration von GS-12-Zellen inhibiert (siehe 3.3.2), was dafür spricht, dass eine direkte Inhibierung der Tumorzellmigration zu der verminderten Gesamttumorausdehnung bei IMC-A12 Behandlung *in vivo* mit beigetragen hat. In der Literatur wurde eine Beteiligung des IGF-1R an der Invasivität von Glioblastomzellen in Tierversuchen an Ratten von Zhai et al. 2006 beobachtet<sup>173</sup>. Die Autoren zeigten, dass Strahlentherapie die Invasivität von Glioblastomzellen *in vitro* (Matrigel) und *in vivo* (intrakraniell) erhöht. Die *in vivo* Auswertung erfolgte dabei an immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten, bei denen Nestin-positive Zellgruppen (> 10 Zellen), die sich vom Tumorkern entfernt hatten, quantifiziert wurden. Eine Inhibition des IGF-1R mittels eines spezifischen Tyrosinkinaseinhibitors reduzierte die durch Strahlentherapie stimulierte Migration *in vivo*. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Regulation der Migration von GS-12-Zellen durch den IGF-1R *in vitro* wird detaillierter unter 4.3.2. diskutiert.

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstmalig, dass die Blockierung des IGF-1R zu einer Inhibierung des Wachstums von orthotopen invasiven Glioblastomen *in vivo* führt. Die histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse

sprechen dafür, dass dieser wachstumsinhibierende Effekt auf eine Inhibierung der Tumorzellproliferation, eine Verstärkung der Tumorzellapoptose und auf eine Verminderung der Invasivität der Tumorzellen zurückzuführen ist.

#### 4.1.3. Evaluierung der Konvektionstherapie

Bei den hier beschriebenen Tiermodellen wurde mit der Behandlung erst begonnen nachdem sich Tumore etablieren konnten, anstatt den Antikörper zeitgleich mit der Tumordinjektion zu applizieren. Mit diesem Therapieschema wurde vermieden, dass der Antikörper die Tumorzellen bei der Initiierung eines Tumors inhibiert. Somit entsprechen die hier verwendeten Tumormodelle der klinischen Realität, bei der etablierte Tumore in fortgeschrittenen Stadien behandelt werden. Als Applikationsroute für die Behandlung mit IMC-A12 wurde die Konvektionstherapie gewählt, bei der das Therapeutikum konstant intraparenchymal in das betroffene Gewebe appliziert wird<sup>159</sup>. Der positive Druck, der durch die konstante langsame Infusion des Wirkstoffes erzeugt wird, erhöht die Diffusionsrate und die Verteilung des Therapeutikums im Gehirn im Vergleich mit systemischer Therapie von Wirkstoffen, welche die Bluthirnschranke aufgrund ihres hohen Molekulargewichts oder schlechter Permeabilitätseigenschaften nur schwer passieren können<sup>160</sup>. Mit der Konvektionstherapie können größere Areale des Gehirns mit hoch konzentrierten Wirkstoffen behandelt werden als bei Behandlungsmethoden, in denen der Wirkstoff bei Resektion des Tumors in die entstandene Tumorkavität appliziert wird, wie z.B. bei Carmustin-Wafern. Das Zytostatikum Carmustin wird dabei in biologisch abbaubare Implantate gepresst, welche in der Resektionshöhle verteilt werden und lokal über mehrere Wochen den Wirkstoff peritumoral freisetzen<sup>174</sup>. In der Phase III-Studie „PRECISE“ verglichen Kunwar et al. die Wirkung von rekombinantem Interleukin(IL)-13, welches mit einem Exotoxin konjugiert wurde und mittels Konvektionstherapie appliziert wurde, mit der zytostatischen Wirkung von Carmustin-Wafern bei Glioblastomrezidiven<sup>175</sup>. In dieser Studie konnte für den konvektions-therapeutischen Behandlungsarm eine äquivalente Lebensdauer beobachtet werden im Vergleich zu den bereits zugelassenen Carmustin-Wafern. In dieser Studie konnten ebenfalls wichtige Erfahrungswerte gesammelt werden, z.B. dass eine optimale Platzierung der Katheter eine großflächige intraparenchymale Distribution des Wirkstoffs ermöglicht. In einer Dosisfindungsstudie zeigten Bruce et al., dass die Behandlung von rezidierten Glioblastomen mit dem Chemotherapeutikum Topotecan mittels Konvektionstherapie wirkte und dabei nur geringe Toxizität aufwies<sup>176</sup>.

Schlussfolgernd bestätigen die in dieser Arbeit beschriebenen *in vivo* Versuche, dass die Konvektionstherapie eine effektive Methode für die intrakranielle Applikation von Antikörpern darstellt, welche ein zu hohes Molekulargewicht sowie zu schlechte

Permeabilitätseigenschaften haben, um die Bluthirnschranke in ausreichendem Maße zu passieren.

#### 4.2. Expressionsanalyse des IGF-Signalwegs in Glioblastomzelllinien und -gewebe

##### 4.2.1. Expressionsanalyse des IGF-1R an Glioblastomgewebeschnitten

Um die Proteinexpression des IGF-1R in Glioblastomen zu analysieren, wurden immunhistochemische Untersuchungen an Glioblastomgewebeschnitten von U87- und GS-12-Xenografttumoren sowie humanen Glioblastomen im Gewebemikroarray durchgeführt. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass in U87-Tumoren hauptsächlich große Blutgefäße den IGF-1R exprimierten, wohingegen in GS-12-Tumoren alle Tumorzellen eine hohe Expression zeigten. In den humanen Glioblastomen fand sich eine IGF-1R-Expression sowohl auf Blutgefäßendothelzellen als auch auf Tumorzellen. Darüber hinaus zeigte die Auswertung eines Gliom-Gewebemikroarrays, dass Patienten mit hoher intratumoraler IGF-1R Expression eine signifikant kürzere Gesamtüberlebensdauer hatten (Median: 311 Tage) als Patienten mit geringer Expression (Median: 442 Tage). Diese Daten sind in Einklang mit einer parallel durchgeführten Genexpressionsanalyse, die unter Verwendung der REMBRANDT Datenbank durchgeführt wurde, und ergab, dass Glioblastompatienten mit hoher Expression von IGF-1R-Transkripten eine kürzeres Überleben hatten als Patienten mit niedriger Expression. Somit ist die intratumorale Expressionsintensität des IGF-1R von prognostischer Relevanz für Glioblastompatienten. Die Sublokalisierung des IGF-1R in Glioblastomen, die in der vorliegenden Arbeit detektiert wurde, ist nur teilweise konsistent mit einer vorangegangenen Expressionsanalyse, die von Hirano et al. mittels Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung an Gliomen verschiedener Malignitätsgrade durchgeführt wurde<sup>131</sup>. Diese Studie hatte zum einen gezeigt, dass die IGF-1R-Expressionsintensität mit dem Tumormalignitätsgrad korrelierte, zum anderen fand sich eine besonders starke Expression vor allem in perivaskulären Tumorzellen und microvaskulären Proliferaten. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar die IGF-1R-Expression auf Blutgefäßen in humanen Glioblastomen bestätigt, es wurde jedoch keine erhöhte Expression in perivaskulären Bereichen beobachtet. Stattdessen war die IGF-1R-Expression relativ homogen im gesamten Tumor verteilt, sodass keine definierten Bereiche mit besonders hoher IGF-1R-Expression identifiziert wurden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der vorangegangenen Studie von Hirano et al. darauf hin, dass der IGF-1R sowohl auf Glioblastomtumorzellen als auch auf intratumoralen Blutgefäßendothelzellen exprimiert wird und dass eine hohe intratumorale IGF-1R-Expression ein prognostisch negativer Parameter für Gliompatienten ist.

#### 4.2.2. Expressionsanalyse des IGF-1R und dessen Liganden in Glioblastomzelllinien

Der Expressionsstatus des IGF-1R- und der IGF-1R-Liganden IGF-1 und IGF-2 wurde bei den Glioblastomzelllinien U87 und GS-12 auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht. Dabei wurden in qPCR- und Western Blot-Analysen sehr schwache, fast nicht detektierbare Signale für IGF-1R-Transkripte in U87-Zellen *in vitro* gemessen. Auf Proteinebene zeigten U87-Zellen im Vergleich mit der Brustkrebszelllinie MCF-7, die als Positivkontrolle verwendet wurde, eine fast fünffach geringere Expression des IGF-1R. In der FACS-Analyse konnte die lediglich schwache IGF-1R Expression für U87-Zellen sowie für weitere adhärent wachsende Glioblastomzelllinien, wie U251 und T98G, bestätigt werden. Somit wurde anhand zweier verschiedener Methoden zur Detektion der Proteinexpression gezeigt, dass U87-Zellen nur eine sehr geringe Expression des IGF-1R aufweisen.

In der Literatur wurde in verschiedenen Publikationen die Expression von IGF-1R mRNA-Transkripten in U87-Zellen und anderen humanen Glioblastomzelllinien (U251, U373, T98G u.a.) nachgewiesen<sup>134-136</sup>. Untersuchungen der Expression von IGF-1R auf Proteinebene erbrachten inkonsistente Ergebnisse. In einer Arbeit fand sich in einer Western Blot-Analyse von Glioblastomzelllinien eine deutlich schwächere Expression des IGF-1R in U87-Zellen verglichen mit pädiatrischen Glioblastomzelllinien<sup>171</sup>, was in Einklang mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist. In zwei weiteren Studien, in denen microRNAs identifiziert wurden, welche die Proteinexpression des IGF-1R reduzieren, zeigte sich in Western Blot-Analysen ein deutlicheres Signal für den IGF-1R in U87 Zellen als in der vorliegenden Arbeit<sup>177,178</sup>. Des Weiteren wurde in einer Studie, in der die Wirkung des niedermolekularen Wirkstoffs NVP-AEW541 auf U87-Zellen untersucht wurde, ein eindeutiges Signal für den IGF-1R in U87 Zellen detektiert<sup>179</sup>. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studien bezüglich der IGF-1R Expression in U87 Zellen, könnte eine Publikation von Carson und Pirruccello liefern<sup>180</sup>. Die Autoren untersuchten verschiedene U87-Subzelllinien, die sich in ihrer Morphologie und der Wachstumsrate stark voneinander unterschieden. Sie folgerten, dass durch die langjährige Kultivierung der weltweit verwendeten U87-Zelllinie in verschiedenen Laboren eine erhebliche Heterogenität entstanden ist, welche die Reproduzierbarkeit von Experimenten erschwert.

Während in den immunhistologischen Untersuchungen der U87-Xenografttumore die Tumorzellen selbst keine IGF-1R-Expression zeigten, wurde eine hohe Expression des IGF-1R auf GS-12-Zellen in Gewebeschnitten beobachtet. Auch *in vitro* wurden auf mRNA- sowie auf Proteinebene (FACS und Western Blot) hohe Expressionssignale für den IGF-1R detektiert. Die FACS-Analyse von adhärent und neurosphärisch wachsenden Glioblastomzelllinien zeigte, dass alle untersuchten GS-Linien den IGF-1R ähnlich stark

wie die Brustkrebszelllinie MCF-7 exprimierten, die aufgrund ihrer nachgewiesenermaßen hohen IGF-1R-Expression als Positivkontrolle verwendet worden war<sup>156</sup>. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die Kulturbedingungen Einfluss auf den IGF-1R Expressionsstatus der Zellen haben. In mehreren vorangegangenen Studien wurde der Einfluss der Kulturbedingungen auf die Genexpressionsprofile von Glioblastomzellen untersucht. Dabei wurden adhärente, Serum-kultivierte Glioblastomzellen verglichen mit serumfreien Zellen, die unter neuronalen Stammzellbedingungen als GS-Zellen kultiviert wurden<sup>181,182</sup>. In diesen Publikationen beobachteten die Autoren, dass GS-Zellen viele Ähnlichkeiten mit neuronalen Stammzellen aufweisen und diese das Expressionsmuster des jeweiligen Ursprungstumors besser konservieren als Serum-kultivierte Zelllinien<sup>181</sup>. In adhärent-wachsenden Zelllinien wurden neben den in Glioblastomen bekannten chromosomalen Anomalien auch viele weitere genetische Amplifikationen oder Deletionen detektiert, die bei Glioblastomen unüblich sind<sup>182</sup>. Beide Publikationen zeigten auch, dass U87-Zellen sich in ihrem Genexpressionsmuster weiter von den Ursprungstumoren entfernt haben als neurosphärisch wachsende Glioblastomzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl in mRNA- als auch in Proteinanalysen in beiden Glioblastomzelllinien keine nennenswerte Expression von IGF-1 und -2 beobachtet werden. Auf Proteinebene konnte endogenes IGF-2 lediglich in der Kontrollzelllinie HepG2 nachgewiesen werden. Dies bestätigt die hohe relative Anzahl an IGF-2-mRNATranskripten, welche in der Leberkarzinomlinie HepG2 detektiert wurde. In der Literatur berichteten lediglich Osuka et al. von einer IGF-1-Expression in murinen stammzellähnlichen Gliomzellen<sup>145</sup>. Bis auf diese Publikation finden sich keine Hinweise (allerdings auch keine negativen Belege) für eine Expression der IGF-1R-Liganden in humanen neurosphärisch wachsenden Glioblastomzellen, sodass eine autokrine Stimulation des IGF-1R in den Xenografttumoren unwahrscheinlich ist. Sehr wahrscheinlich ist hingegen, dass murines IGF-1, welches vorwiegend in der Leber produziert und sezerniert wird, sowohl den IGF-1R auf angiogenetisch aktiven Endothelzellen in U87-Xenografttumoren als auch den humanen IGF-1R auf GS-12 stimuliert hat. Im Serum von Mäusen ist eine IGF-1-Konzentration von 350 ng/ml (entspricht 46,7 nM) detektierbar<sup>183</sup> und murine IGF-1R-Liganden sind auf Proteinebene zu über 90 % homolog mit humanem IGF-1 und -2, sodass sie den humanen IGF-1R binden und aktivieren können. Demzufolge besteht der wahrscheinlichste Wirkmechanismus von IMC-A12 in den *in vivo* Versuchen darin, dass der Antikörper die parakrine Stimulation des endothelialen bzw. tumorzellständigen IGF-1R durch murine Liganden inhibierte und somit das Tumorwachstum verringerte.

#### 4.3. Funktionelle *in vitro* Untersuchungen zur Inhibierung des Wachstums von Glioblastomzelllinien

Die histologische Auswertung der *in vivo* Versuche und die Expressionsanalysen für den IGF-1R an Zellen und Geweben haben bereits deutliche Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen von IMC-A12 gegeben. Um die Effekte von IGF-1 und IGF-2 sowie IMC-A12 auf Glioblastomzellen detaillierter zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden *in vitro* Experimente zur Proliferation, Migration und Apoptose durchgeführt. Die oben beschriebenen Expressionsanalysen ließen vermuten, dass bei U87-Zellen aufgrund der schwachen Rezeptorexpression die IGF-1R-Liganden nur eine geringe Wirkung auf die Proliferation und Migration haben würden. Im Gegensatz dazu war zu vermuten, dass GS-12-Zellen, die eine starke Expression des IGF-1R aufweisen, durch die Liganden deutlich stimulierbar sein würden.

##### 4.3.1. Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Proliferation

Die Inkubation von U87-Zellen mit IGF-1 und -2 in serumfreiem Medium verursachte keine Stimulation der Proliferation im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Auch bewirkte die Blockierung des IGF-1R durch IMC-A12 bei U87-Zellen, deren Wachstum durch 10 % Serum stimuliert wurde, keine Inhibierung der Proliferation. Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen zeigte eine Studie, dass die Zugabe von IGF-1 das Zellwachstum von U87-Zellen sogar verringerte<sup>134</sup>. Für viele Tumorzelllinien anderer Entitäten, wie z.B. Endometriumkarzinom (ECC-1, USPC-1)<sup>184</sup>, Leberkarzinom (HepG2)<sup>185</sup>, Brustkrebs (T47D, MCF-7)<sup>156</sup>, Pankreastumor (BxPC-3)<sup>156</sup> sowie Multiples Myelom (RPMI-8226)<sup>156</sup> wurde hingegen anhand der Thymidininkorporation in die DNA proliferierender Zellen gezeigt, dass IGF-1 die Proliferation stimuliert. Bei all diesen Untersuchungen wurde des Weiteren beschrieben, dass eine Blockierung des IGF-1R diese IGF-induzierte Proliferation inhibiert. Auch in U87-Zellen ist anhand von Wachstumskurven gezeigt worden, dass die Inhibierung des IGF-1R mit dem niedermolekularen Wirkstoff NVP-AEW541 die Proliferation von U87-Zellen dosisabhängig reduzieren kann<sup>179</sup>. In der vorliegenden Arbeit hingegen fand sich eindeutig für die verwendete U87-Subzelllinie, dass IGF-1 und IGF-2 die Zellproliferation nicht stimulierten, was in Einklang mit der lediglich sehr geringen IGF-1R-Expression dieser Zellen ist.

Im Gegensatz zu den U87-Zellen wurde die Proliferation der stammzellähnlichen GS-12-Tumorzellen durch beide IGF-1R-Liganden bei einer Konzentration von 5 nM signifikant um 80 % (IGF-1) bzw. um 109 % (IGF-2) stimuliert. Diese IGF-induzierte Erhöhung der Proliferationsrate wurde durch Blockierung des IGF-1R mittels 100 nM IMC-A12 vollständig auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle reduziert. Diese Daten bestätigen die *in vitro* Daten von Hsieh et al., die ebenfalls eine erhöhte Proliferation von

stammzellähnlichen Glioblastomzellen durch Zugabe von IGF-1 und -2 beobachtet<sup>186</sup>. Sie zeigten einerseits eine erhöhte Bromdesoxyuridin-Inkorporation in die DNA der Zellen nach 7 Tagen und andererseits eine IGF-1-induzierte gesteigerte Zellzahl nach 18 Tagen. Schlussfolgernd zeigen die hier beschriebenen Proliferationsversuche, dass IGF-1 und -2 das Zellwachstum von GS-12-Zellen *in vitro* erhöhen, wohingegen die adhärent wachsende Zelllinie U87 in ihrer Proliferation nicht durch den IGF-Signalweg beeinflusst wird. Diese Proliferationsstimulation bei GS-12-Zellen kann durch die Antikörper-vermittelte Blockierung des IGF-1R signifikant inhibiert werden.

#### 4.3.2. Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Migration

Ein wichtiger Aspekt für eine effiziente Behandlung von Glioblastomen ist die Inhibition der Tumorzellmigration. Um die Auswirkungen der IGF-1R-Liganden und des Antikörpers IMC-A12 auf die Migration von U87- und GS-12-Zellen zu untersuchen, wurden modifizierte Boyden Kammer-Versuche durchgeführt. Dabei verringerte IGF-1 die Migration von U87-Zellen leicht, wohingegen die Zugabe von 2 nM IGF-2 diese leicht erhöhte. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer Studie, in der eine gesteigerte Migration durch IGF-1-Stimulation für U87-Zellen beobachtet wurde<sup>136</sup>, wobei diese Diskrepanz vermutlich wiederum auf die Heterogenität der verschiedenen weltweit verwendeten U87 Subzelllinien zurückzuführen ist.

Da durch IGF-1 und IGF-2 in serumfreiem Medium keine Stimulation der Migration bewirkt werden konnte, wurden Inhibierungsversuche mit IMC-A12 bei U87-Zellen durchgeführt, welche mit 10 % FCS kultiviert wurden. Dabei fand sich eine leichte aber signifikante Verringerung der Serum-induzierten Migration bei 100 und 200 nM IMC-A12. Serum enthält neben anderen Wachstumsfaktoren auch IGF-1 (0,67 – 2 nM) und IGF-2 (6 – 10 nM)<sup>165</sup>. Diese Konzentrationen sind vergleichbar mit denen, welche in den Versuchen mit rekombinantem IGF-1 und IGF-2 ohne Serum verwendet wurden. Die Blockierung der Serum-induzierten Migration von U87 Zellen durch IMC-A12 ist also möglicherweise dadurch erklärbar, dass IGF-1 und/oder IGF-2 im Kontext von im Serum enthaltenen Kofaktoren eine stimulatorische Wirkung entfalten können, die unter serumfreien Bedingungen nicht vorhanden ist und die spezifisch durch den Antikörper blockiert wird. Möglich ist jedoch auch, dass die im Serum enthaltenen IGF-1R-Liganden aufgrund der lediglich sehr geringen Rezeptorexpression keine motogene Wirkung auf U87-Zellen haben und die inhibitorische Wirkung von IMC-A12 auf unspezifischen Effekte bzw. eine Kreuzinhibierung anderer Antigene beruht.

Bei GS-12-Zellen steigerten 5 nM IGF-2 die Migration signifikant um 34 %, wohingegen 1 – 20 nM IGF-1 keinen Effekt zeigte. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass IGF-2 auch mit hoher Affinität an den Insulinrezeptors (IR-A) binden



kann<sup>54</sup>. Demnach wäre es möglich, dass der IGF-1R an der Chemotaxis der GS-12-Zellen beteiligt sein könnte. Jedoch widerlegen die Ergebnisse der Inhibierungsversuche diese Vermutung. Die spezifische Blockierung des IGF-1R mit 200 nM IMC-A12 reduzierte die IGF-2-induzierte Migration (5 nM) vollständig auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle. In der Literatur wurde beschrieben, dass IGF-1 pro-migratorische und pro-invasive Effekte bei neurosphärisch wachsenden Glioblastomzellen *in vitro* induziert<sup>186</sup>. Darüberhinaus wurde bei immortalisierten murinen neuronalen Stammzellen gezeigt, dass IGF-1 und -2 *in vitro* zu einem leichten, 1,4-fachen bzw. 1,5-fachen Anstieg der Migration führten<sup>187</sup>. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der IGF-1R bei U87-Zellen allenfalls in sehr geringem Maße an der Migration beteiligt zu sein scheint. Im Gegensatz dazu stimuliert bei stammzellähnlichen Glioblastomzellen IGF-2 die Chemotaxis *in vitro* signifikant, nicht jedoch IGF-1. Die Reduktion der Migration durch Blockierung des IGF-1R mittels IMC-A12 deutet auf den potentiellen anti-invasiven therapeutischen Nutzen der Inhibition dieses Rezeptors hin.

#### 4.3.3. Auswirkungen der Inhibierung des IGF-1R auf die Apoptose

Die Wirkung von IMC-A12 auf den programmierten Zelltod (Apoptose) von GS-12 Zellen *in vitro* unterschied sich ebenfalls von der Wirkung auf U87-Zellen. Während der Antikörper keine pro-apoptotische Wirkung auf U87-Zellen hatte, bewirkte die Inkubation mit 200 nM IMC-A12 bei GS-12-Zellen eine Verdopplung der Apoptoserate.

*In vitro* Studien von Hsieh et al. in stammzellähnlichen Glioblastomzellen zeigten, dass eine Inhibition des Insulinrezeptorsubstrats (IRS)-1, einer zentralen Tyrosinkinase des IGF-Signalwegs, mittels RNA-Silencing die Lebensfähigkeit der Zellen signifikant reduzierte<sup>186</sup>. Des Weiteren beobachteten die Autoren bei IGF-1-stimulierten Glioblastomzellen nach einer Behandlung mit 5 Gray ionisierender Strahlung eine geringere Anzahl apoptotischer Zellen als in unstimulierten stammzellähnlichen Glioblastomzellen. Demzufolge kann IGF-1 eine protektive Wirkung bei einer Strahlenexposition haben, sodass eine Blockierung des IGF-1R mit IMC-A12 Glioblastomzellen möglicherweise für eine Strahlentherapie sensibilisieren könnte. In Experimenten, welche in dieser Arbeit nicht gezeigt wurden, fand sich zwar kein Einfluss von IGF-1 auf die Basisapoptoserate von GS-12 Zellen, allerdings wurde der Effekt einer gleichzeitigen Bestrahlung nicht untersucht.

Schlussfolgernd bestätigen die *in vitro* Versuche an GS-12-Zellen die erhöhte Apoptoserate, die in IMC-A12-behandelten Xenograftumoren nachweisbar war und bestätigen gleichfalls den fehlenden Effekt der Antikörperbehandlung auf die Apoptose von U87 Zellen *in vivo*.

#### 4.4. Analyse der Liganden-induzierten Aktivierung und Blockierung des IGF-Signalwegs

Die Untersuchung der Hauptsignaltransduktionswege des IGF-1R-Signalwegs diente zum einen dazu, die spezifische IGF-induzierte Blockierung der Rezeptorphosphorylierung durch IMC-A12 zu verifizieren, und zum anderen dazu festzustellen, ob sich die Signalkaskaden bei Stimulation mit IGF-1 und -2 unterscheiden. Beide Liganden bewirkten eine starke Aktivierung des Rezeptors, wobei IGF-1 zu einer noch stärkeren Phosphorylierung des IGF-1R führte als IGF-2. Der IMC-A12-Antikörper blockierte die Rezeptorphosphorylierung sehr deutlich, wenngleich die Phosphorylierung nicht vollständig inhibiert wurde. Dies könnte neben einer unvollständigen Blockierung des Rezeptors unter anderem auch an einer intrinsischen Aktivität des Antikörpers liegen, welche zu einer Dimerisierung der Halbrezeptoren führen kann, wodurch eine Aktivierung durch Liganden vorgetäuscht werden kann. Bei MCF-7-Brustkrebszellen wurde für den Antikörper IMC-A12 bei einer Konzentration von 100 nM keine solche Phosphorylierung beobachtet<sup>156</sup>, jedoch wurden in den hier beschriebenen Versuchen 200 nM IMC-A12 verwendet. Außerdem können sich die Ergebnisse aufgrund der Verwendung einer Zelllinie einer anderen Tumorentität, in diesem Falle der Glioblastomzelllinie GS-12, unterscheiden. Burtrum et al. berichteten des Weiteren von einer Rezeptor-vermittelten Internalisierung und Degradierung des Antikörpers nach Bindung an den IGF-1R<sup>156</sup>. Dieser Endozytose-gesteuerte Abbau des IGF-1R war in den Western Blot-Untersuchungen bei GS-12-Zellen wahrscheinlich ebenfalls vorhanden. Denn die IGF-1R-Proteinbanden von GS-12-Zellen, die mit IMC-A12 behandelt wurden, waren schwächer als die Banden von unbehandelten Zellen. Bei beiden Signaltransduktionswegen wurden die Proteinkinasen, PI3K und MEK 1/2, die in der Signalkaskade zeitlich früher phosphoryliert werden als AKT und ERK, kaum durch die IGF-1R-Liganden aktiviert und durch IMC-A12 inhibiert. Stattdessen war die Aktivierung und Inhibierung der in der Chronologie der Signaltransduktion nachgestellten Proteine AKT und ERK wesentlich stärker. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich nach der zehnminütigen Inkubation der Zellen mit IGF-1 und -2 die Phosphorylierung von PI3K und MEK 1/2 durch Feedbackregulation, z.B. durch die Aktivität von Phosphatasen, bereits wieder normalisiert haben könnte, wohingegen die Signalkaskade an diesem Zeitpunkt noch Auswirkungen auf AKT und ERK hat.

Generell konnte in den Versuchen zur Signaltransduktion beobachtet werden, dass IGF-1 eine stärkere Phosphorylierung des IGF-1R verursachte als IGF-2 und sich dieser Effekt auf allen Ebenen beider Kaskaden fortführte. Eine differenzielle Aktivierung der Signalwege durch IGF-1 und -2 wurde nicht beobachtet, sodass die hier vorliegenden Daten keine Erklärung für die unterschiedlichen funktionellen Effekte der Liganden bei

GS-12-Zellen liefern, wie z.B. eine stärkere Stimulation der Migration durch IGF-2 im Vergleich mit IGF-1. Schlussfolgernd verifiziert dieser Versuch, dass IMC-A12 die Liganden-induzierte Aktivierung des IGF-1R blockiert.

#### 4.5. Untersuchungen zum IGF-1R in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen

##### 4.5.1. Expressionsanalyse des IGF-1R in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen

Die U87-Tierversuche zeigten, dass die Blockierung des IGF-1R eine signifikante Reduktion der Blutgefäßdichte bewirkte. In der Literatur wurde dies *in vivo* bisher nur in anderen Tumorentitäten beschrieben, wie z.B. in subkutanen Ewing's Sarkom- und Rhabdomyosarkom-Xenografts<sup>148</sup>. Dabei wurde zudem gezeigt, dass die Antikörper-vermittelte Blockierung des IGF-1R einen inhibierenden Effekt auf die Bildung kapillarähnlicher tubulärer Strukturen durch makrovaskuläre Endothelzellen (HUVECs) in einem *in vitro* Angiogeneseassay hatte. Da sich Endothelzellen aus verschiedenen Organen und Geweben jedoch stark hinsichtlich der Morphologie und Barrierefunktion voneinander unterscheiden, ist es wichtig mit Endothelzellen zu arbeiten, die aus dem Gehirn isoliert wurden, wenn Angiogenese bei Glioblastomen *in vitro* untersucht werden soll. In der vorliegende Arbeit wurden humane cerebrale microvaskuläre Endothelzellen (CMEC) verwendet, die aus Hirngewebe isoliert worden waren, welches bei der Resektion großer Angiome (arteriovenöser Malformationen) mit reseziert wird, da es den großen angiomatösen Gefäßen unmittelbar anhaftet<sup>188</sup>. Die CMECs wurden in Passage 1 analysiert, um eine Veränderung des IGF-1R-Expressionsstatus bei längerer *in vitro* Kultur zu vermeiden. Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene zeigten, dass die IGF-1R-Expression in CMECs ähnlich hoch war wie in GS-12-Zellen und der Leberkarzinomlinie HepG2, welche als Kontrollzelllinie diente. Bei der FACS-Analyse wurden jedoch lediglich 20 % IGF-1R-positive Zellen beobachtet. Diese Subpopulation zeigte zwar eine vielfach höhere Fluoreszenzintensität pro Zelle als U87-Zellen, aber eine dreimal niedrigere als GS-12-Zellen. Dieser Unterschied der Genexpression zwischen IGF-1R-mRNA und -Protein in CMECs könnte post-transkriptionellen Mechanismen geschuldet sein, wie z.B. der Bindung von microRNAs, welche unter anderem die Translation blockieren können. Aus der Literatur ist bekannt, dass z.B. microRNA-320 die Expression von IGF-1R in Glioblastomzellen reguliert und das Wachstum von Glioblastomen *in vivo* reduziert<sup>189</sup>. In mikrovaskulären Endothelzellen von Ratten wurde ebenfalls nachgewiesen, dass microRNA-320 die Expression von IGF-1R inhibiert<sup>190</sup>. Darüberhinaus ist in der Literatur für verschiedene weitere Arten von humanen Endothelzellen eine Expression des IGF-1R beschrieben worden, unter anderem in mikrovaskulären Endothelzellen der Haut<sup>191,192</sup>, Endothelzellen der Aorta<sup>191</sup> sowie koronaren arteriellen Endothelzellen<sup>193</sup>. Wang et al. beobachteten in CMECs eine

gesteigerte Expression von IGF-1 nach ischämischer Verletzung *in vitro* und *in vivo*<sup>194</sup>. Diese Sekretion von IGF-1 führte zu einer erhöhten Überlebensrate von Neuronen. Den IGF-1-Rezeptorstatus in CMECs untersuchten die Autoren jedoch nicht.

Schlussfolgernd zeigen die vorliegenden *in vitro* Expressionsanalysen, dass zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen den IGF-1R exprimieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den *in vivo* Beobachtungen, die zeigten, dass intrakranielle Endothelzellen IGF-1R exprimieren. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde der Effekt von IMC-A12 auf die Proliferation von CMECs *in vitro* analysiert.

#### 4.5.2. Auswirkungen der Stimulation und Inhibierung des IGF-1R auf die Proliferation von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen

Die reduzierte vaskuläre Dichte in den mit IMC-A12 behandelten U87-Tumoren *in vivo* ließ vermuten, dass IGF-1R-Liganden einen stimulatorischen Effekt auf die Proliferation von CMECs haben könnten und dass dieser Effekt spezifisch durch IMC-A12 inhibierbar sein könnte. Die Ergebnisse der Proliferationsassays mit CMECs zeigten ähnliche Effekte wie die Untersuchungen bei GS-12-Zellen. Sowohl 5 nM IGF-1 als auch 5 nM IGF-2 induzierten einen starken Anstieg der Proliferation um 100 % im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle. Die Blockierung des IGF-1R bewirkte eine signifikante und konzentrationsabhängige Reduktion, die bei 200 nM IMC-A12 und Stimulation mit IGF-1 oder IGF-2 34% bzw. 36% betrug. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit zuvor veröffentlichten Daten bei makrovaskulären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC), die zeigten, dass eine Antikörper-vermittelte Blockierung des IGF-1R die Proliferation dieser Endothelzellen reduzierte<sup>195,196</sup>.

Diese funktionellen Untersuchungen an mikrovaskulären Endothelzellen ergänzen somit die Resultate der Expressionsanalysen an CMECs und die Ergebnisse des U87 *in vivo* Versuchs. Neben der direkten Inhibierung des Wachstums von stammzellähnlichen Tumorzellen durch Blockierung des IGF-1R können durch eine Behandlung mit IMC-A12 zusätzlich intrakranielle Endothelzellen in ihrem Wachstum beeinträchtigt werden, was vermutlich ursächlich für die deutliche Wachstumsreduktion von behandelten U87-Tumoren *in vivo* war.

#### 4.6. Untersuchung der IGF-Abhängigkeit von Glioblastom-Primärzellen

In der Literatur wurde beschrieben, dass der für die Etablierung und Kultivierung von neuronalen Stammzellen und neurosphärisch wachsenden Glioblastomzellen essentielle Wachstumsfaktor EGF durch IGF-2 ersetzt werden kann. Dafür etablierten Soroceanu et al. primäre Glioblastomzellen in serumfreiem Medium unter Verwendung von EGF oder IGF-2 und zeigten, dass die Proliferationsrate sich nicht veränderte, wenn ein

Wachstumsfaktor durch den anderen ersetzt wurde<sup>166</sup>. Dieses Ergebnis bestätigten die Autoren auch an bereits etablierten Glioblastomzelllinien.

Um diese These der Substituierung von EGF durch die IGF-1R-Liganden zu prüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit primäre Glioblastomzellen in 12 verschiedenen Kulturbedingungen etabliert, die IGF-1, IGF-2 und EGF in verschiedenen Kombination sowie unterschiedliche Insulinkonzentrationen enthielten. Dabei zeigte sich, dass IGF-1 zu einer höheren Anzahl gleichmäßig geformter Neurosphären führte als die Zugabe von IGF-2. Dies steht im Widerspruch zu den Proliferationsergebnissen der GS-12-Zelllinie, bei der IGF-1 und -2 in gleichem Maße die Proliferation erhöhten. Möglicherweise reguliert IGF-2 nicht primär die Proliferation von Glioblastomzellen, sondern z.B. die Migration, wie in den Migrationsassays mit GS-12-Zellen beobachtet wurde. Hinweise, die für diese Hypothese sprechen, lieferten Ziegler et al., welche in murinen neuralen Progenitorzellen beobachtet haben, dass IGF-2 die Stammzellcharakteristika und das Migrationspotenzial dieser Vorläuferzellen *in vivo* erhält<sup>144</sup>. Daher wäre es möglich, dass IGF-1 hauptsächlich pro-proliferative und IGF-2 pro-migratorische Impulse vermitteln und somit beide Liganden unterschiedliche Effekte aufweisen. Ein weiteres Indiz für diese These könnten die Ergebnisse der intrazellulären Signalkaskade in GS-12-Zellen liefern, weil sich dort zeigte, dass IGF-1 eine stärkere Phosphorylierung des IGF-1R und der nachgeschalteten Proteinkinasen verursachte als IGF-2. Die These, dass IGF-2 den Wachstumsfaktor EGF substituieren kann<sup>166</sup>, konnte in Medium mit superphysiologischem Insulingehalt nicht bestätigt werden. Eine mögliche Substituierung konnte nur in Medium mit niedrigem Insulingehalt beobachtet werden, weil im Gegensatz zu hohen Insulinkonzentrationen vermutlich keine kompetitive Hemmung des Rezeptors stattfindet. In einer Veröffentlichung von Hsieh et al. konnte die Substitution durch die IGF-1R-Liganden in insulinhaltigem Medium ebenfalls nicht reproduziert werden<sup>186</sup>. Die Autoren schließen daraus, dass IGF-1 zwar wichtige mitogene und anti-apoptotische Signale vermitteln kann, jedoch kein Faktor sei, welcher Stammzellcharakteristika *in vitro* erhalten könne. Wiederum eine andere Publikation zeigte, dass stammzellähnliche Glioblastomzellen sogar ohne jegliche Wachstumsfaktoren wie EGF oder FGF2 in serumfreiem Medium Neurosphären bilden und sich selbst erneuern können<sup>197</sup>. Auch diese Zellen waren in der Lage Tumore in immunkompromittierten Mäusen zu bilden. EGF und FGF2 erhöhten die Anzahl und die Größe der Neurosphären, waren jedoch nicht unbedingt notwendig für deren Kultivierung. Diese unterschiedlichen Daten deuten auf die hohe Heterogenität von Primärzellkulturen und den Einfluss unterschiedlicher Kulturbedingungen auf stammzellähnliche Tumorzellen hin.

Obwohl die hier beschriebenen Beobachtungen lediglich rein morphologisch waren, wurde anhand dieser neurosphärisch wachsenden Primärzellen gezeigt, dass eine super-

physiologische Insulinkonzentration die Effekte der IGF-1R-Liganden maskieren kann. Unter der Voraussetzung eines niedrigen Insulingehalts könnten die IGF-1R-Liganden EGF als Wachstumsfaktor für Neurosphären ersetzen, jedoch scheint EGF der potentere Wachstumsfaktor zu sein. Aufgrund der Unterschiede in der Literatur sind weitere Expressionsanalysen von Stammzell-assoziierten Transkriptionsfaktoren sowie funktionelle Untersuchungen notwendig, um ein genaueres Bild über die IGF- und EGF-Abhängigkeit der Primärzellen zu erhalten.

#### 4.7. Fazit

Die vorliegende Arbeit zeigt mit der Blockierung des IGF-1R durch direkte intrazerebrale Applikation des Antikörper IMC-A12 einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz für die Behandlung von Glioblastomen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Antikörper-vermittelte Inhibition des IGF-1R das Wachstum von Glioblastomzellen mit Stammzeleigenschaften sowie die Tumorangio-genese verringern kann. Analog zu den Expressionsmustern in den Mausmodellen wurden in humanem Glioblastomgewebe ebenfalls Tumorzellen und Blutgefäßendothelzellen mit hoher IGF-1R-Expression detektiert. Darüber hinaus deutet das Ergebnis des humanen Gewebemikroarrays sowie der REMBRANDT Datenbankanalyse, die eine Korrelation einer hohen IGF-1R-Expression mit einer verkürzten Überlebenswahrscheinlichkeit zeigen, darauf hin, dass eine Behandlung mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper IMC-A12 (Cixutumumab) einen klinisch relevanten Mehrwert für die Behandlung von Glioblastomen haben könnte. Die hier beobachtete duale Wirkung von IMC-A12 auf die Tumor- und Endothelzellen kann therapeutisch von großem Nutzen sein, weil die Behandlung eines einzigen Aspekts des Tumorwachstums, wie z.B. der Blutgefäßneubildung, durch Ausübung eines selektiven Drucks eine phänotypische Veränderung der Tumorzellen hervorrufen kann. Dies zeigten unter anderem Keunen et al., als sie Mäuse mit orthotopen Glioblastomen mit dem gegen VEGF gerichteten Antikörper Bevacizumab behandelten und neben der zu erwartenden Reduktion der Blutgefäßdichte einen erheblichen Anstieg der Tumorinvasion beobachteten<sup>198</sup>.

Die Überwindung der Bluthirnschranke und effiziente Wirkstoffdistribution sind bei Hirntumoren wichtige Voraussetzungen für die Wirkung von Antikörpern und anderen therapeutischen Agenzien. Für Substanzen mit hohem Molekulargewicht, wie z.B. Antikörpern, kann die lokale Konvektionstherapie zu einer hohen intrazerebralen und intratumoralen Distribution des Arzneimittels führen<sup>199</sup>. Mit einer höheren Wirkstoffdistribution könnten auch diffus invasive Tumorzellen, die distal vom Tumorkern ein potentiell es Rezidivierungsrisiko darstellen, effizienter behandelt werden.

## 5. Anhang

### 5.1. Zusammenfassung

Glioblastome sind hoch maligne Hirntumore, die ein schnelles Wachstum, eine hohe intrazerebrale Invasivität und Chemo- sowie Radioresistenzen aufweisen. Ein wichtiges Behandlungsziel besteht darin, die Proliferation und Migration von stammzellähnlichen Glioblastomzellen zu verhindern, die im Verdacht stehen für die Rezidivierung nach Chemo- und Radiotherapie verantwortlich zu sein. Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren, IGF-1 und IGF-2, wirken in vielen Tumorentitäten wachstumsfördernd. Auch bei Glioblastomen ist eine erhöhte Expression des IGF-1-Rezeptors (IGF-1R) mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert verglichen mit Glioblastomen mit niedriger IGF-1R-Expression. In dieser Arbeit wurde die Wirkung des spezifisch gegen den IGF-1R gerichteten monoklonalen Antikörpers IMC-A12 auf das Wachstum von Glioblastomzellen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Für die Applikation des Antikörpers wurde die Konvektionstherapie verwendet, bei der das Therapeutikum konstant über eine implantierte Pumpe mittels Katheter direkt lokal in das betroffene Gewebe appliziert wird. Die Blockierung des IGF-1R verringerte das Tumorwachstum in zwei murinen Glioblastom-Xenograftmodellen signifikant um 74 und 50 %. Die *in vitro* adhärent wachsende humane Glioblastomzelllinie U87 bildete *in vivo* hoch proliferative non-invasive Tumore, welche sehr auf Angiogenese innerhalb des Tumors angewiesen waren. Die humane Glioblastomzelllinie GS-12, welche *in vitro* non-adhärent wächst, bildete hingegen *in vivo* hoch invasive und diffus wachsende Tumore. Im Gegensatz zur U87-Linie haben GS-Zellen die Fähigkeit zur multilinealen Differenzierung in Zellen mit neuronalem und glialem Phänotyp und exprimieren Markerproteine von neuronalen Stammzellen wie z.B. CD133, Nestin und Sox2. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die Blockierung des IGF-1R in den non-invasiven U87-Tumoren die Blutgefäßdichte verringerte und in dem invasiven GS-12-Tumormodell die Proliferation der Glioblastomzellen reduzierte. Analysen in humanen Tumorgewebeproben bestätigten, dass sowohl Glioblastomzellen als auch die Endothelzellen der Blutgefäße den IGF-1R exprimieren. Ein humaner Gewebemikroarray zeigte, dass eine hohe Expression des IGF-1R mit einer niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit korrelierte. Durchflusszytometrische Analysen von verschiedenen Glioblastomzelllinien ergaben, dass alle analysierten GS-Zelllinien eine hohe Dichte des IGF-1R aufwiesen, wohingegen die adhärent wachsenden Glioblastomzelllinien nur wenig oder keinen IGF-1R exprimierten. In zusätzlichen Untersuchungen von U87- und GS-12-Zellen auf RNA- und Proteinebene wurde beobachtet, dass keine der beiden Zelllinien IGF-1 oder IGF-2 exprimierte. Die Wirkung der IGF-1R-Liganden und des Antikörpers wurde anschließend in funktionellen

*in vitro* Untersuchungen in Bezug auf Proliferation, Migration und Apoptose analysiert. Die Blockierung des IGF-1R reduzierte die Migration von U87-Zellen nur minimal, wohingegen bei den GS-12-Zellen die IGF-induzierte Stimulation von Proliferation und Migration dosisabhängig durch IMC-A12 inhibiert wurde. Außerdem erhöhte eine hohe Dosis des Antikörpers die Anzahl apoptotischer GS-12-Zellen. In einer Untersuchung der wichtigsten Signaltransduktionswege des IGF-1-Signalwegs in GS-12-Zellen wurde beobachtet, dass die Blockierung des IGF-1R die Phosphorylierung der zentralen Proteinkinasen AKT und ERK reduzierte. *In vitro* Untersuchungen an zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen zeigten, dass eine Subpopulation den IGF-1R stark exprimierte und dass IMC-A12 dosisabhängig die IGF-induzierte Stimulation der Proliferation inhibierte. In morphologischen Untersuchungen von humanen Glioblastom-Primärzellen, welche in serumfreien Medium Neurosphären bildeten, wurde beobachtet, dass IGF-1 und -2 den wichtigen Wachstumsfaktor EGF ersetzen können, vorausgesetzt der Insulingehalt entspricht einer physiologischen Konzentration.

Schlussfolgernd zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Blockierung des IGF-1R das Wachstum von Glioblastomen *in vivo* und *in vitro* reduziert. Der monoklonale Antikörper IMC-A12 inhibierte sowohl direkt die Proliferation von stammzellähnlichen Glioblastomzellen als auch indirekt die Angiogenese in soliden Tumoren. Aufgrund der Korrelation des IGF-1R mit der Überlebenswahrscheinlichkeit von Glioblastompatienten kann die Blockierung des IGF-1R mittels Konvektionstherapie eine neue zusätzliche Therapieoption für die Behandlung von Glioblastomen sein.



## 5.2. Abstract

Glioblastomas are brain tumors of highest malignancy which are characterized by high proliferation, intracerebral invasiveness, chemo- and radioresistance. An important therapeutic concept is to inhibit the proliferation and migration of glioma stem-like cells which are supposed to be responsible for regrowth of glioblastomas after chemo- and radiotherapy. Insulin-like growth factor-1 and -2 (IGF-1, IGF-2) enhance proliferation in a variety of tumor entities. In glioblastomas, overexpression of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) is associated with a significant worse prognosis compared to tumors with low IGF-1R expression. In this thesis, the effect of the monoclonal anti-IGF-1R antibody IMC-A12 on glioblastoma growth was investigated *in vivo* and *in vitro*. The antibody was administered via convection-enhanced delivery which comprises implantation of drug reservoirs and catheters for constant direct local delivery of the antibody. The blockade of the IGF-1R significantly reduced glioblastoma growth by 74 % and 50 % in two different xenograft mouse models. The human glioblastoma cell line U87 which grows adherently *in vitro* induced highly proliferative non-invasive solid tumors which displayed prominent angiogenesis *in vivo*. The glioma stem-like cell line GS-12 induced highly invasive and diffuse tumors without angiogenic activity *in vivo*. Immunohistochemical analyses showed that IGF-1R blockade reduced blood vessel density in the non-invasive U87 tumors and proliferation of tumor cells in the invasive GS-12 xenografts. Analyses in human glioblastoma tissue samples verified that both tumor cells and endothelial cells expressed IGF-1R. Furthermore, a human glioblastoma tissue microarray showed that a high expression of IGF-1R correlated with a shorter patient survival. Flow cytometric analyses revealed that glioblastoma stem-like cell lines generally expressed high amounts of IGF-1R in contrast to adherently grown glioblastoma cell lines such as U87. Additional analyses of U87 and GS-12 at the mRNA and protein level showed that both cell lines neither expressed IGF-1 nor IGF-2. The effects of the IGF-1R ligands and of IMC-A12 on proliferation, migration and cell death were analyzed in functional *in vitro* assays. Inhibition of IGF-1R caused only a weak reduction of migration in U87 cells while IMC-A12 dose-dependently suppressed the IGF-induced stimulation of proliferation and migration in GS-12 cells. In addition, a high dose of the antibody significantly increased the percentage of apoptotic GS-12 cells. Furthermore, blockade of IGF-1R reduced phosphorylation of the central protein kinases AKT and ERK in GS-12 cells. *In vitro* analyses of cerebral microvascular endothelial cells showed that a subpopulation of cells expressed high amounts of IGF-1R and that IMC-A12 dose-dependently inhibited the IGF-induced stimulation of proliferation. In isolated human glioblastoma primary cells which were cultured in serum-free medium to induce neurosphere growth, morphologic analyses

showed that IGF-1 and -2 were able to substitute the essential growth factor EGF at physiological concentrations of insulin.

In conclusion, this thesis shows that blockade of IGF-1R reduced glioblastoma growth *in vivo* and *in vitro*. The monoclonal antibody IMC-A12 exhibited direct effects on tumor cells and indirect anti-angiogenic effects. Given that IGF-1R expression correlates with survival of glioblastoma patients, blocking the IGF-1R via convection-enhanced delivery might be a useful therapeutic tool for treatment of glioblastoma.

## 5.3. Abkürzungen

|                               |                                                                        |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| % (w/v)                       | - Prozent auf das Gewicht bezogen                                      |
| AKT                           | - zentrale Proteinkinase des AKT-Signalwegs                            |
| ATP                           | - Adenosintriphosphat                                                  |
| BRAF                          | - Proteinkinase aus der Familie der Raf-Proteine, MAP3K                |
| BSA                           | - Rinderserumalbumin                                                   |
| CD34                          | - Markerprotein für Endothelzellen                                     |
| cDNA                          | - komplementäre Desoxyribonukleinsäure                                 |
| CMEC                          | - zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen                              |
| CO <sub>2</sub>               | - Kohlenstoffdioxid                                                    |
| DAPI                          | - 4',6'-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid                           |
| ddH <sub>2</sub> O            | - doppelt destilliertes Wasser                                         |
| DMEM                          | - Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium                                 |
| DMSO                          | - Dimethylsulfoxid                                                     |
| DNA                           | - Desoxyribonukleinsäure                                               |
| dNTP                          | - Desoxyribonukleosidtriphosphat                                       |
| DTT                           | - Dithiothreitol                                                       |
| ECGS                          | - Endothelialer Zellwachstumsfaktor                                    |
| EDTA                          | - Ethylendiamintetraessigsäure                                         |
| EGF                           | - Epidermaler Wachstumsfaktor                                          |
| EGFR                          | - Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor                                 |
| ERK                           | - Proteinkinase aus der Familie der Erk-Proteine, MAPK                 |
| FACS                          | - Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung                                |
| FAM                           | - 6-Carboxyfluorescein, Fluoreszenzfarbstoff für qPCR                  |
| FCS                           | - Foetales Kälberserum                                                 |
| FDA                           | - US-amerikanische Arzneimittelbehörde, „Food and Drug Administration“ |
| FGF                           | - Fibroblastischer Wachstumsfaktor                                     |
| FITC                          | - Fluoresceinisothiocyanat                                             |
| FRET                          | - Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer                                  |
| FSC                           | - Vorwärtsstreulicht                                                   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | - Wasserstoffperoxid                                                   |
| HBSS                          | - Hanks gewichtete Salzlösung                                          |
| HCl <sub>(aq)</sub>           | - Salzsäure                                                            |
| HIF                           | - Hypoxie-induzierter Faktor                                           |
| hpf                           | - high power fields                                                    |
| HRP                           | - Meerrettichperoxidase                                                |
| H&E                           | - Hämatoxylin und Eosin                                                |
| IDH                           | - Isocitratdehydrogenase                                               |
| IGF                           | - Insulinähnlicher Wachstumsfaktor                                     |
| IGF-1R                        | - Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 Rezeptor                          |
| IGFBP                         | - Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-Bindungsproteine                    |
| IgG                           | - Immunglobulin G                                                      |
| IMC-A12                       | - Monoklonaler IGF-1R-Antikörper (ImClone Systems Inc.)                |
| INS                           | - Insulin                                                              |

|          |                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------|
| IRS      | - Insulinrezeptorsubstrat                                |
| IHC-P    | - Paraffin-eingebettete Immunhistochemie                 |
| IR       | - Insulinrezeptor                                        |
| kDa      | - Kilodalton                                             |
| Ki-67    | - Markerprotein sich teilender Zellen                    |
| MAPK     | - Mitogen-aktivierte Proteinkinase                       |
| MEK      | - Proteinkinase des MAPK-Signalwegs, MAP2K               |
| MGMT     | - O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase     |
| MMP      | - Matrix-Metalloproteinase                               |
| mRNA     | - messenger Ribonukleinsäure                             |
| mTOR     | - Proteinkinase, am AKT-Signalweg beteiligt              |
| NaCl     | - Natriumchlorid                                         |
| NBM      | - Neurobasalmedium                                       |
| PBS      | - Phosphat-gepufferte Salzlösung                         |
| PCR      | - Polymerasekettenreaktion                               |
| PFA      | - Paraformaldehyd                                        |
| PI       | - Propidiumiodid                                         |
| PI3K     | - Phosphoinositid-3-Kinase                               |
| PPP      | - Picropodophyllin                                       |
| PS       | - Phosphatidylserin                                      |
| PTEN     | - Transkriptionsfaktor, „Phosphatase und Tensin Homolog“ |
| PVDF     | - Polyvinylidenfluorid                                   |
| qPCR     | - quantitative PCR                                       |
| Raf      | - Proteinkinase aus der Familie der Raf-Proteine, MAP3K  |
| Ras      | - G-Protein des MAPK-Signalwegs                          |
| rec      | - rekombinant                                            |
| RNA      | - Ribonukleinsäure                                       |
| rpm      | - Umdrehungen pro Minute                                 |
| RT       | - Raumtemperatur                                         |
| SDS      | - Natriumlaurylsulphat                                   |
| SDS-PAGE | - Natriumlaurylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| SSC      | - Seitwärtsstreulicht                                    |
| TBST     | - Tris-gepufferte Salzlösung mit Triton                  |
| TMZ      | - Temozolomid                                            |
| TTP      | - Tris-Triton-Puffer                                     |
| U        | - Units (dt. Einheiten)                                  |
| V        | - Volt                                                   |
| Vd       | - Volumendistribution                                    |
| VEGF     | - Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor               |
| VEGFR    | - Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor      |
| WB       | - Western Blot                                           |
| WHO      | - Weltgesundheitsorganisation                            |
| ZNS      | - Zentrales Nervensystem                                 |

## 5.4. Literaturverzeichnis

- 1 International Agency for Research on Cancer, *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*.  
<[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)> (2015).
- 2 *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin, 2013.
- 3 Ostrom, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro-oncology* **16 Suppl 4**, iv1-63 (2014).
- 4 *Neuroscience*. 4. Ausgabe, Purves, D. et al., Sunderland, 2008.
- 5 Radner, H., Blumcke, I., Reifenberger, G. & Wiestler, O. D. [The new WHO classification of tumors of the nervous system 2000. Pathology and genetics]. *Der Pathologe* **23**, 260-283 (2002).
- 6 *Neuroonkologie*. 2. Ausgabe, Schlegel, U., Weller, M. & Westphal, M., Stuttgart, 2003.
- 7 Ohgaki, H. & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* **109**, 93-108 (2005).
- 8 Louis, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**, 97-109 (2007).
- 9 *Oncology of CNS tumors*. 2. Ausgabe, Tonn, J. C., Westphal, M. & Rutka, J. T., Heidelberg, 2010.
- 10 Stupp, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet. Oncology* **10**, 459-466 (2009).
- 11 Ohgaki, H. & Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 764-772 (2013).
- 12 Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science* **100**, 2235-2241 (2009).
- 13 Hegi, M. E. & Stupp, R. Neuro-oncology: in search of molecular markers of glioma in elderly patients. *Nature reviews. Neurology* **9**, 424-425 (2013).
- 14 Libermann, T. A. et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* **313**, 144-147 (1985).
- 15 Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D. & Collins, V. P. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4309-4313 (1992).
- 16 Wong, A. J. 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* **89**, 2965-2969 (1992).
- 17 Huang, H. S. 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* **272**, 2927-2935 (1997).
- 18 Duerr, E. M. et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* **16**, 2259-2264 (1998).
- 19 Tohma, Y. et al. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **57**, 684-689 (1998).

- 20 Parsons, D. W. *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807-1812 (2008).
- 21 Ichimura, K. *et al.* IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-oncology* **11**, 341-347 (2009).
- 22 Yan, H. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine* **360**, 765-773 (2009).
- 23 Gupta, K. & Salunke, P. Molecular markers of glioma: an update on recent progress and perspectives. *Journal of cancer research and clinical oncology* **138**, 1971-1981 (2012).
- 24 Watanabe, K. *et al.* Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **3**, 523-530 (1997).
- 25 Ohgaki, H. *et al.* Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research* **64**, 6892-6899 (2004).
- 26 Jones, D. T. *et al.* Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* **28**, 2119-2123 (2009).
- 27 Jones, D. T. *et al.* Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer research* **68**, 8673-8677 (2008).
- 28 Ichimura, K., Schmidt, E. E., Miyakawa, A., Goike, H. M. & Collins, V. P. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes, chromosomes & cancer* **22**, 9-15 (1998).
- 29 Fujisawa, H. *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* **80**, 65-72 (2000).
- 30 Tran, B. & Rosenthal, M. A. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **17**, 417-421 (2010).
- 31 Lacroix, M. *et al.* A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery* **95**, 190-198 (2001).
- 32 Walker, M. D. *et al.* Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *Journal of neurosurgery* **49**, 333-343 (1978).
- 33 Laperriere, N., Zuraw, L., Cairncross, G. & Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site, G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **64**, 259-273 (2002).
- 34 Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 987-996 (2005).
- 35 Friedman, H. S. *et al.* DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **16**, 3851-3857 (1998).
- 36 Hegi, M. E. *et al.* Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 1871-1874 (2004).
- 37 Reardon, D. A. *et al.* Immunotherapy advances for glioblastoma. *Neuro-oncology* **16**, 1441-1458 (2014).
- 38 Gerstner, E. R. & Batchelor, T. T. Antiangiogenic therapy for glioblastoma. *Cancer journal* **18**, 45-50 (2012).

- 39 Schmidt, N. O. *et al.* Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **84**, 10-18 (1999).
- 40 Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A. & Risau, W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **359**, 845-848 (1992).
- 41 Mason, W. P. Emerging drugs for malignant glioma. *Expert opinion on emerging drugs* **13**, 81-94 (2008).
- 42 Kunkel, P. *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* **61**, 6624-6628 (2001).
- 43 Paez-Ribes, M. *et al.* Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer cell* **15**, 220-231 (2009).
- 44 Chinot, O. L. *et al.* Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* **370**, 709-722 (2014).
- 45 Gilbert, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England journal of medicine* **370**, 699-708 (2014).
- 46 Brandes, A. A., Franceschi, E., Tosoni, A., Hegi, M. E. & Stupp, R. Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**, 957-960 (2008).
- 47 Westphal, M. *et al.* A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *European journal of cancer* **51**, 522-532 (2015).
- 48 Sampson, J. H. *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* **28**, 4722-4729 (2010).
- 49 Mellinghoff, I. K. *et al.* Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *The New England journal of medicine* **353**, 2012-2024 (2005).
- 50 Lassmann, A. B. & Gilbert, M. R. Response of Glioblastomas to EGFR Kinase Inhibitors. *New England Journal of Medicine* **354**, 525-526 (2006).
- 51 Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G. & von Deimling, A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* (2015).
- 52 Ullrich, A. *et al.* Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal* **5**, 2503-2512 (1986).
- 53 Pollak, M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer* **12**, 159-169 (2012).
- 54 Pandini, G. *et al.* Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *The Journal of biological chemistry* **277**, 39684-39695 (2002).
- 55 Sepp-Lorenzino, L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat* **47**, 235-253 (1998).
- 56 Siddle, K. *et al.* Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* **29**, 513-525 (2001).
- 57 Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L. & Vigneri, R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* **30**, 586-623 (2009).
- 58 Furstenberger, G. & Senn, H. J. Insulin-like growth factors and cancer. *The Lancet. Oncology* **3**, 298-302 (2002).
- 59 Christoforidis, A., Maniadaki, I. & Stanhope, R. Growth hormone / insulin-like growth factor-1 axis during puberty. *Pediatr Endocrinol Rev* **3**, 5-10 (2005).

- 60 Elmlinger, M. W., Kuhnel, W., Weber, M. M. & Ranke, M. B. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). *Clin Chem Lab Med* **42**, 654-664 (2004).
- 61 Gicquel, C. & Le Bouc, Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* **65 Suppl 3**, 28-33 (2006).
- 62 Baxter, R. C. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat Rev Cancer* **14**, 329-341 (2014).
- 63 Holly, J. & Perks, C. The role of insulin-like growth factor binding proteins. *Neuroendocrinology* **83**, 154-160 (2006).
- 64 Hernandez-Sanchez, C., Blakesley, V., Kalebic, T., Helman, L. & LeRoith, D. The role of the tyrosine kinase domain of the insulin-like growth factor-I receptor in intracellular signaling, cellular proliferation, and tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry* **270**, 29176-29181 (1995).
- 65 Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M. & Valentinis, B. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1332**, F105-126 (1997).
- 66 Samani, A. A., Yakar, S., LeRoith, D. & Brodt, P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* **28**, 20-47 (2007).
- 67 Gallagher, E. J., Fierz, Y., Ferguson, R. D. & LeRoith, D. The pathway from diabetes and obesity to cancer, on the route to targeted therapy. *Endocr Pract* **16**, 864-873 (2010).
- 68 Pollak, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* **8**, 915-928 (2008).
- 69 Ogawa, O. *et al.* Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* **362**, 749-751 (1993).
- 70 Ogawa, O. *et al.* Constitutional relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting associated with Wilms' tumour and gigantism. *Nature genetics* **5**, 408-412 (1993).
- 71 Cui, H. *et al.* Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* **299**, 1753-1755 (2003).
- 72 Werner, H., Karnieli, E., Rauscher, F. J. & LeRoith, D. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8318-8323 (1996).
- 73 Zhang, L. *et al.* Regulation of insulin-like growth factor II P3 promotor by p53: a potential mechanism for tumorigenesis. *Cancer research* **56**, 1367-1373 (1996).
- 74 Zhang, L. *et al.* p53 regulates human insulin-like growth factor II gene expression through active P4 promoter in rhabdomyosarcoma cells. *DNA Cell Biol* **17**, 125-131 (1998).
- 75 Zhao, H., Dupont, J., Yakar, S., Karas, M. & LeRoith, D. PTEN inhibits cell proliferation and induces apoptosis by downregulating cell surface IGF-IR expression in prostate cancer cells. *Oncogene* **23**, 786-794 (2004).
- 76 Yi, H. K. *et al.* Impact of PTEN on the expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in human gastric adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 760-767 (2005).
- 77 Frasca, F. *et al.* Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* **19**, 3278-3288 (1999).
- 78 Loeper, S. & Ezzat, S. Acromegaly: re-thinking the cancer risk. *Rev Endocr Metab Disord* **9**, 41-58 (2008).
- 79 Steuerman, R., Shevah, O. & Laron, Z. Congenital IGF1 deficiency tends to confer protection against post-natal development of malignancies. *Eur J Endocrinol* **164**, 485-489 (2011).



- 80 Guevara-Aguirre, J. *et al.* Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. *Sci Transl Med* **3**, 70ra13 (2011).
- 81 Hankinson, S. E. *et al.* Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* **351**, 1393-1396 (1998).
- 82 Chan, J. M. *et al.* Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* **279**, 563-566 (1998).
- 83 Yu, H. *et al.* Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *J Natl Cancer Inst* **91**, 151-156 (1999).
- 84 Ma, J. *et al.* Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* **91**, 620-625 (1999).
- 85 Shimizu, C. *et al.* Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. *Hum Pathol* **35**, 1537-1542 (2004).
- 86 Ueda, S. *et al.* Alternative tyrosine phosphorylation of signaling kinases according to hormone receptor status in breast cancer overexpressing the insulin-like growth factor receptor type 1. *Cancer science* **97**, 597-604 (2006).
- 87 Figueroa, J. A., De Raad, S., Speights, V. O. & Rinehart, J. J. Gene expression of insulin-like growth factors and receptors in neoplastic prostate tissues: correlation with clinico-pathological parameters. *Cancer Invest* **19**, 28-34 (2001).
- 88 Hellawell, G. O. *et al.* Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer research* **62**, 2942-2950 (2002).
- 89 Seccareccia, E. & Brodt, P. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update. *Growth Horm IGF Res* **22**, 193-199 (2012).
- 90 Poulaki, V. *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I in thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5392-5398 (2003).
- 91 Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Ferrara, N. & Donner, D. B. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *The Journal of biological chemistry* **271**, 29483-29488 (1996).
- 92 Stoeltzing, O. *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. *The American journal of pathology* **163**, 1001-1011 (2003).
- 93 Zelzer, E. *et al.* Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ /ARNT. *The EMBO journal* **17**, 5085-5094 (1998).
- 94 Feldser, D. *et al.* Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer research* **59**, 3915-3918 (1999).
- 95 Moromisato, D. Y., Moromisato, M. Y., Zanonato, S. & Roberts, C. T., Jr. Effect of hypoxia on lung, heart, and liver insulin-like growth factor-I gene and receptor expression in the newborn rat. *Crit Care Med* **24**, 919-924 (1996).
- 96 Kim, K. W. *et al.* Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer research* **58**, 348-351 (1998).
- 97 Peretz, S., Kim, C., Rockwell, S., Baserga, R. & Glazer, P. M. IGF1 receptor expression protects against microenvironmental stress found in the solid tumor. *Radiat Res* **158**, 174-180 (2002).
- 98 Nakao-Hayashi, J., Ito, H., Kanayasu, T., Morita, I. & Murota, S. Stimulatory effects of insulin and insulin-like growth factor I on migration and tube formation by vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **92**, 141-149 (1992).
- 99 Shigematsu, S. *et al.* IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J* **46 Suppl**, S59-62 (1999).
- 100 Pieciewicz, S. M. *et al.* Insulin-like growth factors promote vasculogenesis in embryonic stem cells. *PLoS One* **7**, e32191 (2012).

- 101 Bar, R. S. & Boes, M. Distinct receptors for IGF-I, IGF-II, and insulin are present on bovine capillary endothelial cells and large vessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **124**, 203-209 (1984).
- 102 Kern, P. A., Svoboda, M. E., Eckel, R. H. & Van Wyk, J. J. Insulinlike growth factor action and production in adipocytes and endothelial cells from human adipose tissue. *Diabetes* **38**, 710-717 (1989).
- 103 Grzmil, M., Hemmerlein, B., Thelen, P., Schweyer, S. & Burfeind, P. Blockade of the type I IGF receptor expression in human prostate cancer cells inhibits proliferation and invasion, up-regulates IGF binding protein-3, and suppresses MMP-2 expression. *J Pathol* **202**, 50-59 (2004).
- 104 Yoon, A. & Hurta, R. A. Insulin like growth factor-1 selectively regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 in malignant H-ras transformed cells. *Mol Cell Biochem* **223**, 1-6 (2001).
- 105 Mira, E., Manes, S., Lacalle, R. A., Marquez, G. & Martinez, A. C. Insulin-like growth factor I-triggered cell migration and invasion are mediated by matrix metalloproteinase-9. *Endocrinology* **140**, 1657-1664 (1999).
- 106 Alison, M. R., Lin, W. R., Lim, S. M. & Nicholson, L. J. Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev* **38**, 589-598 (2012).
- 107 Bendall, S. C. *et al.* IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* **448**, 1015-1021 (2007).
- 108 Gustafsson, M. V. *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* **9**, 617-628 (2005).
- 109 Elias, S. *et al.* Notch-1 stimulates survival of lung adenocarcinoma cells during hypoxia by activating the IGF-1R pathway. *Oncogene* **29**, 2488-2498 (2010).
- 110 Hart, L. S. *et al.* Human colon cancer stem cells are enriched by insulin-like growth factor-1 and are sensitive to figitumumab. *Cell Cycle* **10**, 2331-2338 (2011).
- 111 Bodzin, A. S., Wei, Z., Hurtt, R., Gu, T. & Doria, C. Gefitinib resistance in HCC mahlavu cells: upregulation of CD133 expression, activation of IGF-1R signaling pathway, and enhancement of IGF-1R nuclear translocation. *J Cell Physiol* **227**, 2947-2952 (2012).
- 112 Malaguarnera, R. *et al.* Insulin receptor isoforms and insulin-like growth factor receptor in human follicular cell precursors from papillary thyroid cancer and normal thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 766-774 (2011).
- 113 Takahashi, K. & Suzuki, K. Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **55**, 453-458 (1993).
- 114 Gooch, J. L., Van Den Berg, C. L. & Yee, D. Insulin-like growth factor (IGF)-I rescues breast cancer cells from chemotherapy-induced cell death--proliferative and anti-apoptotic effects. *Breast Cancer Res Treat* **56**, 1-10 (1999).
- 115 Criswell, T. *et al.* Delayed activation of insulin-like growth factor-1 receptor/Src/MAPK/Egr-1 signaling regulates clusterin expression, a pro-survival factor. *The Journal of biological chemistry* **280**, 14212-14221 (2005).
- 116 Chitnis, M. M. *et al.* IGF-1R inhibition enhances radiosensitivity and delays double-strand break repair by both non-homologous end-joining and homologous recombination. *Oncogene* **33**, 5262-5273 (2014).
- 117 Rotwein, P., Burgess, S. K., Milbrandt, J. D. & Krause, J. E. Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 265-269 (1988).
- 118 Werther, G. A. *et al.* Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization--relationship to IGF-I receptors. *Mol Endocrinol* **4**, 773-778 (1990).
- 119 D'Ercole, A. J., Ye, P., Calikoglu, A. S. & Gutierrez-Ospina, G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol* **13**, 227-255 (1996).

- 120 Garcia-Segura, L. M., Perez, J., Pons, S., Rejas, M. T. & Torres-Aleman, I. Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res* **560**, 167-174 (1991).
- 121 Bondy, C., Werner, H., Roberts, C. T., Jr. & LeRoith, D. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* **46**, 909-923 (1992).
- 122 Baron-Van Evercooren, A., Olichon-Berthe, C., Kowalski, A., Visciano, G. & Van Obberghen, E. Expression of IGF-I and insulin receptor genes in the rat central nervous system: a developmental, regional, and cellular analysis. *Journal of neuroscience research* **28**, 244-253 (1991).
- 123 Tranque, P. A., Calle, R., Naftolin, F. & Robbins, R. Involvement of protein kinase-C in the mitogenic effect of insulin-like growth factor-I on rat astrocytes. *Endocrinology* **131**, 1948-1954 (1992).
- 124 McMorris, F. A. *et al.* Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci* **692**, 321-334 (1993).
- 125 Brooker, G. J. *et al.* Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *Journal of neuroscience research* **59**, 332-341 (2000).
- 126 Feldman, E. L., Sullivan, K. A., Kim, B. & Russell, J. W. Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiol Dis* **4**, 201-214 (1997).
- 127 Glick, R. P., Lichter, T. & Unterman, T. G. Insulin-like growth factors in central nervous system tumors. *Journal of neuro-oncology* **35**, 315-325 (1997).
- 128 Zumkeller, W. & Westphal, M. The IGF/IGFBP system in CNS malignancy. *Mol Pathol* **54**, 227-229 (2001).
- 129 Merrill, M. J. & Edwards, N. A. Insulin-like growth factor-I receptors in human glial tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **71**, 199-209 (1990).
- 130 Sandberg, A. C., Engberg, C., Lake, M., von Holst, H. & Sara, V. R. The expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II genes in the human fetal and adult brain and in glioma. *Neurosci Lett* **93**, 114-119 (1988).
- 131 Hirano, H. *et al.* Insulin-like growth factor-1 content and pattern of expression correlates with histopathologic grade in diffusely infiltrating astrocytomas. *Neuro-oncology* **1**, 109-119 (1999).
- 132 Dmitrenko, V. V. *et al.* Expression of genes belonging to the IGF-system in glial tumors. *Tsitol Genet* **45**, 41-57 (2011).
- 133 Hultberg, B. M., Haselbacher, G., Nielsen, F. C., Wulff, B. S. & Gammeltoft, S. Gene expression of insulin-like growth factor II in human intracranial meningioma. *Cancer* **72**, 3282-3286 (1993).
- 134 Friend, K. E. *et al.* Growth hormone and insulin-like growth factor-I: effects on the growth of glioma cell lines. *Growth Horm IGF Res* **11**, 84-91 (2001).
- 135 Schlenska-Lange, A., Knupfer, H., Lange, T. J., Kiess, W. & Knupfer, M. Cell proliferation and migration in glioblastoma multiforme cell lines are influenced by insulin-like growth factor I in vitro. *Anticancer Res* **28**, 1055-1060 (2008).
- 136 Brockmann, M. A. *et al.* Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. *Neurosurgery* **52**, 1391-1399; discussion 1399 (2003).
- 137 Chakravarti, A., Loeffler, J. S. & Dyson, N. J. Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer research* **62**, 200-207 (2002).
- 138 Naidu, K. A. *et al.* Antiproliferative and apoptotic effect of ascorbyl stearate in human glioblastoma multiforme cells: modulation of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) expression. *Journal of neuro-oncology* **54**, 15-22 (2001).
- 139 Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* **63**, 5821-5828 (2003).

- 140 Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).
- 141 Galli, R. *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer research* **64**, 7011-7021 (2004).
- 142 Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. & Rich, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* **29**, 1203-1217 (2015).
- 143 Lehtinen, M. K. *et al.* The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* **69**, 893-905 (2011).
- 144 Ziegler, A. N. *et al.* IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors. *Stem Cells* **30**, 1265-1276 (2012).
- 145 Osuka, S. *et al.* IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* **31**, 627-640 (2013).
- 146 Yin, S. *et al.* Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor by picropodophyllin as a treatment option for glioblastoma. *Neuro-oncology* **12**, 19-27 (2010).
- 147 Chen, H. X. & Sharon, E. IGF-1R as an anti-cancer target--trials and tribulations. *Chin J Cancer* **32**, 242-252 (2013).
- 148 Bid, H. K. *et al.* Dual targeting of the type 1 insulin-like growth factor receptor and its ligands as an effective antiangiogenic strategy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 2984-2994 (2013).
- 149 Tolcher, A. W. *et al.* Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of AMG 479, a fully human monoclonal antibody to insulin-like growth factor receptor 1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 5800-5807 (2009).
- 150 Strosberg, J. R. *et al.* A multi-institutional, phase II open-label study of ganitumab (AMG 479) in advanced carcinoid and pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrine-related cancer* **20**, 383-390 (2013).
- 151 Fuchs, C. S. *et al.* A phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ganitumab or placebo in combination with gemcitabine as first-line therapy for metastatic adenocarcinoma of the pancreas: the GAMMA trial. *Ann Oncol* **26**, 921-927 (2015).
- 152 Zha, J. & Lackner, M. R. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 2512-2517 (2010).
- 153 Karp, D. D. *et al.* Phase II study of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody CP-751,871 in combination with paclitaxel and carboplatin in previously untreated, locally advanced, or metastatic non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 2516-2522 (2009).
- 154 Retraction. "Phase II study of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody CP-751,871 in combination with paclitaxel and carboplatin in previously untreated, locally advanced, or metastatic non-small-cell lung cancer". *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 4179 (2012).
- 155 Langer, C. J. *et al.* Randomized, phase III trial of first-line figitumumab in combination with paclitaxel and carboplatin versus paclitaxel and carboplatin alone in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**, 2059-2066 (2014).
- 156 Burtrum, D. *et al.* A fully human monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor blocks ligand-dependent signaling and inhibits human tumor growth in vivo. *Cancer research* **63**, 8912-8921 (2003).
- 157 Gualberto, A. & Pollak, M. Emerging role of insulin-like growth factor receptor inhibitors in oncology: early clinical trial results and future directions. *Oncogene* **28**, 3009-3021 (2009).
- 158 Schwartz, G. K. *et al.* Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology* **14**, 371-382 (2013).

- 159 Bobo, R. H. *et al.* Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2076-2080 (1994).
- 160 Allard, E., Passirani, C. & Benoit, J. P. Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. *Biomaterials* **30**, 2302-2318 (2009).
- 161 Sampson, J. H. *et al.* Comparison of intratumoral bolus injection and convection-enhanced delivery of radiolabeled antitenascin monoclonal antibodies. *Neurosurgical focus* **20**, E14 (2006).
- 162 Pilkington, G. J. Cancer stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Prolif* **38**, 423-433 (2005).
- 163 Martens, T. *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* **14**, 5447-5458 (2008).
- 164 Meyer, G. E., Shelden, E., Kim, B. & Feldman, E. L. Insulin-like growth factor I stimulates motility in human neuroblastoma cells. *Oncogene* **20**, 7542-7550 (2001).
- 165 Honegger, A. & Humbel, R. E. Insulin-like growth factors I and II in fetal and adult bovine serum. Purification, primary structures, and immunological cross-reactivities. *The Journal of biological chemistry* **261**, 569-575 (1986).
- 166 Soroceanu, L. *et al.* Identification of IGF2 signaling through phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3 as a growth-promoting axis in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3466-3471 (2007).
- 167 Kolb, E. A. *et al.* Initial testing (stage 1) of a monoclonal antibody (SCH 717454) against the IGF-1 receptor by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* **50**, 1190-1197 (2008).
- 168 Menu, E. *et al.* Targeting the IGF-1R using picropodophyllin in the therapeutical 5T2MM mouse model of multiple myeloma: beneficial effects on tumor growth, angiogenesis, bone disease and survival. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **121**, 1857-1861 (2007).
- 169 Wang, Z. *et al.* Growth-inhibitory effects of human anti-insulin-like growth factor-I receptor antibody (A12) in an orthotopic nude mouse model of anaplastic thyroid carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 4755-4765 (2006).
- 170 Seely, B. L., Samimi, G. & Webster, N. J. Retroviral expression of a kinase-defective IGF-I receptor suppresses growth and causes apoptosis of CHO and U87 cells in-vivo. *BMC cancer* **2**, 15 (2002).
- 171 Bielen, A. *et al.* Enhanced efficacy of IGF1R inhibition in pediatric glioblastoma by combinatorial targeting of PDGFRalpha/beta. *Mol Cancer Ther* **10**, 1407-1418 (2011).
- 172 Sakariassen, P. O. *et al.* Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16466-16471 (2006).
- 173 Zhai, G. G. *et al.* Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *Journal of neuro-oncology* **76**, 227-237 (2006).
- 174 Brem, H. *et al.* Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet* **345**, 1008-1012 (1995).
- 175 Kunwar, S. *et al.* Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology* **12**, 871-881 (2010).
- 176 Bruce, J. N. *et al.* Regression of recurrent malignant gliomas with convection-enhanced delivery of topotecan. *Neurosurgery* **69**, 1272-1279; discussion 1279-1280 (2011).

- 177 Shi, Z. M. *et al.* MiRNA-181b suppresses IGF-1R and functions as a tumor suppressor gene in gliomas. *RNA* **19**, 552-560 (2013).
- 178 Wang, B. *et al.* MicroRNA-7 directly targets insulin-like growth factor 1 receptor to inhibit cellular growth and glucose metabolism in gliomas. *Diagn Pathol* **9**, 211 (2014).
- 179 Gariboldi, M. B., Ravizza, R. & Monti, E. The IGFR1 inhibitor NVP-AEW541 disrupts a pro-survival and pro-angiogenic IGF-STAT3-HIF1 pathway in human glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* **80**, 455-462 (2010).
- 180 Carson, S. D. & Pirruccello, S. J. Tissue factor and cell morphology variations in cell lines subcloned from U87-MG. *Blood Coagul Fibrinolysis* **9**, 539-547 (1998).
- 181 Lee, J. *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* **9**, 391-403 (2006).
- 182 Li, A. *et al.* Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas. *Mol Cancer Res* **6**, 21-30 (2008).
- 183 Sjogren, K. *et al.* Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7088-7092 (1999).
- 184 Attias-Geva, Z. *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) targeting with monoclonal antibody cixutumumab (IMC-A12) inhibits IGF-I action in endometrial cancer cells. *European journal of cancer* **47**, 1717-1726 (2011).
- 185 Tovar, V. *et al.* IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol* **52**, 550-559 (2010).
- 186 Hsieh, A., Ellsworth, R. & Hsieh, D. Hedgehog/GLI1 regulates IGF dependent malignant behaviors in glioma stem cells. *J Cell Physiol* **226**, 1118-1127 (2011).
- 187 Heese, O., Disko, A., Zirkel, D., Westphal, M. & Lamszus, K. Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro-oncology* **7**, 476-484 (2005).
- 188 Lamszus, K., Schmidt, N. O., Ergun, S. & Westphal, M. Isolation and culture of human neuromicrovascular endothelial cells for the study of angiogenesis in vitro. *Journal of neuroscience research* **55**, 370-381 (1999).
- 189 Guo, T. *et al.* MicroRNA-320a suppresses in GBM patients and modulates glioma cell functions by targeting IGF-1R. *Tumour Biol* **35**, 11269-11275 (2014).
- 190 Wang, X. H. *et al.* MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 181-188 (2009).
- 191 Chisalita, S. I. & Arnqvist, H. J. Insulin-like growth factor I receptors are more abundant than insulin receptors in human micro- and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E896-901 (2004).
- 192 Johansson, G. S., Chisalita, S. I. & Arnqvist, H. J. Human microvascular endothelial cells are sensitive to IGF-I but resistant to insulin at the receptor level. *Mol Cell Endocrinol* **296**, 58-63 (2008).
- 193 Chisalita, S. I., Nitert, M. D. & Arnqvist, H. J. Characterisation of receptors for IGF-I and insulin; evidence for hybrid insulin/IGF-I receptor in human coronary artery endothelial cells. *Growth Horm IGF Res* **16**, 258-266 (2006).
- 194 Wang, J. *et al.* Insulin-like growth factor-1 secreted by brain microvascular endothelial cells attenuates neuron injury upon ischemia. *FEBS J* **280**, 3658-3668 (2013).
- 195 Bid, H. K., Zhan, J., Phelps, D. A., Kurmasheva, R. T. & Houghton, P. J. Potent inhibition of angiogenesis by the IGF-1 receptor-targeting antibody SCH717454 is reversed by IGF-2. *Mol Cancer Ther* **11**, 649-659 (2012).
- 196 Strammiello, R. *et al.* Impact of IGF-I/IGF-IR circuit on the angiogenetic properties of Ewing's sarcoma cells. *Horm Metab Res* **35**, 675-684 (2003).
- 197 Kelly, J. J. *et al.* Proliferation of human glioblastoma stem cells occurs independently of exogenous mitogens. *Stem Cells* **27**, 1722-1733 (2009).

- 198 Keunen, O. *et al.* Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3749-3754 (2011).
- 199 Vogelbaum, M. A. & Aghi, M. K. Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro-oncology* **17 Suppl 2**, ii3-ii8 (2015).

## 5.5. Publikationsverzeichnis

1. Zamykal, M., Martens, T., Matschke, J., Günther, H.S., Kathagen, A., Schulte, A., Peters, R., Westphal, M., Lamszus, K. Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor involves different context-dependent mechanisms. *Neuro Oncol* **17**, 1076-85 (2015).
2. Jazwa, A., Stepniewski, J., Zamykal, M., Jagodzinska, J., Meloni, M., Emanuelli, C., Jozkowicz, A., Dulak, J. Pre-emptive hypoxia-regulated HO-1 gene therapy improves post-ischaemic limb perfusion and tissue regeneration in mice. *Cardiovasc Res* **97**, 115-24 (2013).
3. Benedito, R., Rocha, S.F., Woeste, M., Zamykal, M., Radtke, F., Casanovas, O., Duarte, A., Pytowski, B., Adams, R.H. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature* **484**, 110-114 (2012).



## 5.6. Danksagung

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

Mein Dank gilt zuerst Prof. Dr. Katrin Lamszus, Leiterin des Labors für Hirntumorbilogie, für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie die Überlassung des Themas. Ich möchte mich herzlich für die gute wissenschaftliche Betreuung und konstruktive Zusammenarbeit bedanken sowie für ihre intensive Unterstützung und Begutachtung beim Verfassen der Dissertationsschrift.

Prof. Dr. Arp Schnittger am Biozentrum Klein Flottbek danke ich für die Übernahme der weiteren Begutachtung der Dissertation.

Prof. Dr. Manfred Westphal, Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie am Uniklinikum Hamburg-Eppendorf, danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik zu promovieren und für die fortwährende Förderung meiner Arbeit.

Dr. Alexander Schulte und Dr. Annegret Kathagen-Buhmann danke ich herzlich für die umfassende wissenschaftliche und methodische Unterstützung während meiner Arbeit. Insbesondere möchte ich mich auch für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und ihre motivierende Arbeitsatmosphäre herzlich bedanken.

Ein großer Dank gilt Svenja Zapf, Regina Peters, Katharina Kolbe und Mareike Holz, die mit ihren methodischen und technischen Hilfestellungen wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Ohne ihre Tatkraft und Hilfsbereitschaft wäre ein so effektives und harmonisches Arbeiten im Labor sicher nicht möglich gewesen.

PD Dr. Tobias Martens danke ich für die Durchführung der tierexperimentellen Versuche.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Instituten des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, die an meiner Arbeit mitgewirkt haben. Jakob Matschke vom Institut für Neuropathologie danke ich für die Erstellung des Gliom-Gewebemikroarrays. Den Mitarbeiterinnen der FACS Core Facility danke ich für die Hilfe bei den durchflusszytometrischen Analysen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Dr. Katrin Liffers, Dr. Cecile Maire und Dr. Malte Mohme für den wissenschaftlichen Austausch, interessante Diskussionen und die freundschaftliche und entspannte Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz großer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Frau, die mich in meinem Vorhaben ermutigt haben und mir in allen Lebenslagen unterstützend zur Seite standen. Ohne ihren seelischen Beistand hätte ich manchen Tiefpunkt nicht so einfach überwunden. Auch meinen Freunden möchte ich für ihre fortwährende Ermutigung und Unterstützung danken.

### 5.7. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 27.06.2016

Martin Jan Zamykal