

**„Bedeutung von EGFR und HER2 in Glioblastomen und Weichteilsarkomen-
Tumorbiologische und prognostische Untersuchungen“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
- Biowissenschaften -
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Diplom-Biologen Henri Wichmann
geboren am 11. April 1981 in Osterburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. habil. G. Moritz
 2. Prof. Dr. med. D. Vordermark
 3. Prof. Dr. rer. nat. H. Taubert

Promotionsgesuch eingereicht am: 08. September 2015

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22. Februar 2016

Meiner

Familie

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Tumorbiologie	1
1.2 Glioblastome	1
1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie, Therapie und Prognose	1
1.2.2 Klassifikation	3
1.3 Weichteilsarkome.....	6
1.4 Radiotherapie.....	8
1.5 Die ErbB Rezeptorfamilie	10
1.5.1 Aufbau der ErbB-Rezeptoren.....	10
1.5.2 Die Liganden der ErbB-Rezeptoren	11
1.5.3 Dimerisierung und Aktivierung von ErbB-Rezeptoren	12
1.5.4 Transaktivierung	13
1.5.5 Die Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren.....	14
1.5.5.1 PI3K/AKT-Signalweg	15
1.5.5.2 MAPK-ERK1/2-Signalweg.....	16
1.5.5.3 PLC γ -Signalweg.....	16
1.5.5.4 Nukleäre Signaltransduktion	17
1.5.6 Endozytose und Degradation der ErbB-Rezeptoren.....	18
1.5.7 Der ErbB-Rezeptor EGFR.....	18
1.5.8 Der ErbB-Rezeptor HER2	20
1.6 Zielstellung	21
2 Material	23
2.1 Zelllinien	23
2.2 Patientengut.....	23
2.3 Chemikalien und Reagenzien	24
2.4 Kits und Enzyme	26
2.5 Oligonukleotide und siRNA	27
2.6 Antikörper	28
2.7 Puffer, Medien und Lösungen.....	28
2.7.1 Zellkultivierung	28
2.7.2 Klonierung.....	28
2.7.3 Proteinisolation	29
2.7.4 Western Blot.....	29

2.7.5	Gelelektrophorese	30
2.7.6	Zellzyklusanalyse.....	30
2.8	Geräte und Verbrauchsmittel.....	30
3	Methoden	33
3.1	Zellkultivierung.....	33
3.1.1	Zellzahlbestimmung.....	33
3.1.2	Test auf Infektion mit Mykoplasmen.....	34
3.2	Inhibierung bzw. Reduktion der Genexpression von <i>EGFR</i> und <i>HER2</i>	34
3.2.1	Transfektion von siRNAs mittels INTERFERin™	34
3.2.2	Inhibierung von EGFR und HER2 mittels therapeutischer Antikörper	35
3.3	Bestrahlung	35
3.4	Zellkoloniebildungstest	35
3.5	Vitalitätstest	36
3.6	Apoptoseanalyse	36
3.6.1	Quantifizierung der Apoptose mittels DAPI-Färbung.....	36
3.6.2	Caspase-Glo® 3/7 Assay.....	37
3.7	Analyse des mRNA-Gehalts ausgewählter Gene.....	37
3.7.1	Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....	37
3.7.2	Isolation von Gesamt-RNA aus Tumormaterial	37
3.7.3	Reinigung von Gesamt-RNA nach Trizol-Isolation	38
3.7.4	RNA-Quantifizierung.....	38
3.7.5	cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase	38
3.7.6	qPCR mittels QuantiTect SYBR Green PCR Kit	39
3.7.7	Herstellung von Plasmid Standards zur absoluten qPCR Quantifizierung.....	40
3.7.7.1	Amplifikation von cDNA Fragmenten.....	40
3.7.7.2	Agarosegelelektrophorese	41
3.7.7.3	Gel-Extraktion und Aufreinigung der PCR-Produkte	41
3.7.7.4	Ligation	42
3.7.7.5	Klonierung	42
3.7.7.6	Plasmidextraktion.....	42
3.7.7.7	Sequenzierung.....	43
3.8	Spezifische Mengenanalyse von Proteinen.....	43
3.8.1	Proteinisolation aus Zellkulturen.....	43
3.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
3.8.3	Western Blot Analyse	43

3.8.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	43
3.8.3.2	Transfer	44
3.8.3.3	Immundetektion.....	44
3.8.3.4	Stripping	44
3.8.4	Quantitative uPA, uPAR und PAI-1 Protein Bestimmung aus Gesamtproteinlysat	44
3.8.5	Proteinisolation aus Tumorgewebe.....	45
3.8.5.1	Quantitative EGFR Protein Bestimmung	45
3.8.5.2	Quantitative HER2 Protein Bestimmung	45
3.9	Zellmigrationsassay	46
3.10	Zellzyklus Analyse	46
3.11	Statistik.....	46
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Bedeutung von EGFR und HER2 in Glioblastomzelllinien.....	48
4.1.1	Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den mRNA-Gehalt von ErbB-Rezeptoren.....	48
4.1.2	Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den Proteingehalt von EGFR und HER2	50
4.1.3	Einfluss von EGFR und HER2 auf den mRNA-Gehalt verschiedener ErbB-Liganden	51
4.1.4	Einfluss von EGFR und HER2 auf die Zellproliferation	53
4.1.5	Einfluss von EGFR und HER2 auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus.....	54
4.1.5.1	Einfluss von EGFR und HER2 auf den <i>Cyclin D1</i> mRNA-Gehalt.....	56
4.1.6	Einfluss von EGFR und HER2 auf die Zellmigration.....	56
4.1.6.1	Einfluss von EGFR und HER2 auf den <i>MMP2</i> und <i>MMP10</i> mRNA-Gehalt.....	57
4.1.6.2	Einfluss von EGFR und HER2 auf den uPA, uPAR bzw. PAI-1 Proteingehalt.....	58
4.1.7	Einfluss von EGFR und HER2 auf das klonogene Zellüberleben und die Radiosensitivität	60
4.1.8	Einfluss von EGFR und HER2 auf die Apoptose	64
4.1.8.1	Einfluss von EGFR und HER2 auf die Spaltung von PARP	64
4.1.8.2	Einfluss von EGFR und HER2 auf die Aktivität der Caspasen 3/7	65
4.1.8.3	Einfluss von EGFR und HER2 auf die Apoptose	65
4.1.9	Einfluss von EGFR und HER2 auf die Vitalität	66
4.2	Bedeutung von EGFR und HER2 in Glioblastomen.....	67
4.2.1	<i>EGFR</i> und <i>HER2</i> mRNA-Gehalt in primären Glioblastomen.....	67
4.2.2	Korrelation des <i>EGFR</i> bzw. <i>HER2</i> mRNA-Gehalts mit dem Überleben von Glioblastompatienten	69

4.3	Bedeutung von EGFR und HER2 in Weichteilsarkomen	71
4.3.1	mRNA-Gehalt und Proteingehalt von EGFR und HER2 in Weichteilsarkomen.....	71
4.3.2	Korrelation des mRNA-Gehalts und des Proteingehalts von EGFR bzw. HER2 mit dem Überleben von WTS-Patienten	73
5	Diskussion	75
5.1	Bedeutung von EGFR und HER2 für die Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG	75
5.1.1	Genexpression verschiedener Rezeptoren und Liganden nach Transfektion von EGFR- und HER2-spezifischer siRNAs	75
5.1.2	Einfluss der verminderten <i>EGFR</i> - und <i>HER2</i> -Genexpression auf die Proliferation und den Zellzyklus von Glioblastomzelllinien	77
5.1.3	Einfluss der verminderten <i>EGFR</i> - und <i>HER2</i> -Genexpression auf die Migration von Glioblastomzelllinien	81
5.1.4	Einfluss der verminderten <i>EGFR</i> - und <i>HER2</i> -Genexpression auf das klonogene Zellüberleben und die Radiosensitivität von Glioblastomzelllinien	84
5.1.5	Einfluss der verminderten <i>EGFR</i> - und <i>HER2</i> -Genexpression auf die Apoptose von Glioblastomzelllinien	87
5.1.6	Inhibierung von EGFR und HER2 durch therapeutische Antikörper	89
5.2	Klinische und prognostische Bedeutung von EGFR und HER2 in primären Glioblastomen und Weichteilsarkomen	92
5.2.1	Histopathologische und klinische Bedeutung von EGFR und HER2 in primären Glioblastomen.....	92
5.2.2	Histopathologische und klinische Bedeutung von EGFR und HER2 in Weichteilsarkomen.....	94
5.2.3	Prognostische Bedeutung von EGFR und HER2 in primären Glioblastomen.....	95
5.2.4	Prognostische Bedeutung von EGFR und HER2 in Weichteilsarkomen.....	97
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	99
7	Literaturverzeichnis	101
7.1	Publikationen.....	101
7.2	Internetquellen.....	123
8	Anhang	124

Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Abb.	Abbildung
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
ADP	Adenosindiphosphat
AJCC	American joint Commission on Cancer
AKT	Proteinkinase B
ALMS1	Alstrom syndrome 1
ANG-II	Angiotensin-II
Aqua Bidest	zweifach destilliertes (bidestilliertes) Wasser
AR	Amphiregulin
AS	Aminosäuren
ASCL1	Achaete-scute family bHLH transcription factor 1
AUC	Area under the Curve (Fläche unter der Kurve)
AURKA	Aurora A kinase
BCPC	Brain cancer– propagating cells
B-MYB	Myb-Related Protein B
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BTC	Betacellulin
c-Cbl	E3-Uiquitin Protein Ligase
c-FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
c-JUN	Jun proto-oncogene
c-MYC	v-myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
Casp9	Caspase-9
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)
Cdc2	Cyclin-dependent kinase 1
Cdk	Cyclin-dependent kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CEP57	Centrosomal protein of 57 kDa
Cet	Cetuximab
CHI3L1	Chitinase-3-like protein 1
CHO	Chinese Hamster Ovary
CKAP5	Cytoskeleton-associated protein 5
COX-2	Cyclooxygenase-2

CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CXCL12	Chemokine, CXC motif, ligand 12
CXCR4	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCX	Doublecortin
DDX-10	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 10
DFF40/CAD	DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide (caspase-activated DNase) (DFFB)
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e. V
DLL3	Delta-like 3
DMF10	Dosis modifizierender Faktor 10
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F1	E2F transcription factor 1
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPG	Epigen
EPR	Epiregulin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB	v-ErbB2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
ESMO	European Society for Medical Oncology
ET-1	Endothelin-1
FAK	Focal Adhesion Kinase
FDA	Food and Drug Administration
FFCC	French Federation of Cancer Centers
FGFR2b	Fibroblast Growth Factor Receptor 2b
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FN	Fibronektin
FOXO	Forkhead-Box-Protein O

<i>g</i>	Zeichen der Fallbeschleunigung
g	Gramm
GAB1	GRB2-associated-binding protein 1
GABRA1	Gamma-Aminobutyric Acid (Gaba) A Receptor, Alpha 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HAS	HER2-assozierte Sequenzen
HB-EGF	Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor
HER1	Human Epidermal Growth Factor Receptor 1
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HER3	Human Epidermal Growth Factor Receptor 3
HER4	Human Epidermal Growth Factor Receptor 4
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPV	Humane Papillomviren
HRP	Horseradish Peroxidase
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
IGF1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IgG1	Immunglobulin G1
IHC	Immunhistochemie
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphat
J.	Jahr
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Ko	unbehandelte Kontrolle
Ko siRNA	siRNA Kontrolle (Luciferase)
LOH	Loss of Heterozygosity
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MDM2	Mouse double minute 2 homolog

MERTK	MER proto-oncogene, tyrosine kinase
MET	MET Proto-oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
MeV	Megaelektronenvolt
MMP	Matrix metallopeptidase
Mo.	Monat
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
mTORC2	mTOR Complex 2
NEFL	Neurofilament, Light Polypeptide
NES	Nestin
NF1	Neurofibromin 1
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHEJ	Non-homologous end joining
NKX2-2	NK2 homeobox 2
NLS	Nuclear Localization Signal
NRG	Neuregulin
n. u.	nicht untersucht
OD	optische Dichte
OLIG2	Oligodendrocyte lineage transcription factor 2
p16, p16 ^{INK4a}	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAI-1	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade E (Nexin, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Alpha Polypeptide
PDK1	3-Phosphoinositide dependent protein kinase 1
PGE2	Prostaglandin E2
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phosphoinositid-Phospholipase C γ
PLK4	Serine/threonine-protein kinase 4
POLR2A	Homo sapiens polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A
PRPK	p53-related protein kinase
PTB	Phosphotyrosine binding
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qPCR	Real-Time-quantitative-PCR
R•	Radikal
R-OO•	Peroxy-Radikal
RAS	Rat sarcoma
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Retinoblastom-Protein
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RR	relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
scFv	single chain variable fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	SRC Homology
shRNA	small hairpin RNA
Shh	Sonic hedgehog
siRNA	small Interfering RNA
SLC12A5	Potassium-chloride transporter member 5
SOS	Son of Sevenless
SOX	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)
SRC	Homo sapiens SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
SSTR	Somatostatin Rezeptor
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SYT1	Synaptotagmin 1
TCF3	Transcription factor 3

TCF4	Transcription Factor 4
TGF- α	Transforming Growth Factor Alpha
TIC	Tumor-initiating cells
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	Cellular Tumor Antigen p53
Tra	Trastuzumab
TUBA1A	Tubulin alpha-1A chain
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
uPAR	Plasminogen Activator, Urokinase Receptor
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
vs.	versus
WHO	World Health Organization
WTS	Weichteilsarkom
YES	Tyrosine-protein kinase
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Tumorbiologie

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes sind Tumorerkrankungen mit einem Anteil von 25,8 % (♂: 29,1; ♀: 22,8) nach Erkrankungen des Kreislaufsystems die häufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland 2013). Neben erblichen Prädispositionen und den persönlichen Lebensumständen (Übergewicht, Tabak-, Alkoholkonsum, Arbeitsplatz, Sexualverhalten) haben verschiedene physikalische (Röntgen- und radioaktive Strahlung, UV-Licht), chemische (alkylierende- und desaminierende Substanzen, aromatische Amine, Alkaloide) und biologische Noxen (Viren [Hepatitis B und C, EBV, HIV und HPV], Bakterien, Parasiten) Einfluss auf die Entstehung von Tumoren (Harris, 1991; Poirier, 2004; Parkin, 2006).

Tumoren zeichnen sich durch eine anhaltende genomische Instabilität aus, welche in einem mehrstufigen Prozess zur Aneignung von acht Schlüsselkennzeichen führt (Abb. 1-1). Der Erwerb dieser Schlüsselkennzeichen ermöglicht es Tumorzellen anhaltend zu wachsen, zu metastasieren sowie der Induktion des eigenen Zelltod zu widerstehen (Hanahan und Weinberg, 2011).

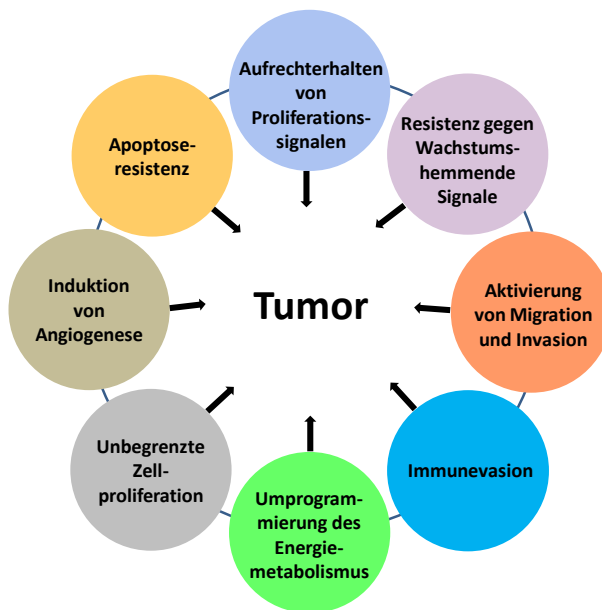


Abb. 1-1: Kennzeichen von Tumorzellen, modifiziert nach (Hanahan und Weinberg, 2011).

1.2 Glioblastome

1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie, Therapie und Prognose

Die von der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) veröffentlichte Inzidenzrate für Glioblastome (Glioblastoma Multiforme) beträgt 3,2 Fälle je 100.000 Einwohner pro Jahr. Dabei machen Glioblastome circa 15,8 % der hirneigenen

Tumoren aus. Neben erblichen Faktoren wie dem Cowden-, Turcot-, Lynch-, Li-Fraumeni Syndrom, Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2, Tuberöse Sklerose und Neurofibromatose Typ 1 gilt einzig die ionisierende Strahlung als gesicherte Ursache für das Entstehen von malignen Gliomen sowie Glioblastomen (Wrensch *et al.*, 1993; Alexander und DiMarco, 2001; Stupp *et al.*, 2010; Urbanska *et al.*, 2014). Darüber hinaus wird das humane Cytomegalovirus (HCMV) aufgrund seines auf Gliomstammzellen ausgerichteten Tropismus, als mögliche Ursache für die Entstehung des Glioblastoms angesehen (Cobbs, 2011). Zusätzlich konnte auch in postmenopausalen Frauen ein erhöhtes Risiko zur Entstehung von Glioblastomen gezeigt werden (Urbanska *et al.*, 2014).

Glioblastome zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate und die Infiltration des umgebenden Hirngewebes aus (Urbanska *et al.*, 2014). Glioblastompatienten weisen eine außergewöhnlich schlechte Prognose auf. Das mediane Überleben von Glioblastompatienten liegt bei *Best Supportive Care* [Gabe von: Steroiden, krampflösende Medikamente, Physiotherapie, psychologische und palliative Pflege] bei drei Monaten (Nieder *et al.*, 2005; Arvold und Reardon, 2014). Die Zwei-Jahres-Überlebensrate der Glioblastompatienten beträgt 14 %, die Fünf-Jahres-Überlebensrate lediglich 5 % (Leitlinien für Gliome der AWMF, März 2014). In einer Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass die zytoreduktive chirurgische Resektion des Tumors im Gegensatz zur alleinigen Biopsie sowohl zu einer signifikanten Steigerung des Gesamtüberlebens führt (RR=0,61, 95 % KI=0,52-0,71; $p < 0,0001$), als auch zur Verbesserung der Lebensqualität der Patienten beiträgt (Tsitlakidis *et al.*, 2010). Die ausgeprägte Infiltration des normalen, den Tumor umgebenden Hirngewebes erschwert jedoch zum einen die Differenzierbarkeit zwischen Tumor und Normalgewebe (Wolbers, 2014), zum anderen schränkt es unter dem Gesichtspunkt der Prävention neurologischer Defekte die Radikalität einer chirurgischen Resektion deutlich ein (Leitlinien für Gliome der AWMF, März 2014). Die Markierung maligner Glioblastomzellen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) ermöglicht über eine Kontrastverstärkung des Tumors die nachfolgende fluoreszenzgestützte vollständigere makroskopische Resektion des Tumors (Stummer *et al.*, 2006). Diese führt im Gegensatz zur Teilresektion zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens (16,7 vs. 11,8 Monate; $p = 0,0001$) (Stummer *et al.*, 2008). Zusätzlich erhalten Glioblastompatienten heute standardmäßig eine Radiotherapie (Primärtherapie: 54-60 Gy in 1,8-2 Gy Fraktionen) (Laperriere *et al.*, 2002). Dies führt zu einer Verbesserung der medianen Überlebenszeit um circa sechs Monate (Leitlinien für Gliome der AWMF, März 2014). Die therapeutische Standardtherapie für das Glioblastom umfasst heute falls möglich die radikale Resektion des Tumors und eine postoperative (adjuvante) Radio- bzw. Chemotherapie (Leitlinien für Gliome der AWMF, März 2014). Es konnte gezeigt werden, dass eine adjuvante Chemotherapie mit Temozolomid (begleitend bzw. postoperativ) das Gesamtüberleben der Glioblastompatienten im Gegensatz zur alleinigen Tumorresektion und

Radiotherapie signifikant verlängert (14,6 Monate vs. 12,1 Monate) (RR=0,63, 95 % KI=0,52-0,75; $p<0,001$). Darüber hinaus führt die zusätzliche Therapie mit Temozolomid zu einer Erhöhung der 2-Jahres-Überlebensrate von 10,4 % auf 26,5 % (Stupp *et al.*, 2005).

1.2.2 Klassifikation

Glioblastome zählen zu den primären Hirntumoren und gehören hier der Untergruppe der Gliome an (Dolecek *et al.*, 2012). Die Einteilung der verschiedenen Gliome erfolgt aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten zu Gliazellen, von denen sie jedoch nicht zwangsläufig abstammen müssen (Modrek *et al.*, 2014). Man unterscheidet hierbei: Astrozytome, Oligodendrogliome, oligodendrogliale/astrozytäre Mischtumoren (Oligoastrozytome) und Ependymome (Ohgaki und Kleihues, 2005; Dolecek *et al.*, 2012). Gliome werden darüber hinaus entsprechend der Vorgaben der WHO (*World Health Organization*) in verschiedene Malignitätsgrade unterteilt. Zur Differenzierung der Malignitätsgrade werden verschiedene zelluläre und histologische Merkmale wie Zelldichte, Pseudopalisaden, Mitoserate, nukleäre Pleomorphie, vaskuläre Anomalien und das Ausmaß von Tumornekrosen bestimmt (Louis *et al.*, 2007). Entsprechend der WHO-Klassifikation für Tumoren des zentralen Nervensystems sind Glioblastome Grad IV Astrozytome. Eine genauere WHO-Klassifizierung und Graduierung astrozytärer Tumoren ist in Tabelle 1-1 dargestellt.

Tabelle 1-1: WHO-Klassifikation astrozytäre Tumoren (Feiden und Feiden, 2008)

Astrozytäre Tumoren	WHO-Grad
Pilozytisches Astrozytom	I
Pilomyxoides Astrozytom	II
Subependymales Riesenzellastrozytom	I
Pleomorphes Xanthoastrozytom	II
Diffuses Astrozytom	II
Fibrilläres Astrozytom	II
Protoplasmatisches Astrozytom	II
Gemistozytäres Astrozytom	II
Anaplastisches Astrozytom	III
Glioblastom	IV
Riesenzellglioblastom	IV
Gliosarkom	IV
Gliomatosis cerebri	III

Bei den Glioblastomen lassen sich primäre und sekundäre Glioblastome voneinander unterscheiden. Die mit circa 95 % am häufigsten auftretende Gruppe der primären Glioblastome entwickelt sich *de novo* ohne bekannte Vorstufen. Primäre Glioblastome werden vor allem in

älteren Patienten mit einem medianen Alter von 59-62 Jahren diagnostiziert (Ohgaki und Kleihues, 2007; Ohgaki und Kleihues, 2013). Sekundäre Glioblastome machen mit etwa 5 % den deutlich geringeren Anteil der Glioblastome aus und werden vor allem in jüngeren Patienten diagnostiziert (medianes Diagnosealter 33-45 Jahre). Sekundäre Glioblastome entstehen nicht *de novo*, sondern durch Progression aus diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) oder anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) (Ohgaki und Kleihues, 2007). Klinisch unterscheiden sich primäre und sekundäre Glioblastome sowohl anhand der medianen klinischen Vorgeschichte (6,3 vs. 16,8 Jahre) als auch anhand des medianen Gesamtüberlebens (4,7 vs. 7,8 Monate) (Ohgaki und Kleihues, 2013). Primäre und sekundäre Glioblastome lassen sich histopathologisch nur schwer voneinander differenzieren. Sie können jedoch durch ein unterschiedliches Expressionsprofil verschiedener Tumormarker und durch das Vorkommen verschiedener genetischer Alterationen (z. B. Mutation von: *IDH1*, *TP53*, *EGFR*, *PTEN* und *p16^{INK4a}*) differenziert werden (Tabelle 1-2) (Ohgaki und Kleihues, 2007; Ohgaki und Kleihues, 2013).

Tabelle 1-2 Klinische und genetische Unterschiede primärer und sekundärer Glioblastome

	primäre Glioblastome	sekundäre Glioblastome
Inzidenzrate [†]	3,5	0,2
Medianes Alter [J.]	59–62	33–45
Verhältnis Männer/Frauen	1,3–1,5	0,7–2,3
Mediane klinische Vorgeschichte [Mo.]	6,3	16,8
Medianes Gesamtüberleben [Mo.]*	4,7	7,8
Genetische Veränderungen		
<i>IDH1</i> -Mutation	4–7 %	73–88 %
<i>TP53</i> -Mutation	17–35 %	60–88 %
<i>EGFR</i> -Amplifikation	36–45 %	0–8 %
<i>PTEN</i> -Mutation	23–25 %	4–12 %
<i>p16^{INK4a}</i> -Deletion	31 %	19 %
LOH Chr. 10p	47 %	8 %

[†] Fälle je 100.000 Einwohner pro Jahr in Europa; * Therapie - chirurgische Resektion des Tumors und Radiotherapie; *IDH1* (*Isocitrate dehydrogenase 1*), *EGFR* (*Epidermal growth factor receptor*), *TP53* (*Cellular tumor antigen p53*), *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*), *p16^{INK4a}* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*); LOH Chr. 10p: Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 10; J (Jahr); Mo. (Monat)

Durch umfangreiche Hochdurchsatzanalysen konnten in der jüngeren Vergangenheit vier Glioblastom-Subtypen (proneural, neural, klassisch und mesenchymal) charakterisiert werden (Verhaak *et al.*, 2010). Der Hypothese von Verhaak *et al.* nach durchlaufen normale Hirnzellen (z. B. neurale Stammzellen, neurale/gliale Vorläuferzellen, Astrozyten bzw. Oligodendrozyten) als putative Ursprungszellen der Glioblastome genetische Veränderungen und werden zu Tumor-

initiierenden Zellen (TIC: *tumor-initiating cells*) (Abb. 1-2). Diese werden durch die Akkumulation weiterer genetischer und epigenetischer Veränderungen zu teilungsaktiven Hirntumorzellen (BCPC: *brain cancer-propagating cells*), welche für die Bildung der verschiedenen Glioblastom-Subtypen verantwortlich sind (Van Meir *et al.*, 2010; Verhaak *et al.*, 2010) (Abb. 1-2). Die vier Glioblastom-Subtypen unterscheiden sich aufgrund ihrer molekularen Expressionsprofile, ihrer Mutationen und ihrem Therapieansprechen voneinander (Abb. 1-2) (Van Meir *et al.*, 2010; Verhaak *et al.*, 2010). Der klassische Subtyp zeichnet sich durch die Amplifikation bzw. die Überexpression von *EGFR* aus. *EGFR* liegt zusätzlich oftmals als konstitutiv aktive Mutante *EGFRvIII* vor. Den klassischen Subtyp kennzeichnen der Verlust des Chromosoms 10 (LOH Chr. 10), der Zugewinn des Chromosoms 7 bzw. die seltene Mutation der Gene *TP53* und *IDH1*. Diese Tumoren zeigen außerdem ein gutes Ansprechen auf eine klassische Radio-/Chemotherapie (Abb. 1-2). Den proneuralen Subtyp kennzeichnen die Expression proneuraler (*SOX*, *TCF4*) und oligodendrozytärer Entwicklungsgene (*PDGFRA*, *OLIG2*). Darüber hinaus zeigt sich eine häufige Mutation von *TP53* und *IDH1* (Abb. 1-2). Der neurale Subtyp weist einen differenzierten Phänotyp auf und wird als der am wenigsten charakterisierte Subtyp angesehen. Er zeigt viele der Mutationen die auch in den übrigen Subtypen anzutreffen sind. Er exprimiert darüber hinaus aber auch Marker von Nervenzellen (*NEFL*, *GABRA1* und *SYT1*). Sowohl der neurale als auch der proneurale Subtyp zeichnen sich durch ein schlechtes bis sehr schlechtes Ansprechen auf eine Kombination aus Radio- und Chemotherapie (Temozolomid) aus (Abb. 1-2). Bei Tumoren des mesenchymalen Subtyps finden sich gehäuft Mutationen in den Genen *TP53*, *PTEN* und *NF1* (*Neurofibromin 1*). Dieser Subtyp exprimiert sowohl mesenchymale als auch astrozytäre Marker (*CD44*, *MERTK*) und zeigt deshalb Parallelen zu Tumoren die sich durch De- und Transdifferenzierung im Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition befinden. Die Tumoren des mesenchymalen Subtyps sprechen zudem sehr gut auf eine kombinierte Radio-/Chemotherapie an (Abb. 1-2) (Van Meir *et al.*, 2010; Verhaak *et al.*, 2010).

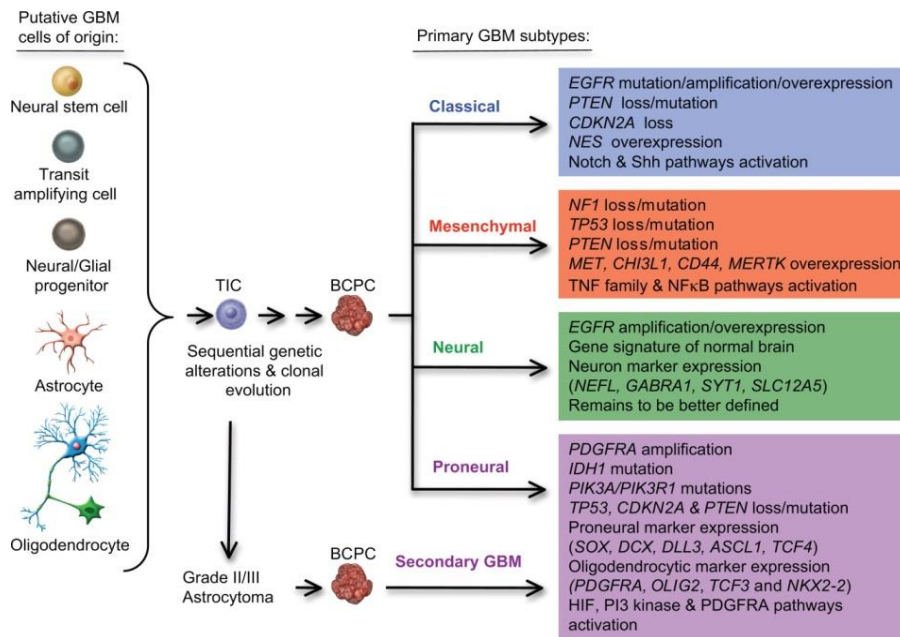


Abb. 1-2: Sequenzielle genetische Veränderungen während der Pathogenese verschiedener Glioblastom-Subtypen (Van Meir *et al.*, 2010).

TIC (*tumor-initiating cells*), BCPC (*brain cancer-propagating cells*)

1.3 Weichteilsarkome

Weichteilsarkome (WTS) sind eine heterogene Gruppe von soliden Tumoren des extraskeletalen, nichtepithelialen Gewebes, mit mesenchymalen Ursprung und des peripheren Nervengewebes. Dies umfasst Muskel-, Fett- und Bindegewebe, Gefäße sowie Gewebe neuroektodermaler Abstammung (Enzinger und Weiss, 1995). Weichteilsarkome werden oft verzögert diagnostiziert, da sie meist langsam und beschwerdearm wachsen, oft tief im Gewebe lokalisiert und aus diesem Grund nur schwer ertastet werden können (Park *et al.*, 2010). Die Inzidenzrate für Weichteilsarkome liegt weltweit bei 1,8-8 Fällen je 100.000 Einwohner pro Jahr (Sinha und Peach, 2010). Bei Erwachsenen machen Weichteilsarkome circa 1 % der jährlich diagnostizierten Malignome aus (Clark *et al.*, 2005). Bei pädiatrischen Tumoren beläuft sich der Anteil dagegen zwischen 7-10 % (Sinha und Peach, 2010). Durch die WHO sind aktuell circa 50 verschiedene Weichteilsarkom Subtypen definiert, die nach dem Gewebe bezeichnet werden dem sie ähneln (Clark *et al.*, 2005). Das mediane Alter der Patienten bei der Diagnose ist stark vom Tumorsubtyp abhängig und liegt beispielsweise beim Rhabdomyosarkom bei 15 Jahren, beim Liposarkom dagegen bei 60 Jahren (Schwankungsbereich 0-85 Jahre) (Ferrari *et al.*, 2011). Darüber hinaus bestehen signifikante altersabhängige Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen WTS-Subtypen. Während bei Kindern und Jugendlichen das Rhabdomyosarkom (40,2 %) fibrohistiozytäre Tumoren (13,2 %) und sonstige/unspezifische bzw. fibromatöse Neoplasien (11,6 %) die drei häufigsten WTS-Subtypen darstellen, treten bei Erwachsenen vor allem

Kaposisarkome (22,1 %), fibrohistiozytäre Tumoren (20,4 %) und Leiomyosarkome (18,9 %) auf (Ferrari *et al.*, 2011). Die Mehrzahl der WTS entsteht spontan ohne offensichtliche Ursache. Darüber hinaus ist bekannt, dass verschiedene genetische Prädispositionen wie das Li-Fraumeni- und Gardnersyndrom, erbliches Retinoblastom und Neurofibromatose das Risiko für eine WTS-Erkrankung erhöhen. Zusätzlich können verschiedene Einflüsse wie eine vorangegangene Radiotherapie, Immunsuppression, verschiedene Umweltgifte und unterschiedliche Viren das Risiko für die Entstehung von WTS beeinflussen (Zahm und Fraumeni, Jr., 1997; Sinha und Peach, 2010). Für die Prognose von WTS-Patienten und die eng damit verknüpfte Tumorthherapie sind sowohl die histopathologische Beurteilung des Malignitätsgrads des Tumors (*Grading*) [nach dem System der *French Federation of Cancer Centers* (FFCC)] als auch die Bewertung des Tumorstadiums (*Staging*; Tumorausdehnung) von entscheidender Bedeutung (Guillou *et al.*, 1997). Zur Feststellung des Tumorstadiums werden vor allem zwei Systeme verwendet, das der *American Joint Commission on Cancer* (AJCC) und das der *Union Internationale Contre Le Cancer* (UICC) (Sinha und Peach, 2010). Für die Feststellung des Tumorstadiums sind verschiedene Faktoren wie die Größe und die Lokalisation des Primärtumors, der Lymphknotenbefall, das Vorhandensein von Fernmetastasen sowie der Malignitätsgrad des Tumors von Bedeutung. Die Prognose von WTS-Patienten variiert stadienabhängig. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt unter Voraussetzung einer optimal gestalteten Tumorthherapie aktuell 85-96 % im Stadium I, 72-78 % im Stadium II, 50 % im Stadium III und circa 10 % im Stadium IV (Weichteilsarkom Leitlinie, DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e. V., Stand: März 2011).

Die radikale chirurgische Resektion des Tumors stellt das Standardverfahren zur Therapie von WTS-Patienten dar (ESMO Clinical Practice Guidelines, 2014). Aufgrund der histologischen Vielfalt von WTS und der damit verbundenen Komplexität der Therapieoptionen sollte sowohl die Operation als auch die weitere Therapie der WTS-Patienten durch spezialisierte Chirurgen und ein hinreichend spezialisiertes Tumorzentrum erfolgen. Da WTS sehr stark zur Infiltration der meist ausgebildeten und sie umgebenden Pseudokapsel neigen, wird die chirurgische Resektion des Tumors mit einem ausreichend breiten Exzisionsrand durchgeführt und durch eine postoperative (adjuvante) Radiotherapie (50 Gy in 1,8-2 Gy Fraktionen, wenn möglich *Boost* Bestrahlung bis 66 Gy) begleitet. Auf diese Weise wird das Risiko der Ausbildung von Lokalrezidiven deutlich minimiert (Williard *et al.*, 1992; ESMO Clinical Practice Guidelines, 2014). Eine präoperative (neoadjuvante) Radiotherapie (50 Gy in 1,8-2 Gy Fraktionen), wenn möglich unterstützt durch eine Chemotherapie führt zusammen mit einer nachfolgenden Tumorsektion zu einer reduzierten Morbidität und zu einer verbesserten Lebensqualität der WTS-Patienten (ESMO Clinical Practice Guidelines, 2014). Mit Ausnahme von Rhabdomyosarkomen und Ewing-Sarkomen

weisen WTS eine mäßige bis mittelgradige Chemosensitivität auf (Purohit *et al.*, 2011). Die wirksamsten Chemotherapeutika sind dabei Anthracycline wie Doxorubicin und Epirubicin, das alkylierende Agens Ifosfamid und das Chemotherapeutikum Dacarbazin (Purohit *et al.*, 2011). Eine regionale Hyperthermie in Kombination mit einer Chemotherapie führt darüber hinaus zu einem verbesserten krankheitsfreiem Überleben bzw. zu einer reduzierten lokalen Progression in Hochrisikopatienten (Sinha und Peach, 2010; ESMO Clinical Practice Guidelines, 2014).

1.4 Radiotherapie

Die Therapie von Tumorerkrankungen umfasst drei Säulen: die operative Entfernung des Tumors, die Chemo- und die Radiotherapie. Im Verlauf ihrer Tumorerkrankung erhalten mehr als 50 % der Patienten eine Radiotherapie (Balcer-Kubiczek, 2012). Das Ziel einer Radiotherapie ist entweder die Heilung der Tumorerkrankung durch die Zerstörung klonogener Tumorzellen oder die Verlängerung des Patientenlebens bzw. die Steigerung der Lebensqualität. Die Bestrahlung mit locker ionisierender Strahlung (Röntgen- oder Gammastrahlung) kann direkt durch Sekundärelektronen zur Ionisierung der DNA führen oder diese indirekt über freie Radikale schädigen (Ewing, 1998; Hall, 2002). Die Interaktion von locker ionisierender Strahlung mit Wasser führt zur Radiolyse des Selbigen. In dessen Folge kommt es zur Bildung von Sekundärelektronen, hochreaktiver Moleküle und freier Radikale (Tabelle 1-3). Die über direkte oder indirekte Prozesse induzierte Schädigung zellulärer Moleküle (z. B. DNA) führt zur Bildung instabiler Radikale ($R\bullet$). Diese reagieren in Anwesenheit von Sauerstoff zu Peroxiden ($R-OO\bullet$). Diese Peroxide durchlaufen weitere Reaktionen bis zur Bildung eines stabilen Produkts wodurch der Strahlenschaden chemisch „fixiert“ wird (Ewing, 1998). Durch diesen Prozess wird die Wirkung einer Bestrahlung um den Faktor zwei bis drei deutlich verstärkt (Hall, 2002). Hypoxie (Sauerstoffmangel) ist deshalb der wichtigste Faktor der eine Resistenz gegenüber einer Radiotherapie vermittelt (Jordan und Sonveaux, 2012).

Durch eine Bestrahlung werden verschiedene DNA-Schäden wie Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche und Basenschäden induziert. Doppelstrangbrüche sind hierbei von besonderer Bedeutung, da sie zu schwerwiegenden chromosomalen Aberrationen wie Deletionen, Translokationen oder dizentrischen Chromosomen führen können (Suzuki *et al.*, 2003; Sancar *et al.*, 2004). Dies resultiert nachfolgend in einer Inaktivierung von Genen, Zellzyklusarrest, Verlust des klonogenen Zellüberlebens, Apoptose, Seneszenz, mitotischer Katastrophe und Nekrose (Chen und Nirodi, 2007; Galluzzi *et al.*, 2012; Balcer-Kubiczek, 2012).

Die Radiosensitivität einer Zelle, also ihre Empfindlichkeit gegenüber einer Bestrahlung, variiert zwischen den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Zellen die sich in der G2- bzw. der M-Phase des Zellzyklus befinden, weisen eine relativ hohe Radiosensitivität auf. Zellen in der G1- bzw. in

der S-Phase (vor allem späte S-Phase) sind dagegen relativ resistent gegenüber einer Bestrahlung (BERGONIE und Tribondeau, 1959; Pawlik und Keyomarsi, 2004). Die Radiosensitivität von Zellen wird zudem durch die Expression von Genen beeinflusst, die in die Reparatur von DNA-Schäden involviert sind z. B. Basen-Exzisionsreparatur, Nukleotid-Exzisionsreparatur, Mismatch-Reparatur, nicht-homologe Endverknüpfung, homologe Rekombination (sciencepark.mdanderson.org/labs/wood/DNA_Repair_Genes.html) (Balcer-Kubiczek, 2012).

Eine Bestrahlung führt neben der Schädigung des Tumors immer auch zur Beeinträchtigung des Normalgewebes. Um die Toxizität einer Bestrahlung für das Normalgewebe zu minimieren und die Tumorkontrollrate zu erhöhen, werden Tumoren fraktioniert bestrahlt. Die Gesamtdosis einer Bestrahlung wird dabei in der Regel auf Einzeldosen zu je 1,8-2 Gy/Tag; fünf Tage/Woche für ca. fünf Wochen verteilt. Dies gibt dem Normalgewebe Zeit zur Regeneration (*repopulation*) und Reparatur subletaler DNA-Schäden. Da die Kapazität der Reparatur von DNA-Schäden gewöhnlicherweise im Normalgewebe stärker ausgeprägt ist als im Tumor, führt die Fraktionierung der Bestrahlung vor allem zur Schädigung des Tumors bei gleichzeitiger relativer Schonung des Normalgewebes (Hall, 2002; Hall und Giaccia, 2012; Balcer-Kubiczek, 2012).

Die Fraktionierung der Bestrahlung führt außerdem zu einer Reoxygenierung (Verbesserung der Sauerstoffversorgung) des Tumors. Die Anreicherung von Sauerstoff resultiert nach erneuter Bestrahlung in einer verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und somit in einer stärkeren Induktion von Strahlenschäden. Darüber hinaus kommt es zu einer Neuverteilung bzw. zu einer Synchronisierung der Zellen im Zellzyklus und somit potenziell auch zu einer Anreicherung der Zellen in radiosensitiven Zellzyklusphasen. Zusammengefasst resultieren diese Veränderungen in einer stärkeren Schädigung des Tumors als eine Einzeldosisbestrahlung.

Zu den Hauptursachen für das fehlende Ansprechen einer konventionellen, fraktionierten Strahlentherapie zählt die beschleunigte Vermehrung überlebender klonogener Tumorzellen (*accelerated repopulation*). Die dadurch bedingte Zunahme der Tumormasse kann zur teilweisen Kompensation der durch die Bestrahlung abgetöteten Tumorzellen führen. Sie wird jedoch normalerweise erst drei bis fünf Wochen nach Beginn einer Radiotherapie klinisch relevant (Hall, 2002; Hall und Giaccia, 2012; Balcer-Kubiczek, 2012).

Der therapeutische Nutzen einer Strahlentherapie ist jedoch unbestritten. Sie senkt zum einen das Rezidivrisiko und erhöht zum anderen die Tumorkontrolle sowie die Überlebenschancen von Tumorpatienten (Balcer-Kubiczek, 2012). Bei Mammakarzinompatienten führt eine Radiotherapie beispielsweise zu einer ca. 75%igen Reduktion des lokalen Rezidivrisikos (Offersen *et al.*, 2009). Bei Glioblastompatienten steigert eine Radiotherapie zudem das mediane Überleben um circa 6 Monate (Leitlinien für Gliome der AWMF, März 2014).

Tabelle 1-3: Darstellung reaktiver Teilchen der Radiolyse des Wassers (Rink, 1971)

Reaktive Teilchen	Bezeichnung
H_2O^+	O-Kation
H_2O^-	H_2O -Anion
$\text{H}\cdot$	H-Radikal = atomarer Wasserstoff
$\cdot\text{OH}$	Hydroxyl-Radikal
$\text{HO}_2\cdot$	Hydroperoxyl-Radikal
H_3O^+	Hydroniumkation
OH^-	Hydroxylanion
O^-	atomarer, anionischer Sauerstoff
O_2^-	molekularer, anionischer Sauerstoff
e^-	Sekundärelektron
e^-_{th}	thermisches Elektron
e^-_{aq}	solvatisiertes Elektron (Polaron)

1.5 Die ErbB Rezeptorfamilie

1.5.1 Aufbau der ErbB-Rezeptoren

Die vier Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie EGFR, HER2, HER3 und HER4 (*Human epidermal growth factor receptor*) zählen zur Superfamilie der Typ 1 transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptoren (Yarden und Sliwkowski, 2001). Sie werden ubiquitär in epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Zellen exprimiert (Roskoski, Jr., 2014). Sie sind in der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung und der Tumorentwicklung von entscheidender Bedeutung (Eccles, 2011; Roskoski, Jr., 2014). Die ErbB-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer kurzen transmembranen Domäne (19-25 AS) und einer intrazellulären Domäne (Abb. 1-3). Die extrazelluläre Domäne setzt sich wiederum aus vier Subdomänen zusammen. Den beiden Leucin-reichen und für die Ligandenbindung verantwortlichen Domänen I und III sowie den Cystein-reichen Domänen II und IV, welche die Dimerisierung zweier Rezeptormonomere regulieren. Die intrazelluläre Domäne setzt sich aus der Juxtamembran Domäne, der Tyrosinkinase Domäne und der carboxyterminalen regulatorischen Domäne zusammen (Abb. 1-3) (Leahy, 2004; Roskoski, Jr., 2014).

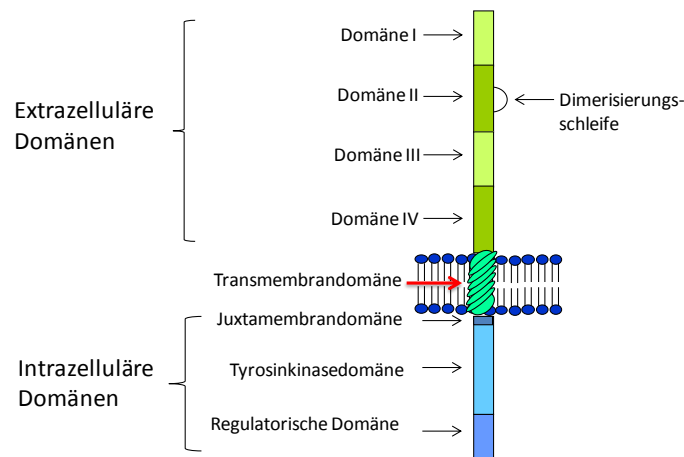


Abb. 1-3: Struktureller Aufbau der ErbB-Rezeptoren. Darstellung der relevanten Domänen.

1.5.2 Die Liganden der ErbB-Rezeptoren

Die Liganden können entsprechend ihrer Bindungsspezifität für die ErbB-Rezeptoren in vier Gruppen unterteilt werden. Die Liganden der Gruppe eins (EGF, EPG, TGF- α und AR) binden nur EGFR, die Liganden der Gruppe zwei (BTC, HB-EGF und EPR) binden EGFR und HER4, die Liganden der Gruppe drei (NRG1, NRG2) binden HER3 und HER4 und die Liganden der Gruppe vier (NRG3, NRG4) binden nur HER4. Bedingt durch die Vielzahl der Liganden und entsprechend der möglichen aktiven Rezeptordimere (einschließlich funktionaler Isoformen von HER3 und HER4) ergeben sich 611 denkbare Ligand/Rezeptor-Kombinationen (Tabelle 1-4) (Roskoski, Jr., 2014).

Tabelle 1-4: ErbB-Rezeptoren und ihre Liganden: Mögliche Ligand/Dimer-Kombinationen.

Rezeptordimere	Liganden
EGFR/EGFR, EGFR/HER2	EGF, EPG, TGF- α , AR, BTC, HB-EGF, EPR
EGFR/HER3	EGF, EPG, TGF- α , AR, BTC, HB-EGF, EPR, NRG1, NRG2
EGFR/HER4	EGF, EPG, TGF- α , AR, BTC, HB-EGF, EPR, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4
HER2/HER2	keine
HER2/HER3; HER3/HER3	NRG1, NRG2
HER2/HER4; HER3/HER4, HER4/HER4	BTC, HB-EGF, EPR, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4

EGF: *Epidermal growth factor*; EPG: *Epigen*; TGF- α : *Transforming growth factor alpha*; AR: *Amphiregulin*; BTC: *Betacellulin*; HB-EGF: *Heparin-binding egf-like growth factor*; EPR: *Epiregulin*; NRG: *Neuregulin*.

Alle ErbB Liganden werden als transmembrane Vorläufer synthetisiert und in die Membran integriert. Sie bestehen aus einem extrazellulären, einem transmembranen und einem kurzen

intrazellulären Segment. Nach der extrazellulären Freisetzung der Liganden wirken die ErbB Liganden innerhalb ihrer unmittelbaren Umgebung entweder autokrin (auf dieselbe Zelle), juxtakrin (auf angrenzende Zellen) oder parakrin (auf in der Nähe liegende Zellen). Die extrazelluläre Freisetzung der Liganden erfolgt über die Aktivierung von ADAM (*A disintegrin and metalloproteinase*) Metalloproteasen.

1.5.3 Dimerisierung und Aktivierung von ErbB-Rezeptoren

Die schematisch stark vereinfachten Interaktionen der ErbB-Rezeptoren und ihrer Liganden sind in Abb. 1-4 gezeigt. Hat ein Rezeptor keinen Liganden gebunden ist dieser nicht zur Rezeptor Dimerisierung in der Lage, da es durch die Interaktion der Cystein reichen Domänen II und IV zur Autoinhibierung des Rezeptors kommt („geschlossene“ Konformation) (Abb. 1-4 A). Nachdem ein Rezeptor einen Liganden über die Domänen I und III gebunden hat, ist dieser zur Rezeptor Dimerisierung bereit, da es zu einer starken Konformationsänderung und damit zur Aufhebung der Autoinhibierung des Rezeptors kommt („offene“ Konformation) (Abb. 1-4 B). Die Interaktion zwischen den Domänen II und IV wird aufgehoben und der Dimerisierungsarm der Domäne II kann mit einem Dimerisierungsarm eines anderen, ebenfalls mit einem Liganden beladenen Rezeptors interagieren. An der Dimerisierung zweier Rezeptoren ist zudem auch die Domäne IV beteiligt (Abb. 1-4 C). Der ErbB-Rezeptor HER2 (Abb. 1-4 E) liegt ohne Bindung eines Liganden konstitutiv in der „offenen“ Konformation mit exponiertem Dimerisierungsarm vor und kann so mit anderen ErbB-Rezeptoren, die nach Bindung eines Liganden die „offene“ Konformation einnehmen, interagieren (Abb. 1-4 D). Die Homo- bzw. Heterodimerisierung der ErbB-Rezeptoren resultiert in einer Konformationsänderung und Aktivierung der intrazellulären Kinasedomäne. Die nachfolgende *trans*-Autophosphorylierung verschiedener Tyrosinreste in der carboxyterminalen regulatorischen Domäne (Abb. 1-4 C bzw. D) erzeugt wiederum Bindungsstellen für verschiedene Adapterproteine, welche für die Aktivierung und Modulation nachgeschalteter Signaltransduktionswege verantwortlich sind (Absatz 1.5 sowie Abb. 1-6) (Britten, 2004; Citri und Yarden, 2006; Wieduwilt und Moasser, 2008; Roskoski, Jr., 2014).

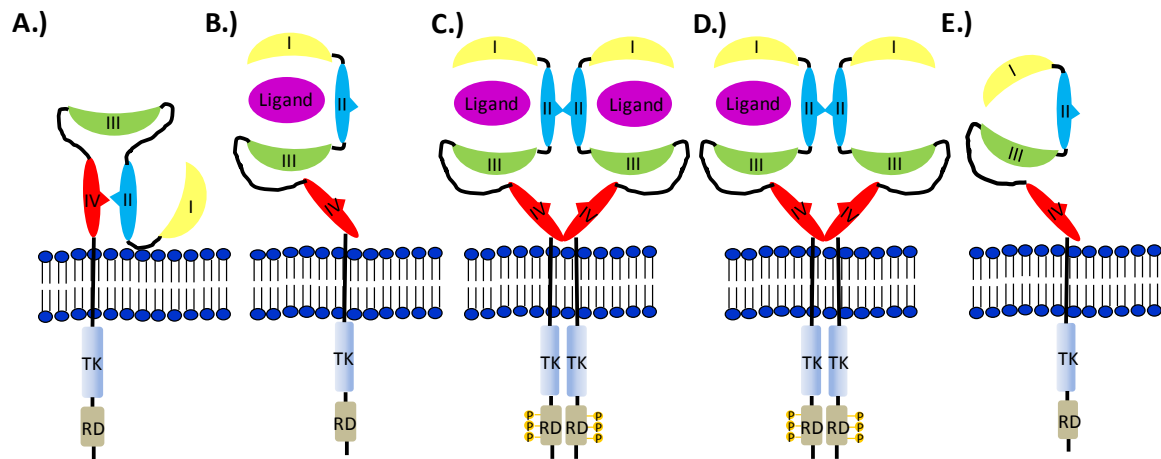


Abb. 1-4: Liganden-induzierte Dimerisierung und Aktivierung von ErbB-Rezeptoren, modifiziert nach (Hynes und Lane, 2005; Lammerts van Bueren *et al.*, 2008; Baselga und Swain, 2009).

A-E: Darstellung der extrazellulären Domänen I-IV, der intrazellulären Tyrosinkinase Domäne (TK) und der regulatorischen Domäne (RD) der ErbB-Rezeptoren. **A:** Autoinhibierung des Rezeptors - „geschlossene“ Konformation (EGFR, HER3 bzw. HER4). **B:** Aufhebung der Autoinhibierung des Rezeptors durch Bindung eines Liganden - „offene“ Konformation. **C:** Interaktion von zwei mit Liganden beladenen Rezeptoren über den Dimerisierungsarm der Domäne II und die Domäne IV. **D:** Interaktion von HER2 mit einem Liganden-beladenen Rezeptor (EGFR, HER3 bzw. HER4) über den Dimerisierungsarm der Domäne II und die Domäne IV. **E:** HER2 mit konstitutiv exponiertem Dimerisierungsarm.

1.5.4 Transaktivierung

Transaktivierung bezeichnet einen weiteren Mechanismus bei dem die Rezeptoren EGFR und HER2 durch heterologe Signalsysteme aktiviert werden können. Die Liganden-unabhängige Transaktivierung wird durch viele GPCRs, Zytokinrezeptoren, nukleäre Hormonrezeptoren und Todesrezeptoren ausgelöst (Abb. 1-5 A). Diese binden verschiedene Liganden (PGE₂, ET-1, CXCL12 oder ANG-II) und vermitteln durch die nachfolgende Aktivierung von Kinasen (YES, JAK oder SRC) die Transaktivierung von EGFR bzw. HER2. Die eben genannten Kinasen phosphorylieren verschiedene Tyrosinreste in den cytoplasmatischen Domänen von EGFR und HER2. Diese dienen wiederum als Bindungsstellen für verschiedene Signalmoleküle und induzieren so unterschiedliche Signaltransduktionswege (Cabioglu *et al.*, 2004; Chinni *et al.*, 2008; Valdehita *et al.*, 2009; Berasain *et al.*, 2011).

Als Liganden-abhängige Transaktivierung bezeichnet man die Liganden bedingte Aktivierung von Rezeptoren wie z. B. EGFR als Folge einer vorhergehenden Aktivierung anderer Rezeptoren (Abb. 1-5 B). Dieser Prozess, wird durch verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Zytokinrezeptoren, Integrine bzw. Tyrosinkinaserzeptoren induziert und über Metalloproteasen (ADAM 10, ADAM 15 und ADAM 17) und EGFR Liganden (AR, HB-EGF und TGF- α) vermittelt (Schafer *et al.*, 2004). Nach der Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wie GPCRs kommt es

durch die Freisetzung von ROS (reaktive Sauerstoffspezies) oder Ca^{2+} bzw. durch die Aktivierung verschiedener Kinasen (PKC, ERK, oder SRC) zur Aktivierung von transmembranen Metalloproteasen (ADAMs). Die aktivierten ADAMs setzen nachfolgend proteolytisch die als transmembrane Vorstufen synthetisierten Liganden des EGFR frei. Die freigesetzten EGFR Liganden führen dann durch die Bindung an EGFR zu einer auto- bzw. parakrinen Stimulation verschiedener EGFR Signalwege. Dieser Form der Signalweiterleitung wird auch als *Triple-Membrane-Passing-Signal-Pathway* bezeichnet (Leserer *et al.*, 2000; Arora *et al.*, 2008; Berasain *et al.*, 2011).

Darüber hinaus ist bekannt, dass EGFR mit anderen Tyrosinkinase (z. B. PDGFR, IGF1R und MET) bzw. mit GPCRs [z. B. SSTRs (Somatostatin Rezeptor)] interagieren und Heterodimere ausbilden kann. Zusätzlich kann EGFR im Zusammenspiel mit Integrinen, uPAR (*Plasminogen activator, urokinase receptor*) und dessen Liganden (FN, uPA) Proteinkomplexe ausbilden. In all diesen Fällen können die physiologischen Interaktionen mit EGFR zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege bzw. zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber EGFR-Inhibitoren beitragen (Berasain *et al.*, 2011).

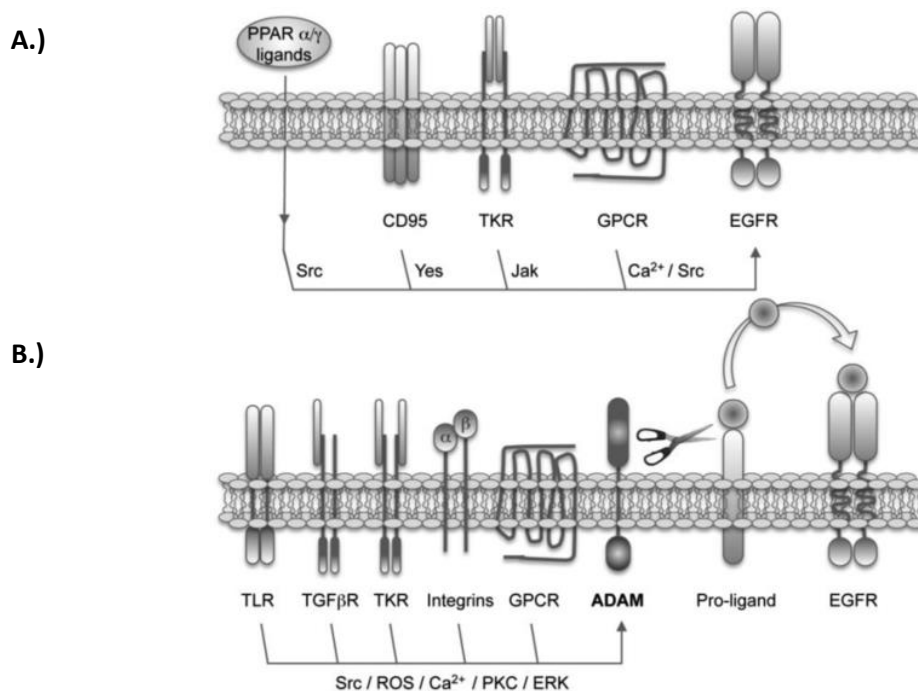


Abb. 1-5: A.) Liganden-unabhängige Transaktivierung von EGFR. B.) Liganden-abhängige Transaktivierung von EGFR (Berasain *et al.*, 2011).

1.5.5 Die Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren

ErbB-Rezeptoren sind als Rezeptordimere aktiv. Von den 10 theoretisch vorstellbaren Homo- bzw. Heterodimer Kombinationen sind jedoch nicht alle funktional bzw. aktiv. Die Zusammensetzung

der Rezeptordimere und die Identität der gebundenen Liganden entscheiden darüber, welcher Tyrosinrest in der Tyrosinkinasedomäne der Rezeptoren autophosphoryliert wird. Verschiedene Phosphotyrosin-bindende Proteine sind nachfolgend in der Lage über ihre SH2- (*SH2 Homology 2*), SH3- (*SH3 Homology 3*) bzw. PTB-Domänen (*Phosphotyrosine binding*) an die autophosphorylierten ErbB-Rezeptoren zu binden. Die Aminosäuresequenz in der Umgebung des Phosphotyrosins beeinflusst dabei maßgeblich, welche Phosphotyrosin-bindenden Proteine an die aktivierten ErbB-Rezeptoren binden (Yarden und Sliwkowski, 2001; Roskoski, Jr., 2014). Anschließend werden unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert (Abb. 1-6). Das durch die vier ErbB-Rezeptoren aktivierte Signaltransduktionsnetzwerk verfügt dabei über verschiedene Überlagerungen und Vernetzungen (Roskoski, Jr., 2014). Die ErbB-Rezeptoren beeinflussen über diese Signaltransduktionswege das Zellwachstum, Proliferation, Migration, Metastasierung, Überleben, Apoptose, Zelladhäsion und Angiogenese (Citri und Yarden, 2006; Seshacharyulu *et al.*, 2012). Auf einige dieser Signalwege soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.5.5.1 PI3K/AKT-Signalweg

Der PI3K/AKT-Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinase, Proteinkinase B) beeinflusst zellphysiologische Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Angiogenese, Überleben, Metabolismus sowie Mechanismen der DNA-Reparatur (Abb. 1-6) (Manning und Cantley, 2007; Toulany und Rodemann, 2010). Die Kinase PI3K bindet die phosphorylierten Rezeptoren EGFR und HER2 vermittelt durch die Adapterproteine GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) und GAB1 (*GRB2-associated-binding protein 1*). Die phosphorylierten Rezeptoren HER3 und HER4 werden dagegen direkt durch PI3K gebunden (Hynes und Lane, 2005; Kiyatkin *et al.*, 2006). Nachdem PI3K die ErbB-Rezeptoren direkt bzw. indirekt gebunden hat, kommt es über eine Konformationsänderung in der regulatorischen Untereinheit p85 von PI3K zur Aktivierung der selbigen. Die katalytische Untereinheit p110 von PI3K sorgt im Anschluss für die Umwandlung des Phospholipids PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat). Die Proteinkinase AKT (auch PKB genannt) bindet PIP3 und kann nachfolgend durch die Proteinkinasen PDK1 (*3-phosphoinositide dependent protein kinase 1*) und mTORC2 (*mTOR Complex 2*) phosphoryliert und dadurch aktiviert werden (Vivanco und Sawyers, 2002; Moore *et al.*, 2011). Die aktivierte Proteinkinase AKT ist in der Lage verschiedene Proteine (FOXO, BAD, Casp9, MDM2, GSK3, p27 und eNOS) zu phosphorylieren und diese dadurch zu aktivieren bzw. zu inhibieren. Die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) wirkt als negativer bzw. inhibierender Regulator des PI3K/AKT-Signalweges indem es die Hydrolyse des Phospholipids PIP3 zu PIP2 katalysiert (Roskoski, Jr., 2014).

1.5.5.2 MAPK-ERK1/2-Signalweg

Der MAPK-ERK1/2-Signalweg (*Mitogen-activated protein kinase, Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) (Abb. 1-6) kann durch alle vier ErbB-Rezeptoren induziert werden. Er reguliert das Zellwachstum, die Zellzyklusprogression sowie die Apoptoseresistenz (Davis, 1995; McCubrey *et al.*, 2007; Meloche und Pouyssegur, 2007; Roskoski, Jr., 2014). Hierbei bindet das Adapterprotein GRB2 entweder direkt oder vermittelt durch das Adapterprotein SRC (*Homo sapiens SRC Proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase*) an die phosphorylierten und aktivierten ErbB-Rezeptoren. GRB2 bindet und aktiviert seinerseits den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor SOS (*Son of sevenless*). SOS bindet wiederum verschiedene Proteine der RAS-Familie (*Rat sarcoma*) und katalysiert den Austausch von RAS-gebundenem GDP (Guanosindiphosphat) zu GTP (Guanosintriphosphat). RAS ist nach Bindung von GTP in der Lage die Kinase RAF (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*) zu aktivieren (Abb. 1-6). RAF aktiviert nachfolgend eine Kaskade von MAP-Kinasen bis hin zur Aktivierung von ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*). ERK1/2 als MAP-Kinasen aktivieren ihrerseits verschiedene Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren (ELK1, c-MYC, c-JUN und c-FOS).

1.5.5.3 PLC γ -Signalweg

Der PLC γ -Signalweg (Phosphoinositid-Phospholipase C γ) (Abb. 1-6) beeinflusst zellphysiologische Prozesse wie Proliferation, Zellüberleben, Apoptose, Migration, Invasion und Differenzierung (Marmor *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012; Lattanzio *et al.*, 2013). Die PLC γ ist zum einen über ihre SH2-Domäne (*src homology domain*) in der Lage die phosphorylierten ErbB-Rezeptoren EGFR und HER2 zu binden (HER4 potentielle PLC γ Phosphotyrosin Bindestelle) (Roskoski, Jr., 2014). Zum anderen vermag die PLC γ über ihre PH-Domäne (*Pleckstrin homology domain*) PI3K zu binden (Marmor *et al.*, 2004; Roskoski, Jr., 2014). Nach Phosphorylierung und Aktivierung durch EGFR, HER2 bzw. PI3K, hydrolysiert PLC γ das Phospholipid PIP₂ in die sekundären Botenstoffe DAG (Diacylglycerol) und IP₃ (Inositol 1,4,5-trisphosphat). IP₃ sorgt durch die Bindung an IP₃-Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum für den Ausstrom von Calcium. Die daraus resultierende intrazelluläre Calcium Anreicherung führt zur Aktivierung verschiedener Calcium/Calmodulin-abhängiger Proteinkinasen und Phosphatasen. Der sekundäre Botenstoff DAG aktiviert im Zusammenspiel mit Calcium die Proteinkinase C (PKC). PKC beeinflusst anschließend die Expression einer Vielzahl zellulärer Proteine (Marmor *et al.*, 2004; Roskoski, Jr., 2014).

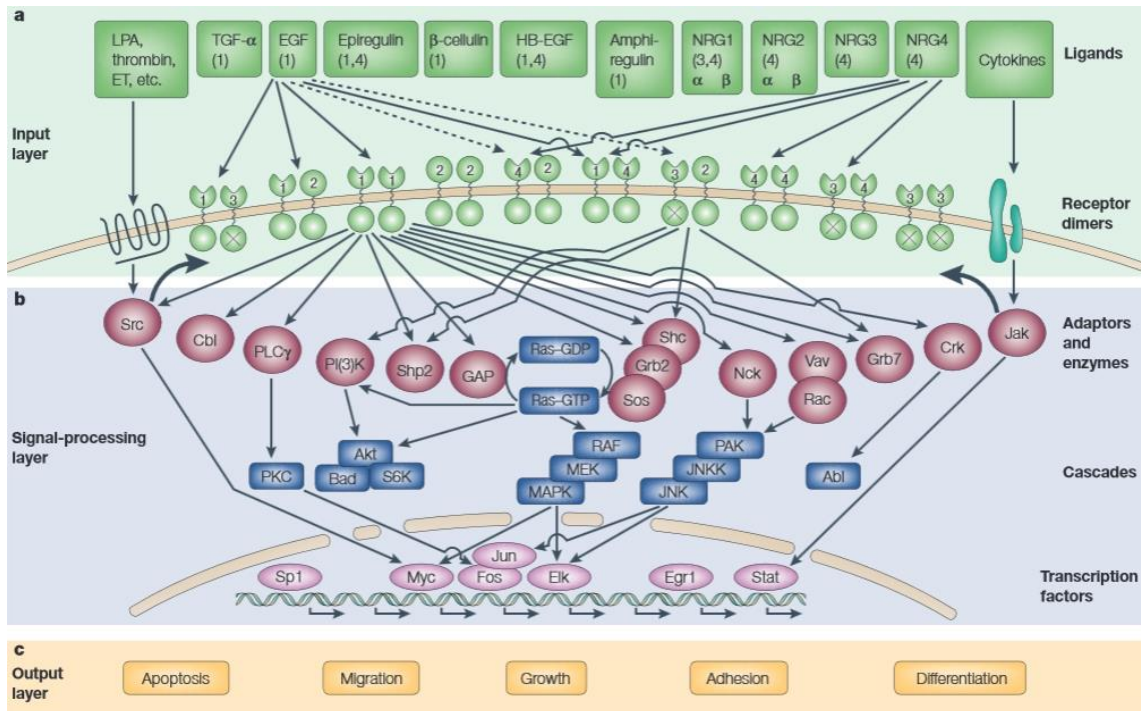


Abb. 1-6: Signalnetzwerk der ErbB-Rezeptoren (Yarden und Sliwkowski, 2001).

1.5.5.4 Nukleäre Signaltransduktion

Über die bereits genannten Signalwege hinaus sind ErbB-Rezeptoren in der Lage in den Zellkern transloziert zu werden. Alle ErbB-Rezeptoren weisen in der Nähe ihrer juxtamembranen Domäne ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS: *Nuclear localization signal*) auf (Brand *et al.*, 2011). Dieses wird durch Importin Proteinkomplexe gebunden und ermöglicht so den Kerntransport von EGFR und HER2 (Roskoski, Jr., 2014). Der nukleäre Transport von EGFR und HER2 erfolgt dabei über die Clathrin-abhängige bzw. die Clathrin-unabhängige Endozytose von Vesikeln, welche nachfolgend mit frühen Endosomen verschmelzen. Es wird vermutet, dass die frühen Endosomen im Anschluss über den Golgi-Apparat und das Endoplasmatische Retikulum (ER) in den Zellkern gelangen (Wang *et al.*, 2010). EGFR kann wahrscheinlich auch aus der Membran des ER extrahiert werden und in das Cytoplasma transportiert werden. Das cytoplasmatisch lokalisierte EGFR wird dann durch die Kernporen in den Zellkern transportiert (Wang *et al.*, 2010). Im Zellkern regulieren EGFR und HER2 die Expression verschiedener Gene. Untersuchungen zeigen, dass EGFR an AT-reiche Promotorsequenzen bindet und durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (STAT3, STAT5 bzw. E2F1) die Expression zahlreicher Gene verändert (*Cyclin D1*, *iNOS*, *B-MYB* bzw. *AURKA*) (Lo und Hung, 2006; Wang *et al.*, 2010). HER2 bindet dagegen an sogenannte HER2-assoziierte Sequenzen (HAS) und beeinflusst so die Expression weiterer Gene (*COX-2*, *PRPK*, *MMP-16* und *DDX-10*) (Lo und Hung, 2006; Wang *et al.*, 2010). EGFR und HER2 nehmen so Einfluss auf die Zellproliferation, DNA-Replikation und DNA-Reparatur, Progression sowie die Chemo-, Radio- und Therapieresistenz von Tumoren (Wang und Hung,

2009; Dittmann *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011; Schillaci *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang gibt es erste Hinweise darauf, dass die nukleäre Lokalisation der ErbB-Rezeptoren EGFR und HER2 in verschiedenen Tumorentitäten mit einer ungünstigen Patientenprognose assoziiert ist (Xia *et al.*, 2009; Lo, 2010; Schillaci *et al.*, 2012).

1.5.6 Endozytose und Degradation der ErbB-Rezeptoren

ErbB-Rezeptoren können endozytotisch internalisiert werden. Die internalisierten Vesikel fusionieren mit frühen Endosomen und die darin enthaltenen ErbB-Rezeptoren werden nachfolgend recycelt bzw. degradiert. Durch diesen Prozess kann die Stärke sowie die Kinetik der ErbB-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion modifiziert werden (Waterman und Yarden, 2001). Dieser Prozess wird sowohl durch die Art der gebildeten Homo- bzw. Heterodimere als auch durch die Bindungsaffinität der verschiedenen ErbB-Liganden beeinflusst (Wiley, 2003; Roskoski, Jr., 2014). Die E3-Ubiquitin Protein Ligase c-Cbl agiert hierbei als entscheidender Negativregulator der ErbB-Signaltransduktion und vermittelt die Degradation der ErbB-Rezeptoren. c-Cbl sorgt für die Ubiquitinierung der phosphorylierten ErbB-Rezeptoren und fördert so deren Degradation (Wiley, 2003; Roskoski, Jr., 2014). ErbB-Rezeptoren werden aber auch in Abwesenheit von Liganden über Clathrin-abhängige bzw. Clathrin-unabhängige Mechanismen internalisiert, um danach rasch recycelt und zurück zur Zelloberfläche transportiert zu werden (Wang *et al.*, 2010; Bertelsen und Stang, 2014). Die Halbwertszeit der unstimulierten ErbB-Rezeptoren variiert in Abhängigkeit vom untersuchten Zellsystem. Sie beträgt jedoch etwa 10 h für EGFR; 3,5 h für HER2; 2 h für HER3 und etwa 5 h für HER4 (Wiley, 2003).

Die ligandenabhängige Aktivierung von EGFR führt zu einer Erhöhung seiner Endozytoserate um das 5-10 fache. Im Gegensatz dazu bleibt die Internalisationsrate der übrigen ErbB-Rezeptoren (HER2, HER3 und HER4) auch nach Bindung von Liganden unverändert (Wiley, 2003). Aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität zu EGFR, dissoziiert der Ligand EGF unter den in frühen Endosomen vorherrschenden Bedingungen (pH 5,5-6,0) nicht von seinem Rezeptor sondern induziert die fortwährende Ubiquitinierung durch c-Cbl und damit eine effektive Degradation von EGFR (Roskoski, Jr., 2014). Im Gegensatz dazu dissoziiert der Ligand TGF- α in frühen Endosomen schnell von seinem Rezeptor, reduziert damit die Ubiquitinierung und sorgt so für ein effizientes Recycling von EGFR (Roskoski, Jr., 2014).

1.5.7 Der ErbB-Rezeptor EGFR

EGFR auch ERBB, HER1, mENA, ERBB1, PIG61 oder NISBD2 genannt, gehört zur Superfamilie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und hier zur Subfamilie der ErbB-Rezeptoren. EGFR ist ein 170 kDa

großes transmembranes Glykoprotein. Das *EGFR*-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms sieben an Position 12 lokalisiert (Chr. 7p12). Laut NCBI-Datenbank sind aktuell (Stand 09/2015) vier *EGFR*-Spleißvarianten bekannt (Variante 1: 5.616 bp; Variante 2: 2.239 bp; Variante 3: 1.595 bp; Variante 4: 2.865 bp).

In einer Übersichtsarbeit wurde in Blasen-, Gebärmutterhals-, Ösophagus-, Kopf-Hals- und Ovarialkarzinomen in circa 70 % der Studien eine prognostische Bedeutung von *EGFR* für die Patienten gezeigt. In diesen Patienten konnte eine starke Korrelation zwischen einer erhöhten *EGFR*-Genexpression und einem verkürzten rezidivfreien Überleben bzw. einem schlechteren Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Nicholson *et al.*, 2001). In Brust-, Kolorektal-, Magen- und Endometriumkarzinomen korrelierte eine erhöhte *EGFR*-Genexpression dagegen nur in circa 52 % der Studien mit einem kürzeren Gesamtüberleben (Nicholson *et al.*, 2001). In Tumoren sind zudem verschiedene genetische Anomalien des *EGFR*-Gens bekannt. So sind in Mammakarzinomen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen aktivierende Mutationen der Kinasedomäne, Gen-Amplifikationen und große Deletionen beschrieben (Yarden und Pines, 2012). Darüber hinaus ist *EGFR* in 36 % der primären Glioblastome und in circa 8 % der sekundären Glioblastome amplifiziert (Ohgaki und Kleihues, 2007; Wilson *et al.*, 2014). Die Amplifikation des *EGFR*-Gens ist dabei häufig mit einer Mutation dieses Gens assoziiert. Die häufigste dabei anzutreffende Mutation (60-70 %) ist eine *in-frame* Deletion der Exone 2-7 mit der Bezeichnung *EGFRvIII* (Ohgaki, 2005; Belda-Iniesta *et al.*, 2008). Dieser Mutante fehlt der Dimerisierungsarm der extrazellulären Domäne II. Diese strukturellen Änderungen vermitteln die konstitutive Aktivierung des mutierten Rezeptors *EGFRvIII* (Hynes und Lane, 2005).

Es bestehen verschiedene Therapiestrategien zur Inhibierung der *EGFR*-Signaltransduktion. Beispielsweise werden verschiedene monoklonale therapeutische Antikörper genutzt (z. B. Cetuximab, Panituzumab), welche die extrazelluläre Domäne von *EGFR* binden und sterisch die Bindung von Liganden an den Rezeptor inhibieren bzw. die Dimerisierung von *EGFR* verhindern. Der chimäre monoklonale Maus-Mensch-IgG1-Antikörper Cetuximab bindet die Domäne III des *EGFR*. Cetuximab verhindert so zum einen die Bindung von Liganden und inhibiert zum anderen sterisch die Ausbildung der „offenen“ Rezeptorkonformation und somit die Dimerisierung von *EGFR* (Li *et al.*, 2005). Die Antikörper Cetuximab und Panituzumab wurden durch die FDA (*Food and Drug Administration*) für metastasierte kolorektale Karzinome bzw. für Kopf-Hals-Karzinome zugelassen (Amado *et al.*, 2008; Frampton, 2010; Qiu *et al.*, 2010). Zusätzlich wurden verschiedene Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt (z. B. Gefitinib, Erlotinib), welche intrazellulär die Bindung von ATP an die *EGFR*-Kinasedomäne verhindern und so die Signalweiterleitung inhibieren. Gefitinib und Erlotinib wurden dabei durch die FDA für die Therapie von nicht-

kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Pankreaskarzinomen zugelassen (Cohen *et al.*, 2003; Kelley und Ko, 2008; Kobayashi und Hagiwara, 2013).

1.5.8 Der ErbB-Rezeptor HER2

HER2 auch als ERBB2, NEU, NGL, TKR1, CD340, HER-2, MLN 19 oder HER-2/neu bezeichnet, zählt ebenfalls zur Subfamilie der ErbB-Rezeptoren bzw. zur Superfamilie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. HER2 ist ein 185 kDa großes transmembranes Glykoprotein. Das *HER2*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 17 an Position 12 lokalisiert (Chr. 17q12). Bis heute (Stand 09/2015) sind laut NCBI-Datenbank fünf HER2-Spleißvarianten bekannt (Variante 1: 4.664 bp; Variante 2: 4.889 bp; Variante 3: 5.940 bp; Variante 4: 4.411 bp; Variante 5: 2.590 bp).

Obwohl keine Liganden bekannt sind, die durch HER2 gebunden werden, ist dieser Rezeptor aufgrund seines konstitutiv exponierten Dimerisierungsarms der bevorzugte Interaktionspartner der übrigen ErbB-Rezeptoren (Graus-Porta *et al.*, 1997; Citri *et al.*, 2003; Eccles, 2011). Die extrazelluläre Domäne von HER2 unterscheidet sich deutlich von der der übrigen ErbB-Rezeptoren. Der Dimerisierungsarm der Domäne II ist konstitutiv exponiert, da es bei HER2 zu keiner Interaktion der Domäne II und IV kommt (Abb. 1-4 D). HER2 weist darüber hinaus eine spezielle Interaktion der Domäne I und III auf, welche die Bindung eines Liganden ausschließt (Hynes und Lane, 2005). HER2 unterscheidet sich in einer Position des Dimerisierungsarms der extrazellulären Domäne II von EGFR. EGFR weist in der Position 285 ein Arginin auf und ermöglicht so die Bildung von EGFR-Homodimeren. HER2 weist in der entsprechenden Position 291 jedoch ein Leucin auf. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich für das Fehlen von HER2-Homodimeren mitverantwortlich (Cho *et al.*, 2003; Roskoski, Jr., 2014). Eine starke Überexpression von HER2 kann jedoch möglicherweise zur Bildung aktiver HER2-Homodimere beitragen (Ghosh *et al.*, 2011).

HER2-Heterodimere zeigen eine starke und andauernde Stimulation nachgeschalteter Signalwege. Dies ist auf die sehr hohe basale Kinaseaktivität und die Fähigkeit von HER2 zurückzuführen, die Dissoziationsrate zwischen Liganden und den ErbB-Dimerpartnern zu verlangsamen (Tzahar *et al.*, 1996; Karunagaran *et al.*, 1996; Yarden und Sliwkowski, 2001). EGFR/HER2-Heterodimere werden zudem seltener endozytotisch degradiert (Moasser, 2007). Sie werden häufiger wiederverwertet und zurück zur Membran transportiert. Eine gesteigerte Expression von HER2 führt folglich zu einer Anreicherung von EGFR in der Zellmembran (Moasser, 2007). EGFR/HER2- und besonders HER2/HER3-Heterodimere weisen ein hohes onkogenes Potenzial auf, da die durch diese Heterodimere induzierte Signaltransduktion zu einer erheblichen Beschleunigung der Zellteilung von Tumorzellen führt (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996). Die Überexpression bzw. die Amplifikation von *HER2* fördert die neoplastische Transformation von Zellen. HER2 beeinflusst hierbei durch die

Modulation der zellulären Signaltransduktion und die Wirkung als Transkriptionsfaktor zellphysiologische Prozesse wie Zelladhäsion, Zellpolarität, Invasivität und Zellzyklusregulation (Graus-Porta *et al.*, 1997; Moasser, 2007).

HER2 weist in einer Vielzahl von Tumorentitäten eine prognostische Bedeutung auf. Eine Übersichtsarbeit zeigt in circa 80 % der Studien zu Blasen-, Mamma-, Cervix-, Endometrium-, Kopf-Hals-, Magen-, Ovarial- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten *HER2*-Genexpression und einem verkürzten Überleben der Patienten (Nicholson *et al.*, 2001). In Mamma- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen sind zudem die Amplifikation des *HER2*-Gens bzw. verschiedene aktivierende Mutationen der Kinasedomäne nachgewiesen (Yarden und Pines, 2012; Bose *et al.*, 2013). In Glioblastomen zeigt sich dagegen keine eindeutige prognostische Korrelation zwischen dem HER2 Proteingehalt und der Prognose der Patienten (Hiesiger *et al.*, 1993; Potti *et al.*, 2004a; Mineo *et al.*, 2007; Torp *et al.*, 2007).

Für die Behandlung HER2-positiver Tumoren stehen heute verschiedene Therapeutika zur Verfügung. Bei Trastuzumab handelt es sich um einen monoklonalen, humanisierten, therapeutischen IgG1 Antikörper, der an die Cystein reiche extrazelluläre Domänen IV des HER2 bindet (Hynes und Lane, 2005; Roskoski, Jr., 2014). In der Literatur sind verschiedene mögliche Wirkmechanismen für Trastuzumab beschrieben. Trastuzumab ist in der Lage über die Inhibierung der MAPK- und PI3K/AKT-Signalwege einen Zellzyklusarrest zu induzieren, das Zellwachstum und die Zellproliferation zu hemmen. Zusätzlich induziert Trastuzumab die Internalisation und Degradation von HER2. Darüber hinaus aktiviert Trastuzumab das Immunsystem über die Induktion der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC: *Antibody dependent cellular cytotoxicity*) (Vu und Claret, 2012). Trastuzumab wurde durch die FDA zum einen zur Behandlung des HER2 überexprimierenden metastasierten Adenokarzinoms des Magens und des Adenokarzinoms im Übergangsbereich von Speiseröhre und Magen zugelassen (Rose und Bekaii-Saab, 2011; Kordes *et al.*, 2014). Zum anderen ist Trastuzumab zur Therapie von HER2 überexprimierenden Mammakarzinomen zugelassen (Hudis, 2007; Moja *et al.*, 2012). Ein weiteres bereits durch die FDA zugelassenes Therapeutikum zur Behandlung von HER2 positiven Mammakarzinomen ist der duale EGFR/HER2 Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib (Moreira und Kaklamani, 2010).

1.6 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte einerseits der Einfluss der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren EGFR und HER2 auf zellphysiologische und radiobiologische Prozesse von Glioblastomzelllinien untersucht werden. Andererseits sollte die Eignung der Rezeptoren EGFR

und HER2 als prognostische Marker bei Glioblastom- und Weichteilsarkompatienten analysiert werden.

In *in vitro* Untersuchungen wurden die Rezeptoren EGFR und HER2 allein oder in Kombination, zum einen durch therapeutische Antikörper inhibiert. Zum anderen wurde die Genexpression von *EGFR* und *HER2* mittels spezifischer siRNAs vermindert. In den durchgeführten Untersuchungen wurde der Einfluss von EGFR und HER2 auf die Zellproliferation, den Zellzyklus, die Migration, das klonogene Zellüberleben, die Radiosensitivität und die Apoptose analysiert. Zusätzlich wurde der mRNA- und Proteingehalt der vier epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und ihrer Liganden untersucht. Des Weiteren wurden verschiedene Marker analysiert, die in die Prozesse der Migration, der Zellzyklusregulation und der Apoptoseinduktion involviert sind.

In *in vivo* Untersuchungen wurde der EGFR und HER2 mRNA- und Proteingehalt im Normal- und Tumorgewebe von Glioblastom- und Weichteilsarkompatienten bestimmt, um die prognostische, histopathologische und klinische Bedeutung des EGFR und HER2 mRNA- und Proteingehalts für Glioblastom- und Weichteilsarkompatienten zu untersuchen.

2 Material

2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei humane Glioblastomzelllinien untersucht (Tabelle 2-1). Die Kultivierung der Glioblastomzelllinien erfolgte in der Abteilung für Zell- und Gewebebezug der Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg. Die Zelllinie U251MG wurden von PD Dr. med. A. Söling (Zentrum Kinderheilkunde, Georg-August-Universität Göttingen) und die Zelllinie LN-229 von A. C. Diserens (Labor für Neurochirurgie, Lausanne, Schweiz) bezogen. Die Verifizierung der in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. U. D. Immel im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Halle.

Tabelle 2-1: Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	ATCC/DSMZ- Nummer	Referenzen
U251MG	humane Glioblastomzelllinie	ACC 325	(Ponten und Macintyre, 1968)
LN-229	humane Glioblastomzelllinie	CRL-2611	(Van Meir <i>et al.</i> , 1990)

2.2 Patientengut

Die Entnahme der Weichteilsarkome (WTS) und des nichttransformierten Normalgewebes erfolgte durch die Klinik für Allgemeinchirurgie Universität Halle-Wittenberg bzw. die Chirurgische Klinik und Poliklinik I Universitätsklinikum Leipzig (Herrn Prof. Dr. med. Würfl). Die standardisierte histopathologische Befundung der Weichteilsarkome durch den Pathologen Prof. Dr. H. J Holzhausen des Instituts für Pathologie Universität Halle-Wittenberg erfolgte gemäß der WHO-Klassifikation von 1993 (Enzinger *et al.*, 2001). Die Entnahme der Glioblastome und des nichttransformierten Normalgewebes erfolgte durch die Klinik für Allgemeinchirurgie Universität Halle-Wittenberg (Koordination durch Dr. Ariane Söling). Die standardisierte histopathologische Befundung der Glioblastome erfolgte durch den Pathologen Dr. Udo Bilkenroth. Die Entnahme der Gewebe erfolgte nach Zustimmung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Halle-Wittenberg. Die schriftliche Einwilligungserklärung aller Glioblastom- bzw. WTS-Patienten zur wissenschaftlichen Untersuchung der entnommenen Gewebeproben und für die Nutzung der dazugehörigen personenbezogenen klinischen Daten wurde eingeholt.

2.3 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumacetat	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
BD Clean	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
BD Flow	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
BD Rinse	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
BSA	Promega (Medison, USA)
Cetuximab (Erbix)	Merk (Darmstadt)
Chloroform	Merk (Darmstadt)
DAPI	Roth (Karlsruhe)
dNTPs	Bioline (Luckenwalde)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
EDTA	AppliChem (Darmstadt)
Entwickler	Nordenta (Hamburg)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (99,8 %)	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Fixierer	Nordenta (Hamburg)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Giemsalösung	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Halt™ Phosphatase Inhibitor <i>Cocktail</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
INTERFERin™	Biomol (Hamburg)
Isoton II (Puffer für Z2)	Beckman Coulter (Krefeld)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
LB <i>Broth Base</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
LB Agar	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
LDS-Probenpuffer	Thermo Fisher Scientific

	(Waltham, USA)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
MES SDS <i>Runnig Buffer</i> (20X)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Methanol	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumazid	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NuPAGE® <i>Sample Reducing Agent</i> (10X)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PageRuler™ Plus <i>Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PageRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PBS	Lonza (Walkersville, MD, USA)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin)
ProLong® Gold <i>Antifade Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Propidiumiodid	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Protease-Inhibitor- <i>Cocktail</i>	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
PVDF-Membran 0,45 µm	Roth (Karlsruhe)
Ribonuklease A	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
RIPA Puffer (10x)	Cell Signaling (Cambridge)
RPMI 1640 (25 mM HEPES und L-Glutamin)	Lonza (Walkersville, MD, USA)
Transferpuffer (20X)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Trastuzumab (Herceptin)	Roche (Basel, Switzerland)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
TRIzol®	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tween® 20	Serva (Heidelberg)
Wasser: Nuklease-frei, DEPC-behandelt	Roth (Karlsruhe)
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

2.4 Kits und Enzyme

Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega (Madison, USA)
ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
ECL™ Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
HER2/neu ELISA (REF 06489876)	Wilex Inc. (Cambridge, USA)
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen (Venlo, Niederlande)
INTERFERin™	biomol (Hamburg)
IMUBIND® Tissue PAI-1 ELISA (#821)	Sekisui Diagnostics, LLC (Lexington, USA)
IMUBIND® uPA ELISA (#894)	Sekisui Diagnostics, LLC (Lexington, USA)
IMUBIND® uPAR ELISA (#893)	Sekisui Diagnostics, LLC (Lexington, USA)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
One Shot® TOP10-Zellen (<i>E. coli</i>)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Protein-Assay-Kit (Bradford Reagenz)	Biorad (Richmond, USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TA Cloning® Kit (mit pCR® 2.1 Vector)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Venor®GeM Classic Mycoplasma PCR Detection Kit	Minerva Biolabs (Berlin)
ZR Plasmid Miniprep™ Classic Kit	Zymo Research (Irvine, USA)
ZR RNA MiniPrep™ Kit	Zymo Research (Irvine, USA)
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research (Irvine, USA)

2.5 Oligonukleotide und siRNA

Tabelle 2-2: Oligonukleotide

Gen	Sequenz der Primer 5'→3'	Orientierung	Lokalisation	NCBI Referenz Sequenz
EGF	5'-GCAGATGGGTCAATGCAACC-3'	<i>sense</i>	3816-3835	NM_001963.4
	5'-CCTTCAAGGGTCTGTGTCCC-3'	<i>antisense</i>	3982-3963	
EGFR	5'-TCAGCCTCCAGAGGATGTTT-3'	<i>sense</i>	392-411	NM_005228.3
	5'-GTGTTGAGGGCAATGAGGAC-3'	<i>antisense</i>	530-511	
CCND1	5'-GCCCAGGAGCTGCTGCAAAT-3'	<i>sense</i>	608-628	NM_053056.2
	5'-ATCGTGCGGGGTCATTGCGG-3'	<i>antisense</i>	686-667	
GAPDH	5'-CACCCACTCTCCACCTTTG-3'	<i>sense</i>	1041-1060	NM_002046.4
	5'-CCACCACCTGTTGCTGTAG-3'	<i>antisense</i>	1150-1131	
HB-EGF	5'-CTCCTCTCGGTGCGGGACCA-3'	<i>sense</i>	257-276	NM_001945.2
	5'-CGCCAGTCACCAGTGCCGAG-3'	<i>antisense</i>	345-326	
HER2	5'-GGCCGTGCTAGACAATGGAG-3'	<i>sense</i>	580-599	NM_004448.3
	5'-GGTTCCGCTGGATCAAGAC-3'	<i>antisense</i>	714-695	
HER3	5'-AGGGACATCGTGAGGGACCGA-3'	<i>sense</i>	766-786	NM_001982.2
	5'-AAGTGCCGGCAGGCAAAGCA-3'	<i>antisense</i>	1022-1003	
HPRT1	5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3'	<i>sense</i>	391-410	NM_000194.2
	5'-CTTGCGACCTGACCATCTT-3'	<i>sense</i>	652-633	
MMP2	5'-CAGCTGCACCACTGAGGGCC-3'	<i>antisense</i>	1220-1239	NM_004530.4
	5'-GGACATGGCGGTCTCAGGGC-3'	<i>sense</i>	1325-1306	
MMP10	5'-AGTTTGCTCATGCCTACCC-3'	<i>antisense</i>	572-591	NM_002425.2
	5'-GGGGAGGTCCGTAGAGAGAC-3'	<i>sense</i>	833-814	
POLR2A	5'-CTTGCCCCGTGCCATGCAGA-3'	<i>antisense</i>	1358-1377	NM_000937.4
	5'-CTCGCACCCGCGCTTCCTTG-3'	<i>sense</i>	1440-1421	
M13-rev	5'-AACAGCTATGACCATG-3	<i>antisense</i>	-----	

Tabelle 2-3: siRNAs

Ziel-mRNA	Bezeichnung der siRNA	Sequenz 5'→3'	Lokalisation
<i>EGFR</i>	EGFR-siRNA	5'-CGGAAUAGGUUUGGUGAA-3'	1260-1278
<i>HER2</i>	HER2-siRNA	5'-GAUCACAGGUUACCUAUAC-3'	1453-1471
<i>Luziferase</i>	Ko-siRNA	5'-CGUACGCGAAUACUUCGA-3'	

2.6 Antikörper

Tabelle 2-4: Primär- und Sekundärantikörper

Antigen	Klon	eingesetzte Konzentration	Ursprungsspezies	Hersteller
β-Aktin	AC-15	1:10.000	Maus	Sigma-Aldrich
gespaltenes PARP	Asp214	1:1.000	Kaninchen	Cell Signaling
EGFR	D38B1	1:1.000	Kaninchen	Cell Signaling
HER2	29D8	1:2.000	Kaninchen	Cell Signaling
Anti-Kaninchen IgG	P0446	1:1.000 - 1:5.000	Ziege	DAKO
Anti-Maus IgM	P0206	1:1.000 - 1:5.000	Kaninchen	DAKO

2.7 Puffer, Medien und Lösungen

2.7.1 Zellkultivierung

Kulturmedium RPMI komplett

500 ml RPMI 1640
 10 % FKS
 185 U/ml Penicillin
 185 µg/ml Streptomycin
 1 % Natriumpyruvat

2.7.2 Klonierung

Medium zur Kultivierung von *E. coli*

10 g LB Broth Base
 1 l Aqua Bidest
 Autoklavieren (15 min, 121 °C)

Agar Platten zur Kultivierung von *E. coli*

LB-Agar 35 g
 1 l Aqua Bidest
 Autoklavieren (15 min, 121 °C)
 Zusatz von Ampicillin (50 µg/ml)
 in Petrischalen ausgießen

2.7.3 Proteinisolation

RIPA-Lysepuffer

1:10 RIPA-Lösung
1:100 Proteinaseinhibitor
(frisch hinzugeben)
add Aqua Bidest

Giordano Puffer

0,02 M Tris
0,125 M NaCl
1 % Triton X-100
1:100 Phosphatase
Inhibitor Cocktail
1:100 Protease
Inhibitor-Cocktail
pH auf 8,5 einstellen

2.7.4 Western Blot

1x MES-Laufpuffer

50 ml MES (20x)
950 ml Aqua Bidest

1xTransferpuffer

50 ml Transferpuffer (20x)
100 ml Methanol
850 ml Aqua Bidest
bei 4 °C lagern

10xTBS [AK] (Antikörperinkubation)

1,5 M NaCl
0,5 M TrisHCl
pH auf 7,5 einstellen

10xTBS [W] (Waschpuffer)

5 M NaCl
0,5 M TrisHCl
pH auf 7,5 einstellen

1xTBST

100 ml PBS (10x)
1 ml Tween® 20
900 ml Aqua Bidest

Blockierungsreagenz	10 % Magermilchpulver bzw. 5 % BSA in TBS [AK]
Antikörperlösung	10 % Magermilchpulver bzw. 5 % BSA Antikörperkonzentration siehe Tabelle 2-4
“Strippingpuffer”	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % SDS 100 µM 2-Mercaptoethanol

2.7.5 Gelelektrophorese

TBE-Puffer (5x)	445 mM TRIS 445 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 8,0
1 %iges Agarosegel	100 ml 0,5x TBE-Puffer 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
Xylencyanolpuffer	18 % (w/v) Ficoll 400 0,25 % (w/v) Xylencyanol

2.7.6 Zellzyklusanalyse

Propidiumiodidpuffer	1 µg/ml Natriumcitrat 10 µM Na-EDTA 50 µg/ml Propidiumiodid 40–100 µg/ml Ribonuklease A gelöst in PBS
----------------------	---

2.8 Geräte und Verbrauchsmittel

Analysenwaage TE214S	Sartorius (Göttingen)
CL-XPosure Film	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Coulter Z2 Zell und Partikelzähler	Beckman Coulter (Krefeld)

Countess® Automated Cell Counter	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Einweghandschuhe	Ansell (Yarra City, Australien)
Einwegartikel für Zellkultur (Petrischalen Gewebekulturflaschen, Pipettenspitzen, Zentrifugationsröhrchen)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Elektrophorese Spannungsquelle EPS 301	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
FACScan Durchflusszytometer	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Fluoreszenzmikroskop BZ-8000	Keyence (Osaka, Japan)
Heracell™ CO2 <i>Incubator</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Inverses Labormikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Laminarbox Hera <i>Safe</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Magnetrührer	IKA-Labortechnik (Staufen)
Mikropipetten	Eppendorf (Hamburg)
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad (München)
MJ <i>Research</i> PTC-200 PCR <i>Thermal Cycler</i>	MJ Research (St. Bruno, Kanada)
Multiband UV-Tisch TCP-20.LC	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
NuPAGE® Bis-Tris 4-12 % Gradientengele	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Oncor-Linearbeschleuniger	Siemens (München)
PerfectBlue Gelsystem Mini M	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
pH-Meter	WTW inoLab (Weilheim)
Photometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad (München)
Pipetboy	Integra Biosciences (Fernwald)
Plattenreader GENios	Tecan (Gröding, Österreich)
PVDF-Membran (0,45 µm)	Millipore (Eschborn)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Rollenmischgerät SRT6D	Stuart (Stone, UK)

Rotor-Gene 6000, Real-Time PCR Cycler	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Schüttler SM30 & Inkubationshaube TH 30	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Schwenktisch HS 260 basic	IKA®-Werke (Staufen)
Sonopuls HD 2070	BANDELIN (Berlin)
<i>Thermocycler T1</i>	Biometra (Goettingen)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Schüttler	Scientific Industries, Inc (New York, USA)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Western Blot Elektrophorese Minigelkammersystem	
<i>XCell SureLock™ Mini-Cell</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Universal 32R	Hettich Lab Technology (Tuttlingen)

3 Methoden

3.1 Zellkultivierung

Die Glioblastomzelllinien wurden in Kompletmedium bestehend aus RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS, 1 % Natriumpyruvat, 185 U/ml Penicillin und 185 µg/ml Streptomycin bei 3 % CO₂ kultiviert. Die Kultivierung der Glioblastomzelllinien erfolgte in sterilen Kulturflaschen bei 37 °C und maximaler Luftfeuchtigkeit als adhärenente einschichtiger Zellrasen (*Monolayer*).

Die Passagierung der Glioblastomzelllinien erfolgte in unterschiedlichen, den experimentellen Gegebenheiten angepassten Verhältnissen. Dazu wurde das Medium dekantiert die Zellen mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen durch Inkubation mit 0,05 %iger Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst (5-10 min, 37 °C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium abgestoppt. Nach Zentrifugation der Zellen (4 min, 800 rpm) wurden die pelletierten Zellen in Zellkulturmedium resuspendiert und eine definierte Zellzahl in neue sterile Kulturflaschen inokuliert.

Zur Kryokonservierung wurden die durch Zentrifugation erhaltenen pelletierten Zellen in Gefriermedium (Kompletmedium + 20 % DMSO) aufgenommen, in Gefrierhörchen überführt bei -80 °C (24 h) gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Gefrierhörchen kurz in 37 °C warmem Wasser inkubiert, anschließend in 10 ml Zellkulturmedium überführt, zentrifugiert (4 min, 800 rpm), das Zellpellet in Kompletmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen inokuliert.

3.1.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch das Zellzählgerät (Z2 von Beckman-Coulter). Die trypsinierten (5-10 min) und zentrifugierten (4 min; 800 rpm) Zellen wurden hierzu in Zellkulturmedium resuspendiert und ein 100 µl Aliquot der Zellsuspension mittels Isoton II-Lösung (1:100) verdünnt. Der Schwellenwertbereich der detektierten Partikel liegt bei einem Durchmesser zwischen 10 µm und 37 µm. Im Anschluss an die Messung erfolgte die automatisierte Kalkulation der tatsächlichen Zellzahl der Ursprungszellsuspension.

3.1.2 Test auf Infektion mit Mykoplasmen

Um eine mögliche Kontamination der kultivierten Zelllinien mit Mykoplasmen festzustellen bzw. auszuschließen, wurden die in Kultur befindlichen Zellen regelmäßig mit Hilfe eines PCR basierten Mykoplasmen Detektionskits (Venor®GeM) auf den Befall mit Mykoplasmen getestet. Dazu wurden 500 µl Zellkulturüberstand in ein Reaktionsgefäß überführt, für 10 min bei 95 °C inkubiert und für 5 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die PCR Reaktion erfolgte mit Hilfe des in Tabelle 3-1 dargestellten Reaktionsansatzes und des in Tabelle 3-2 aufgelisteten Programms.

Tabelle 3-1: RCR-Reaktionsansatz für den Nachweis von Mykoplasmen

1x Ansatz	Volumen
steriles Aqua Bidest	15,3 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
Primer/Nukleotid Mix	2,5 µl
interne Kontroll-DNA	2,5 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Zellkulturüberstand	2 µl

Tabelle 3-2: Programm der Mykoplasmen PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Denaturierung	94 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Annealing	55 °C	30 sec	39
Synthese	72 °C	30 sec	
	4 °C	∞	

3.2 Inhibierung bzw. Reduktion der Genexpression von EGFR und HER2

3.2.1 Transfektion von siRNAs mittels INTERFERin™

Vor Beginn der Transfektion erfolgte die Kultivierung der Zellen (24 h) bis zum Erreichen einer 50-60 %igen Konfluenz. Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurde die siRNA mit RPMI* gemischt, mit dem Transfektionsreagenz INTERFERin™ versetzt, erneut gemischt, anschließend inkubiert (10 min) und nach Erneuerung des Kulturmediums tröpfchenweise zum Zellkulturmedium hinzugegeben (siehe Tabelle 3-3). Die siRNA-Konzentration im Medium betrug 50 nM.

Tabelle 3-3: Transfektionsansatz für die siRNA Transfektion mittels INTERFERin™

1x Ansatz	Volumen
Volumen siRNA-Stammlösung (100 µM)	1 µl
RPMI* zum Verdünnen der siRNAs	187 µl
INTERFERin™	12 µl
Volumen RPMI [#]	1,8 ml

RPMI*: RPMI 1640 + 1 % Na-Pyruvat.

RPMI[#]: RPMI 1640 + 1 % Na-Pyruvat + 10 % FKS + 185 U/ml Penicillin und 185 µg/ml Streptomycin.

3.2.2 Inhibierung von EGFR und HER2 mittels therapeutischer Antikörper

Die Glioblastomzelllinien U251MG und LN-229 wurden für 24 h, bis zum Erreichen einer 50-60 %igen Konfluenz in Zellkulturflaschen kultiviert und nachfolgend über den gesamten Kultivierungszeitraum hinweg mit 16 µg/ml Cetuximab (ungefähr 1-2 fache therapeutische Initialdosis) bzw. 8 µg/ml Trastuzumab (ungefähr 2 fache therapeutische Initialdosis) gelöst in RPMI-Kulturmedium inkubiert.

3.3 Bestrahlung

Die Bestrahlung (0 Gy, 2 Gy und 6 Gy) der Glioblastomzellen erfolgte in Zellkulturflaschen, 24 h nach Antikörper bzw. siRNA Inkubation mit 6 MeV Photonen an einem Siemens Oncor Linearbeschleuniger mit einer Dosisleistung von 2 Gy/min.

3.4 Zellkoloniebildungstest

Der Zellkoloniebildungstest dient der Analyse der Effekte einer Behandlung auf das klonale Überleben und damit auf die Teilungsfähigkeit von Zellen. Das Prinzip dieser Endpunktmessung ist die Bestimmung der Anzahl der Zellen, welche nach einer Behandlung teilungsfähig und somit in der Lage sind eine Zellkolonie zu bilden. Hierzu wurden Zellen mit einer Konfluenz von circa 60-80 % 24 h nach Behandlung (siRNA-Transfektion/Antikörperinkubation) trypsinisiert, zentrifugiert (4 min; 800 rpm) und resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl und dem Einstreuen einer optimalen Zellzahl in Kulturflaschen (geschlossener Deckel, ohne Filter) erfolgte die Kultivierung für 10-14 Tage. Zum Abstoppen des Zellkoloniebildungstests wurden die Kolonien mit 3,7 %iger Formaldehydlösung (20 min) fixiert, mit bidestilliertem Wasser gewaschen und nachfolgend mittels 10 %iger Giemsa Lösung (10 min) gefärbt. Nach zweifachem Waschen mit bidestilliertem Wasser und der anschließenden Trocknung der gefärbten Zellkolonien wurden diese makroskopisch ausgezählt (≥ 50 Zellen je Kolonie). Die absolute Plattiereffizienz errechnet sich

dabei als Quotient der gezählten Zellkolonien und der Anzahl der ursprünglich eingestreuten Zellzahl. Die Ermittlung des Dosis modifizierenden Faktors 10 (DMF10) dient der Bestimmung der Effekte der siRNA- bzw. Antikörperinkubation auf die Radiosensitivität beider Zelllinien. Die mathematische Bestimmung des DMF10 aus den relativen Überlebensfraktionen erfolgte mit Hilfe eines linear-quadratischen-Modells [$SF = \exp(-\alpha D + \beta D^2)$]. Der DMF10 definiert dabei die relative Wirkungsmodifikation einer Behandlung im Vergleich zur Kontrolle, um die relative Überlebensfraktion einer Zelllinie durch Bestrahlung auf 10 % zu senken. Ein DMF10 größer eins indiziert dabei eine Radiosensitivierung und ein DMF10 kleiner eins eine Radioresistenz.

3.5 Vitalitätstest

Das Prinzip des Vitalitätstests mittels Trypanblau beruht auf dem Prinzip der veränderten Membranpermeabilität abgestorbener Zellen. Da die Membran lebender Zellen normalerweise nicht permeabel ist, werden diese durch den Farbstoff Trypanblau nicht gefärbt und erscheinen deshalb weiß. Abgestorbene Zellen werden dagegen dunkelblau angefärbt. Hierzu wurden trypsinierte Zellen im Verhältnis 1:1 mit 0,4 % Trypanblaulösung gemischt und auf einen *Countess® Cell Counting Chamber Slide* aufgebracht. Der Anteil der ungefärbten und damit vitalen Zellen wurde unmittelbar und automatisiert mit Hilfe eines *Countess® Automated Cell Counter* bestimmt.

3.6 Apoptoseanalyse

3.6.1 Quantifizierung der Apoptose mittels DAPI-Färbung

Die Zellen wurden hierzu trypsiniert, gemeinsam mit dem Kulturüberstand zentrifugiert (5 min; 1000 rpm), in PBS resuspendiert, nachfolgend mit 80 %igem Ethanol fixiert und bei -20 °C gelagert. Mit Hilfe einer Cytospinkammer erfolgte die Zentrifugation der fixierten Zellen (circa $2-5 \times 10^4$) auf Objektträger (5 min; 1.500 rpm). Nach entfernen des Überstands, erneuter Zentrifugation (2 min; 1.500 rpm) und anschließender Lufttrocknung (5 min) erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid) unter Lichtausschluss (0,1 µg/ml PBS; 5 min). Nachdem die Objektträger mit PBS gewaschen und luftgetrocknet wurden, erfolgte die Überschichtung der gefärbten Zellen mit *ProLong® Gold Antifade Reagent* und Abdeckung mittels Deckglas. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4 °C unter Lichtausschluss. Die Auszählung und morphologische Begutachtung der apoptotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops BZ-8000. Die Apoptoserate beschreibt das Verhältnis apoptotischer Zellkerne zur Gesamtzahl der Zellkerne.

3.6.2 Caspase-Glo® 3/7 Assay

Die Zellen wurden hierzu trypsiniert, gemeinsam mit dem Kulturüberstand zentrifugiert (5 min; 1000 rpm) in RPMI-Kulturmedium resuspendiert, gezählt und 20.000 Zellen in 100 µl in RPMI-Kulturmedium in eine 96-Wellplatte überführt und nachfolgend mit *Caspase-Glo® 3/7 Reagent* versetzt. Nach Mischen der Zellen mit dem *Caspase-Glo® 3/7 Reagent* in der 96-Wellplatte (30 sec, 600 rpm) und Inkubation (1,5 h) bei Raumtemperatur im Dunklen erfolgte die Bestimmung der Lumineszenz mittels eines Tecan-Plattenreaders.

3.7 Analyse des mRNA-Gehalts ausgewählter Gene

3.7.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Zur RNA-Isolation mit Hilfe des *ZR RNA MiniPrep™ Kits* von Zymo Research wurden zuvor pelletierte Zellen (4 min, 800 rpm) in 400 µl RNA Lysis Puffer resuspendiert, zentrifugiert (12.000 g, 1 min) und das Zentrifugat auf eine Zymo-Spin IIC Säule überführt und erneut zentrifugiert (8.000 g, 30 sec). Das Zentrifugat wurde mit 0,8 Volumen Ethanol (95-100 %) gemischt, auf eine Zymo-Spin IIC Säule überführt und anschließend zentrifugiert (12.000 g, 1 min). Die Zymo-Spin Säule wurde im Anschluss mit 400 µl *RNA Prep Buffer* beladen, zentrifugiert (12.000 g, 1 min), nachfolgend mit 800 µl RNA Wasch Puffer beladen und zentrifugiert (12.000 g, 30 sec). Nachdem die Säule wiederholt mit 400 µl RNA Wasch Puffer beladen und zentrifugiert (12.000 g, 30 sec) wurde, erfolgte die Trocknung der Säule durch erneute Zentrifugation (12.000 g, 2 min). Die Säule wurde anschließend mit 25 µl DNase/RNase-freiem Wasser beladen und für 1 min inkubiert. Die RNA wurde dann durch Zentrifugation von der Säule eluiert (10.000 g, 30 sec) und bei -80 °C gelagert.

3.7.2 Isolation von Gesamt-RNA aus Tumormaterial

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus 35 µm dicken Gefrierschnitten wurden diese auf Trockeneis gekühlt, mit 1 ml Trizol-Reagenz versetzt, gründlich durchmischt, bei RT inkubiert (2 min), mit 200 µl Chloroform versetzt, erneut kräftig geschüttelt und bei RT inkubiert (3 min). Die Probeseperation in untere (Phenol/Chloroform Phase), Interphase und obere wässrige Phase (enthält RNA) erfolgte durch Zentrifugation (4 °C, 15 min; maximale Drehzahl). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit einem Gemisch aus 70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase versetzt und bei RT inkubiert (15 min). Nach Zugabe von 500 µl Isopropanol und Inkubation über Nacht bei -20 °C erfolgte die Pelletierung der präzipitierten RNA durch Zentrifugation (4 °C, 10 min; maximale Drehzahl). Die RNA wurde anschließend zweimal mit 1 ml eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen,

luftgetrocknet, nachfolgend in 20-50 µl RNase/DNase-freiem Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.7.3 Reinigung von Gesamt-RNA nach Trizol-Isolation

Die in Wasser gelöste RNA wurde mit 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen eiskaltem 96 %igem Ethanol versetzt, gut durchmischt, bei -20 °C für 1 h präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert (4 °C, 20 min; 12.000 g), zweimal mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und für 2-3 min bei 40 °C getrocknet. Das getrocknete RNA Pellet wurde in 20-60 µl RNase/DNase-freiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.7.4 RNA-Quantifizierung

Zur photometrischen Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm der 1:50 verdünnten Proben bestimmt. Als Referenzlösung diente RNase-freies Wasser. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe der folgenden Formel:

RNA-Konzentration in ng/µl \triangleq OD_{260nm} x 50 (Verdünnungsfaktor) x 40

Der Faktor 40 stellt dabei einem Richtwert da:

1 OD_{260nm} \triangleq 40ng RNA/ml Lösung

Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt die Reinheit der RNA-Präparation an. Bei hoher Reinheit liegt diese zwischen 1,8 und 2,0.

3.7.5 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase

Die cDNA-Synthese aus 0,25-2 µg Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits* (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung von *Random Primer*. Der Hybridisierungsansatz (Tabelle 3-4) wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, auf Eis gekühlt und im Anschluss durch Zugabe von 8 µl Mastermix (Tabelle 3-5) komplementiert.

Tabelle 3-4: Hybridisierungsansatz für die cDNA-Synthese

1x Hybridisierungsansatz	Volumen (12 µl)
RNA (0,25 µg bzw. 2 µg)	x µl
Random Primer (150 ng/µl)	1 µl
H ₂ O	y µl

Tabelle 3-5: Zusammensetzung des Master Mix für die cDNA-Synthese

1x Mastermix	Volumen
5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid h Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1 µl

Das Programm für die cDNA Synthese ist in Tabelle 3-6 dargestellt. Die längerfristige Lagerung der cDNA erfolgte bei -80 °C.

Tabelle 3-6: cDNA-Synthese Programm

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	5 min	65 °C
Primer <i>Annealing</i>	5 min	25 °C
Synthese	60 min	42 °C
Reaktionsabschluss	5 min	70 °C

3.7.6 qPCR mittels QuantiTect SYBR Green PCR Kit

Die Analyse des mRNA-Gehalts verschiedener Gene erfolgte durch quantitative *real-time-PCR*, mit Hilfe des *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix Kits*, nach dem in Tabelle 3-7 dargestellten Schemata.

Tabelle 3-7: Maxima SYBR Green qPCR-Ansatz

1x Ansatz	Volumen
H ₂ O	6 µl
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	7,5 µl
Forward bzw. Reverse Primer (20 µM)	0,25 µl
Template	1 µl

Das Programm für die quantitative *real-time-PCR* Synthese ist in Tabelle 3-8 dargestellt.

Tabelle 3-8: qPCR-Programm

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
1	15 min	95 °C	1
2	30 sec	95 °C	
3	30 sec	60 °C	39
4	30 sec	72 °C	
5	15 sec	72 °C - 95 °C	1

Die absolute Quantifizierung des mRNA-Gehalts erfolgte mit Hilfe eines mitgeführten Plasmid Standards. Zur Normierung des mRNA-Gehalts wurden Referenzgene sogenannte *house-keeping genes* wie *Aktin*, *GAPDH*, *POLR2A* bzw. *HPRT1* herangezogen. Zur Identifizierung eines geeigneten Referenzgens für die verwendeten Zelllinien bzw. für Analyse des Tumormaterials der Weichteilsarkom- bzw. Glioblastompatienten diente der Algorithmus „NormFinder“ (*Molecular Diagnostic Laboratory, Department of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Aarhus, Dänemark*).

3.7.7 Herstellung von Plasmid Standards zur absoluten qPCR Quantifizierung

3.7.7.1 Amplifikation von cDNA Fragmenten

Zur Generierung von Plasmid Standards wurden DNA-Fragmente durch konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR) aus entsprechenden cDNAs mittels des *HotStarTaq DNA Polymerase-Kits* (Qiagen) amplifiziert und in pCR2.1-Vektoren kloniert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 3-9 gezeigt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 3-10 ersichtlich.

Tabelle 3-9: Zusammensetzung PCR-Mastermix

1x Ansatz	Volumen
H ₂ O	12,4 µl
Q-Solution	5 µl
10x Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Forward bzw. Reverse Primer (20 µM)	0,25 µl
HotStarTaq	0,1 µl
Template (cDNA)	1 µl

Tabelle 3-10: Programm der PCR

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
1	15 min	95 °C	1
2	30 s	95 °C	
3	30 s	z. B. 60 °C	39
4	30 s	72 °C	
5	5 min	72 °C	1
6	∞	4 °C	1

3.7.7.2 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 15 µl PCR-Amplifikat mit 5 µl Xylencyanolpuffer gemischt und entsprechend der erwarteten Fragmentlänge in einem mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzten 1-2 %igen Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer mit 1x TBE-Puffer gefüllten Gelkammer durch Anlegen einer Spannung von 90 V. Die Visualisierung bzw. das Ausschneiden der DNA-Fragmente erfolgte unter UV-Licht. Ein mitgeführter DNA-Längenstandard (PageRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder) diente der Größenbestimmung der PCR-Amplifikate.

3.7.7.3 Gel-Extraktion und Aufreinigung der PCR-Produkte

Der *QIAquick Gel Extraction Kit* von Qiagen diente der Extraktion und Aufreinigung der PCR-Amplifikate. Die aus dem Agarosegel ausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden mit 3 Volumen QG-Puffer versetzt, für 10 min im Thermomixer bis zur vollständigen Auflösung des Agarosegels geschüttelt (50 °C, 300 rpm), mit 1 Volumen Isopropanol vermischt, das Gemisch auf eine Säule

geben und im Anschluss zentrifugiert (1 min, 13.000 rpm). Die Säule wurde nachfolgend mit 0,5 ml QG-Puffer (1 min, 13.000 rpm) und 0,75 ml PE-Puffer gewaschen (1 min, 13.000 rpm), mit 30 µl DEPC-H₂O inkubiert (5 min) und die auf der Säule gebundene DNA durch Zentrifugation von der Säule eluiert (1 min, 13.000 rpm).

3.7.7.4 Ligation

Die Ligation der PCR-Fragmente in einen pCR[®]2.1 Vector erfolgte über Nacht bei 16 °C nach dem in Tabelle 3-11 dargestellten Reaktionsansatz.

Tabelle 3-11: Zusammensetzung des Ligationsansatzes

1x Ansatz	Volumen
PCR-Produkt (1:10 verdünnt)	3 µl
steriles H ₂ O	3 µl
10x Ligationspuffer	1 µl
pCR [®] 2.1 Vector (25 ng/µl)	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

3.7.7.5 Klonierung

Auf Eis gekühlte *Top10 E. coli* wurden mit 2 µl Ligationsansatz versetzt, für 30 min auf Eis inkubiert, hitzegeschockt (30 s, 42 °C), kurz auf Eis inkubiert und nachfolgend in SOC-Medium vorkultiviert (1 h, 37 °C, 500 rpm). Nachfolgend wurden die *Top10 E. coli* auf Ampicillin (100 µg/ml) haltigen und mit X-Gal beschichteten LB-Agar-Platten mittels Drigalskispatel ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C kultiviert und positive Klone nachfolgend mittels sterilem Zahnstochern in Ampicillin (100 µg/ml) haltiges LB-Medium überführt und über Nacht kultiviert (37 °C, 200 U/min).

3.7.7.6 Plasmidextraktion

Zur Plasmidextraktion mit Hilfe des ZR Plasmid Miniprep Kit-Classic (Zymo Research) wurden über Nacht kultivierte *Top10 E. coli* zentrifugiert (10 min, 4.000 rpm), das Zellpellet in 200 µl P1-Puffer resuspendiert, nacheinander sorgfältig mit 200 µl P2-Puffer und 400 µl P3-Puffer vermengt, das Gemisch zentrifugiert (3 min, 16.000 g) und der Überstand auf eine Zymo-spin IIN Säule überführt. Nach Zentrifugation (30 s, 16.000 g) wurde die Säule nacheinander mit 200 µl Endo Puffer (15 s, 16.000 g) und 400 µl Plasmid Puffer (30 s, 16.000 g) gewaschen, die Säule mit 30 µl DEPC-H₂O inkubiert und die auf der Säule gebundene Plasmid-DNA durch Zentrifugation von der Säule eluiert (15 sec, 16.000 g).

3.7.7.7 Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenz der in die pCR2.1-Vektoren klonierten DNA-Fragmente wurden diese sequenziert. Der Ansatz der durch die Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführten Sequenzierung ist in Tabelle 3-12 dargestellt.

Tabelle 3-12: Zusammensetzung des Sequenzierungsansatzes

1x Ansatz	Volumen (7 µl)
TrisHCL pH 8,5 (10 mM)	x µl
Plasmid-DNA (700 ng)	y µl
M13 Primer rev (20 µM)	1 µl

3.8 Spezifische Mengenanalyse von Proteinen

3.8.1 Proteinisolation aus Zellkulturen

Die trypsinierten und pelletierten Zellen wurden in RIPA-Puffer resuspendiert, auf Eis inkubiert (15 min), mittels Ultraschall homogenisiert (SONOPULS HD 2070; 2x 3 sec mit halbmaximaler Frequenz, bei 4 °C) erneut auf Eis inkubiert (10 min), zentrifugiert (10 min, 13.000 rpm) der Überstand abgenommen und dieser bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe der Bradfordmethode wurden 998 µl einer 1:5 verdünnten Bradfordreagenzlösung mit 2 µl Proteinlysate versetzt, vorsichtig durchmischt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach der photometrischen Bestimmung der Extinktion bei 595 nm erfolgte die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe einer Eichkurve.

3.8.3 Western Blot Analyse

3.8.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Nach Zusatz von LDS-Probenpuffer und NuPAGE® *Sample Reducing Agent* zu 50-60 µg Gesamtprotein (siehe Tabelle 3-13) erfolgte die Denaturierung der Proteinproben (95 °C für 5 min) und nachfolgend die größenabhängige elektrophoretische Auftrennung der Proben mit Hilfe von 4-12 %igen NuPAGE® Bis-Tris Gradientengelen in einer mit 1x MES-Laufpuffer gefüllten XCell SureLock™ Mini-Cell Gelkammer (120 V, 4 °C). Zur Ermittlung des Molekulargewichts der

detektierten Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*; Thermo Fisher Scientific).

Tabelle 3-13: Zusammensetzung der Proteinproben

1x Ansatz	Volumen
Proteinlysat (entsprechend 50-60 µg Protein)	x µl
4x LDS-Probenpuffer	5 µl
10x NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)	2 µl

3.8.3.2 Transfer

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nachfolgend mit Hilfe des Tank-Blot-Verfahrens in einer mit 1x Transferpuffer gefüllten Kammer *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran übertragen (150 V, 2,5 h, 4 °C).

3.8.3.3 Immundetektion

Nach Blockierung der Membran mit 10 %igen Milchpulver/TBST (1 h) erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (über Nacht, 4 °C). Die Antikörperkonzentrationen sind in Tabelle 2-4 dargestellt. Nach dreimaligem Waschen (5 min) erfolgte die Inkubation der Membran mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1 h, 4 °C). Nach erneutem dreimaligem Waschen (5 min) erfolgte die Visualisierung mittels ECL- bzw. ECL-Prime-Lösung und eines photoempfindlichen Röntgenfilms in der Dunkelkammer. Der Proteingehalt von β -Aktin diente zur Normalisierung des Proteingehalts der gemessenen Marker.

3.8.3.4 Stripping

Um gebundene primäre und sekundäre Antikörper von bereits entwickelten Western Blot Membran zu entfernen wurden diese mit einem „Strippingpuffer“ inkubiert (30 min, 50 °C), viermal gründliche mit TBST gewaschen (5 min) und danach erneut mit 10 %igen Milchpulver/TBST blockiert (1 h).

3.8.4 Quantitative uPA, uPAR und PAI-1 Protein Bestimmung aus Gesamtproteinlysat

Die Bestimmung des PAI-1, uPAR bzw. uPA Proteingehalts im Gesamtproteinlysat aus Zellkulturen erfolgte mit Hilfe spezifischer ELISA (Worldwide HQ, Sekisui Diagnostics, LLC; Lexington, USA) durch die Arbeitsgruppe von Dr. Matthias Kotzsch (Institut für Pathologie, Technische Universität Dresden) nach den Angaben des Herstellers. Die Normalisierung des PAI-1, uPAR bzw. uPA Proteingehalts erfolgte zum Totalproteingehalt.

3.8.5 Proteinisolation aus Tumorgewebe

Zur Isolation von Gesamtproteinextrakt auf gefrorenem Tumorgewebe wurde 25 µm Gewebeschnitte mittels Standard Cryostat angefertigt, diese mit Giordano Puffer auf Eis inkubiert (30 min) und anschließend mittels Ultraschall homogenisiert (SONOPULS HD 2070; 30 sec bei 4 °C mit halbmaximaler Frequenz), das homogenisierte Proteinlysate zentrifugiert (15.000 rpm, 4 °C) und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.8.5.1 Quantitative EGFR Protein Bestimmung

Die Bestimmung des tumorspezifischen EGFR Proteingehalts erfolgte mit Hilfe eines EGFR spezifischen ELISA (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) nach den Angaben des Herstellers (Analytischer Messbereich: 0,16-10 ng/ml; Sensitivität: 0,1 ng/ml). Dazu wurde das Gesamtproteinlysate mit ELISA-Diluent 1:5 bzw. 1:10 verdünnt, gründlich gemischt, je 100 µl der verdünnten Proben, des verdünnten EGFR-Standards und des Leerwerts in eine 96 Well Platte überführt und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die 96 Well Platte viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen, jedes Well mit 100 µl Detektionsantikörper schüttelnd inkubiert (1 h, 37 °C), erneut viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen, nachfolgend mit 100 µl des 1:100 verdünnten anti-Rabbit IgG HRP Antikörperkonjugats schüttelnd inkubiert (45 min, RT) und wiederum viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Nachdem jedes Well mit 100 µl TMB-Lösung bestückt wurde (45 min, im Dunkeln, RT) erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung und die unmittelbare Bestimmung der Extinktion bei 450 nm mit Hilfe eines Tecan Plattenreader. Die Normalisierung des EGFR Proteingehalts erfolgte zum Totalproteingehalt.

3.8.5.2 Quantitative HER2 Protein Bestimmung

Die Bestimmung des tumorspezifischen HER2 Proteingehalts erfolgte mit Hilfe eines HER2 spezifischen ELISA (Wilex Inc., Cambridge, MA, USA) nach den Angaben des Herstellers (Analytischer Messbereich: 0-35 ng/ml; Sensitivität: 1,5 ng/ml). Dazu wurden das Gesamtproteinlysate und alle Kontrollen 1:50 mit Proben-Diluent verdünnt, gründlich gemischt und 100 µl der verdünnten Proben, der verdünnten Kontrollen und des bereits vorverdünnten HER2-Standards in eine 96 Well Platte überführt für 3 h bei 37 °C inkubiert, nachfolgend fünfmal mittels Waschpuffer gewaschen, jedes Well mit Ausnahme der Substratleerbestimmung mit 100 µl Detektor-Antikörper inkubiert (1 h, 37 °C), erneut fünfmal gewaschen, jedes Well mit Ausnahme der Substrat-Leerbestimmung mit 100 µl Arbeitskonjugat inkubiert (30 min, RT) und erneut fünfmal gewaschen. Nachdem jedes Well mit je 100 µl Arbeitssubstratlösung bestückt wurde (45 min, im Dunkeln, RT), erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 µl

Stopplösung und die unmittelbare Bestimmung der Extinktion bei 490 nm mittels Tecan Plattenreader. Die Normalisierung des HER2 Proteingehalts erfolgte zum Totalproteingehalt.

3.9 Zellmigrationsassay

Zur Bestimmung der Migrationsrate der Glioblastomzellen mittels Wundheilungsassay (*Scratch-Assay*) wurden Zellen in 24-Well Platten kultiviert (24 h), nachfolgend wie in Abschnitt 3.2 beschrieben behandelt und für weitere 48 h bis zum Erreichen einer 100 %igen Konfluenz inkubiert. Nachfolgend wurde mit Hilfe einer 200 µl Pipettenspitze vorsichtig ein zellfreier Raum geschaffen, frei flottierende Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die verbliebenen Zellen nachfolgend für weitere 16-20 h in RPMI Medium kultiviert. Die Bewertung der relativen Migrationsrate erfolgte mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop CS6. Hierzu wurden Bilder zum Beginn (0 h) und zum Ende (16-20 h) der Untersuchungen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops BZ-8000 aufgenommen und die initiale und die finale Wundfläche bestimmt. Die relative Migrationsrate wurde dann aus der Änderung der Wundfläche errechnet.

3.10 Zellzyklus Analyse

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils der Glioblastomzellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurden diese nach Behandlung wie in Abschnitt 3.1 beschrieben trypsinisiert, in PBS resuspendiert, mit 95 % Ethanol fixiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert. Die fixierten Zellen wurden pelletiert (5 min, 1.500 rpm) zweimal mit PBS gewaschen (5 min, 1.500 rpm), erneut in 150 µl PBS resuspendiert, die Zellkerne nachfolgend durch Inkubation mit Propidiumiodidpuffer (Abschnitt 2.7.6) gefärbt (10 min, 37 °C) und die Zellen in einem Becton Dickinson FACScan Durchflusszytometer auf ihre DNA-Propidiumiodid Fluoreszenz hin untersucht. Anhand des DNA-Anteils der Zellen wurde mit Hilfe des Programms ModFit (Verity Software House, Inc., Topsham, ME) die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G0/G1, S und G2/M) analysiert.

3.11 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) und PASW Statistics 22 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Der ungepaarte Student's t-Test wurde genutzt, um statistische signifikante Unterschiede zw. dem Mittelwert einer Behandlung und dem Mittelwert der unbehandelten Kontrolle zu bestimmen. Eine Wahrscheinlichkeit von $\geq 95\%$ ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) wurde dabei als signifikant angesehen. Alle Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der unbehandelten Kontrollen angegeben deren Wert

willkürlich auf 100 % festgesetzt wurde. Die unbehandelte Kontrolle und nicht die *Nonsense* siRNA Kontrolle wurde als Referenz Kontrolle ausgewählt, um einen direkten Vergleich der siRNA- und Antikörper Behandlungen zu ermöglichen. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

Es wurden Kaplan Meier Analysen, univariate bzw. multivariate Cox' Regressionsanalyse durchgeführt, mit dem tumorspezifischen Überleben (WTS-Patienten) bzw. dem Gesamtüberleben (Glioblastompatienten) als abhängige Variablen, um die prognostische Bedeutung von EGFR und HER2 auf mRNA- bzw. Protein-Ebene zu analysieren. In den multivariaten Cox' Regressionsanalysen wurden folgende Kovariaten genutzt: WTS-Patientenkohorte: (Tumorstadium, Tumorentität, Resektionsart und Tumorlokalisation) Glioblastompatientenkohorte: (Tumorresektion und Karnofsky Index). Der Log-rank Test diente in den Kaplan-Meier Überlebensanalysen dem statistischen Vergleich des Überlebens der einzelnen Patienten Untergruppen. Der mediane bzw. tertiale mRNA- und Proteingehalt von EGFR und HER2 dienten als Schwellenwert für die Überlebensanalysen und die Korrelationen mit klinischen Parametern. Die nichtparametrische Korrelation nach Spearman diente zur Bewertung einer signifikanten Korrelation zwischen dem mRNA- bzw. Proteingehalt von EGFR und HER2. Der Fisher's Exakt Test diente der Beurteilung signifikanter Assoziationen zwischen dem mRNA- bzw. Proteingehalt von EGFR und HER2 und klinikopathologischen Parametern. Der Wilcoxon Rang Test bzw. der Mann-Whitney-U-Test diente dem statistischen Vergleich des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts zwischen dem Tumor- und dem angrenzenden Normalgewebe. ROC-Kurven (Receiver Operating Characteristic) dienten der Beurteilung der Diskriminierungskraft des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts zur korrekten Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und tumorassoziiertem Normalgewebe in WTS- und Glioblastompatienten. Die Fläche unter der Kurve (AUC: Area under the curve) gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine fehlerlose Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und tumorassoziiertem Normalgewebe möglich ist. Die Interpretation der Diskriminierungskraft der AUC-Werte erfolgte entsprechend der nachstehenden Einteilung: 0,50-0,60 \triangleq nicht ausreichend, > 0,60-0,70 \triangleq gering, > 0,70-0,80 \triangleq ausreichend, > 0,80-0,90 \triangleq gut, > 0,90-1,00 \triangleq exzellent [Interpreting Diagnostic Tests. Thomas G. Tape, MD. (University of Nebraska Medical Center) <http://gim.unmc.edu/dxtests/ROC3.htm>]. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Bedeutung von EGFR und HER2 in Glioblastomzelllinien

EGFR und die weiteren Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie (HER2-4) sind bekannte Regulatoren der Proliferation, Differenzierung, Zellmigration und Apoptose von Tumorzellen (Yarden, 2001). Darüber hinaus ist die Amplifikation des *EGFR*-Gens mit circa 36 % eine der häufigsten genetischen Veränderungen in primären Glioblastomen (Ohgaki und Kleihues, 2007; Mineo *et al.*, 2007). Der bevorzugte Dimerisierungspartner des EGFR ist der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor HER2. Untersuchungen zeigen außerdem, dass die Expression von HER2 mit zunehmender maligner Transformation von Astrozyten ansteigt (Mineo *et al.*, 2006). In den eigenen Untersuchungen wurde deshalb der Einfluss von EGFR und HER2 auf zellphysiologische und radiobiologische Prozesse in der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG analysiert. Hierzu wurden die Rezeptoren einerseits mittels therapeutischer monoklonaler Antikörper inhibiert (Cetuximab: inhibiert EGFR; Trastuzumab: inhibiert HER2), andererseits erfolgte die Reduktion der *EGFR*- und *HER2*-Genexpression mit Hilfe spezifischer siRNAs. Für beide Strategien wurden die Effekte sowohl nach alleiniger als auch nach simultaner Inhibierung von EGFR und HER2 analysiert. Um den Einfluss und die Effizienz der beiden Strategien auf zellphysiologische Prozesse beurteilen zu können wurden Analysen zu Proliferation, Migration, klonogenem Zellüberleben, Radiosensitivität und Apoptose durchgeführt.

4.1.1 Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den mRNA-Gehalt von ErbB-Rezeptoren

Um die Effekte der Antikörperinkubation bzw. der siRNA-Transfektion auf den mRNA-Gehalt der ErbB-Rezeptoren (Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog) EGFR, HER2, HER3 und HER4 zu quantifizieren, wurde der mRNA-Gehalt der Rezeptoren mittels quantitativer *real-time-PCR* (qPCR) bestimmt (Tabelle 4-1). Die Normalisierung des mRNA-Gehalts der ErbB-Rezeptoren erfolgte zum *GAPDH* mRNA-Gehalt (siehe Abschnitt 3.7.6). Die Analyse der unbehandelten Kontrolle zeigt für die Glioblastomzelllinie LN-229 einen ähnlich hohen *EGFR* und *HER2* mRNA-Gehalt. In der unbehandelten Kontrolle der Glioblastomzelllinie U251MG ist die *HER2* mRNA-Gehalt dagegen viermal höher als der mRNA-Gehalt von *EGFR*. Darüber hinaus unterscheidet sich der *HER3* mRNA-Gehalt beider Zelllinien deutlich. So weist die Zelllinie LN-229 einen etwa 400-fach höheren *HER3* mRNA-Gehalt auf als die Zelllinie U251MG. Der *HER4* mRNA-Gehalt ist bei beiden Glioblastomzelllinien ähnlich niedrig exprimiert. Der *HER4* mRNA-Gehalt liegt deutlich

unter dem mRNA-Gehalt von *EGFR* bzw. *HER2* und wurde deshalb im Folgenden nicht weiter untersucht.

Tabelle 4-1: mRNA-Gehalt der vier ErbB-Rezeptoren

mRNA	LN-229	U251MG
<i>EGFR</i>	$3,8 \cdot 10^{-2} \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-2} \pm 5,6 \cdot 10^{-3}$
<i>HER2</i>	$2,3 \cdot 10^{-2} \pm 1,1 \cdot 10^{-2}$	$6,4 \cdot 10^{-2} \pm 1,3 \cdot 10^{-2}$
<i>HER3</i>	$3,0 \cdot 10^{-1} \pm 3,3 \cdot 10^{-2}$	$7,6 \cdot 10^{-4} \pm 2,4 \cdot 10^{-4}$
<i>HER4</i>	$2,6 \cdot 10^{-4} \pm 3,6 \cdot 10^{-5}$	$3,9 \cdot 10^{-4} \pm 1,7 \cdot 10^{-4}$

Einheit: Kopien *ErbB-Rezeptor* je Kopie *GAPDH*.

Die alleinige bzw. die kombinierte Inkubation der Zelllinien LN-229 und U251MG mit den Antikörpern Cetuximab (therapeutischer monoklonaler Antikörper gegen *EGFR*) bzw. Trastuzumab (therapeutischer monoklonaler Antikörper gegen *HER2*) führt zu keiner Veränderung des mRNA-Gehalts von *EGFR*, *HER2* bzw. der *HER3* (Abb. 4-1).

Die Transfektion der *EGFR*- bzw. *HER2*-siRNA führt demgegenüber zu einer circa 80 %igen Reduktion des mRNA-Gehalts von *EGFR* bzw. *HER2* (Abb. 4-1). Die Reduktion des *EGFR* mRNA-Gehalts ist in LN-229 und U251MG Zellen bei simultaner Transfektion der *EGFR*- und *HER2*-siRNA ähnlich stark wie bei alleiniger Transfektion der *EGFR*-siRNA (Abb. 4-1). Die Reduktion des *HER2* mRNA-Gehalts ist dagegen in beiden Zelllinien bei simultaner Transfektion der *EGFR*- und *HER2*-siRNA deutlich geringer ausgeprägt, als bei alleiniger Transfektion der *HER2*-siRNA (Abb. 4-1).

Nach der alleinigen Transfektion der *EGFR*-siRNA zeigt sich in LN-229 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein circa 1,9 facher Anstieg des *HER2* mRNA-Gehalts. Nach der alleinigen bzw. der kombinierten Transfektion der *EGFR*-siRNA bzw. der *EGFR*- und *HER2*-siRNA zeigt sich in LN-229 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein circa 1,7 facher bzw. ein circa 1,4 facher Anstieg des *HER3* mRNA-Gehalts (Abb. 4-1). Die alleinige Transfektion der *HER2*-siRNA führt in U251MG Zellen wiederum zu einem 2,1 fachen Anstieg des *EGFR* mRNA-Gehalts.

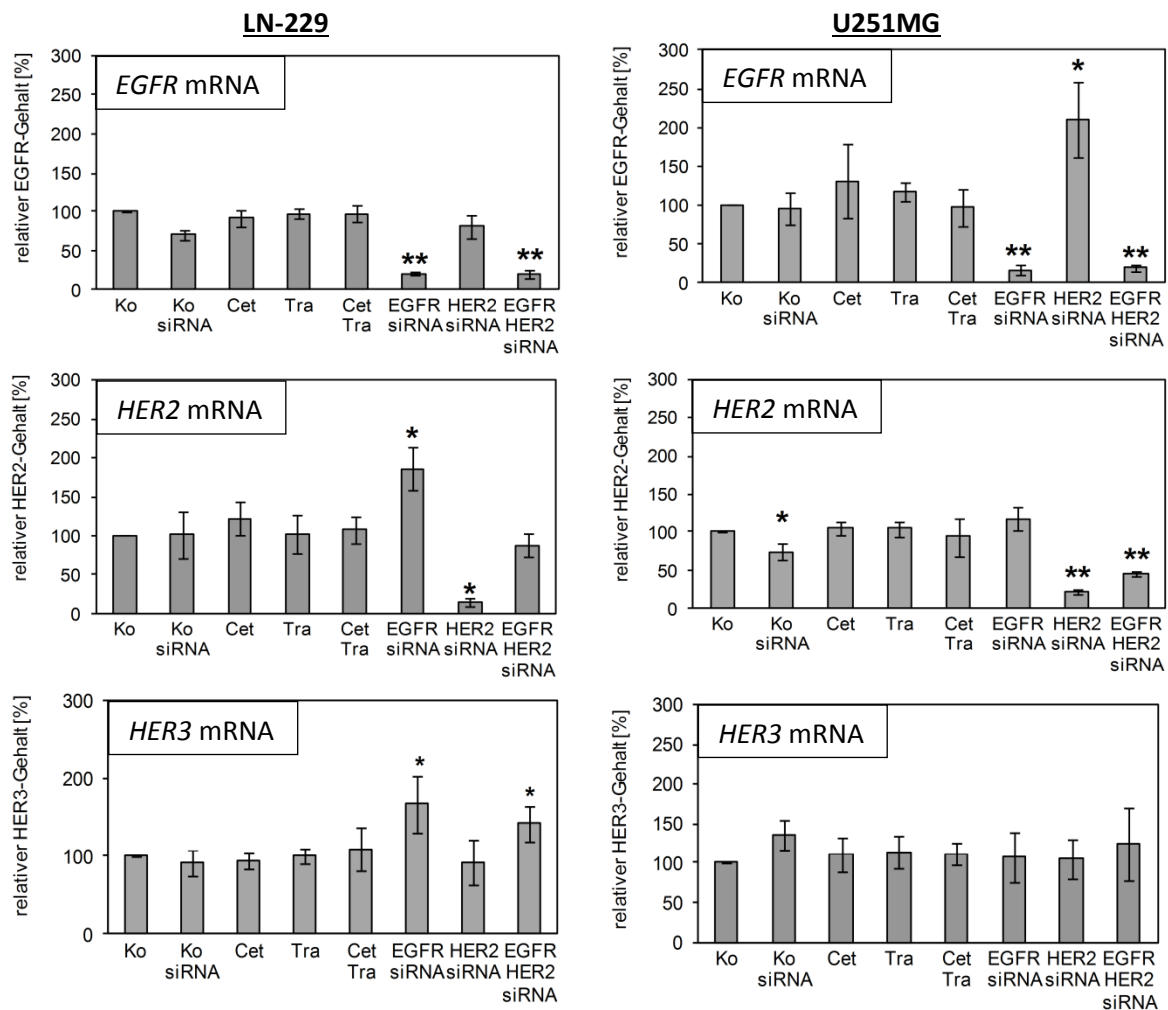


Abb. 4-1: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den EGFR, HER2 und HER3 mRNA-Gehalt von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentualer Anteil des EGFR, HER2 bzw. HER3- mRNA-Gehalts relativ zur unbehandelten Kontrolle. 48 h nach Behandlung. Die Normalisierung des mRNA-Gehalts der verschiedenen Rezeptoren erfolgte zum GAPDH mRNA-Gehalt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n \geq 5$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.2 Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den Proteingehalt von EGFR und HER2

Mittels Western Blot Analyse wurden die Effekte der Antikörperinkubation bzw. der siRNA-Transfektion auf den Proteingehalt von EGFR und HER2 bestimmt.

Die Western Blot Analysen zeigen dabei keine Veränderung des EGFR Proteingehalts durch die alleinige Inkubation der Zelllinien LN-229 und U251MG mit dem therapeutischen Antikörper Cetuximab (EGFR-spezifisch) ($t=48$ h) (Abb. 4-2, Anhang: Abb. 8-1). Die Inkubation mit dem HER2-spezifischen Antikörper Trastuzumab führt dagegen zu einer leichten bis mäßigen Reduktion des HER2 Proteingehalts (Abb. 4-2, Anhang: Abb. 8-1).

Im Gegensatz dazu kommt es nach Inkubation beider Zelllinien mit der EGFR- bzw. HER2-siRNA zu einer deutlichen Reduktion des entsprechenden Proteingehalts. Darüber hinaus führt die alleinige Transfektion der EGFR-siRNA in LN-229 Zellen zu einer leichten bis mäßigen Erhöhung des HER2 Proteingehalts (Abb. 4-2, Anhang: Abb. 8-1). In ähnlicher Weise kommt es nach der alleinigen Transfektion der HER2-siRNA in U251MG Zellen zu einer leichten bis mäßigen Erhöhung des EGFR Proteingehalts (Abb. 4-2, Anhang: Abb. 8-1).

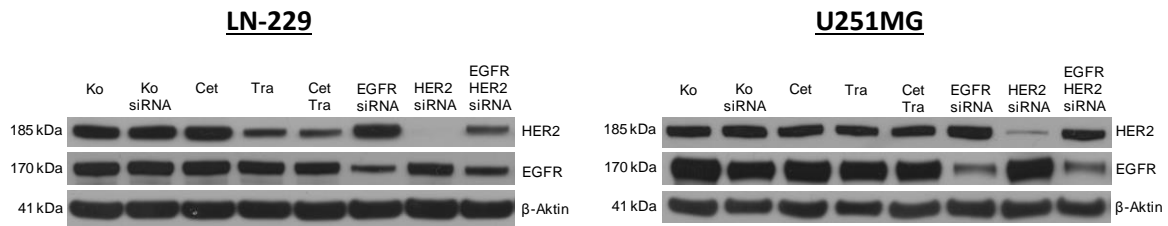


Abb. 4-2: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den EGFR bzw. HER2 Proteingehalt von LN-229 und U251MG Zellen.

Western Blot Analyse des EGFR und HER2 Proteingehalts. 48 h nach Behandlung. Aktin dient als Ladekontrolle. $n \geq 3$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.3 Einfluss von EGFR und HER2 auf den mRNA-Gehalt verschiedener ErbB-Liganden

Die Bindung von Liganden wie EGF an seinen Rezeptor EGFR induziert über die Rezeptordimerisierung die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden bzw. die Internalisierung der Rezeptor-Liganden Komplexe. Im Anschluss werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren aktiviert und verschiedene für die Tumorprogression bedeutende zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Apoptose induziert (Harris *et al.*, 2003; Zaczek *et al.*, 2005; Schneider und Wolf, 2009). In den weiteren Analysen wurde deshalb der Einfluss der Antikörperinkubation bzw. der siRNA-vermittelten Reduktion der Genexpression von *EGFR* und *HER2* auf den mRNA-Gehalt verschiedener ErbB-Liganden untersucht. Die Normalisierung des mRNA-Gehalts der ErbB-Liganden erfolgte zum *GAPDH* mRNA-Gehalt (siehe Abschnitt 3.7.6).

Die simultane Inkubation der Zelllinie LN-229 mit den Antikörpern Cetuximab und Trastuzumab führt zu einer signifikanten Steigerung des *EGF* mRNA-Gehalts (Epidermaler Wachstumsfaktor). Mit Ausnahme dieses Effekts, zeigt sich bei beiden Glioblastomzelllinien (LN-229 und U251MG) keine Veränderung des mRNA-Gehalts der Liganden *EGF*, *HB-EGF* (Heparin bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor) und *TGF- α* (Transformierender Wachstumsfaktor α) nach alleiniger bzw. kombinierter Inkubation mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab bzw. Trastuzumab (Abb. 4-3).

Im Gegensatz dazu kommt es nach Transfektion der EGFR-siRNA in beiden Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer Steigerung des mRNA-Gehalts der verschiedenen Liganden. So steigt der *EGF* und *HB-EGF* mRNA-Gehalt der Zelllinie LN-229 bzw. der *EGF* und *TGF- α* mRNA-Gehalt der Zelllinie U251MG nach Transfektion der EGFR-siRNA. Die Transfektion der HER2-siRNA führt dagegen in keiner der beiden Zelllinien zu einem veränderten mRNA-Gehalt der Liganden *EGF* bzw. *TGF- α* und resultiert nur in der Zelllinie LN-229 in einer Reduktion des *HB-EGF* mRNA-Gehalts (Abb. 4-3). Zusätzlich kann eine Erhöhung des *EGF* und *HB-EGF* (LN-229) bzw. des *EGF* (U251MG) mRNA-Gehalts nach der kombinierten Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA festgestellt werden (Abb. 4-3).

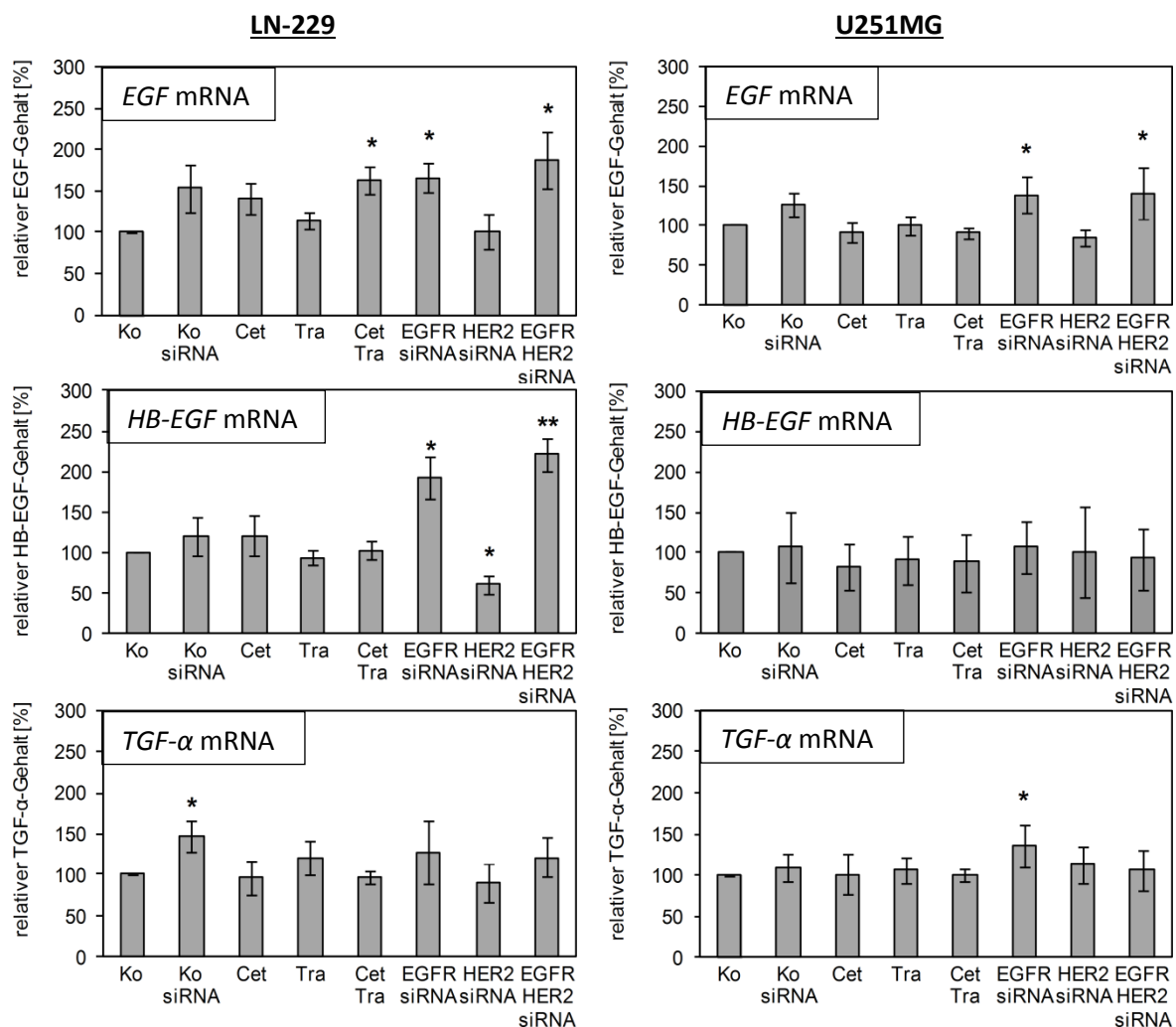


Abb. 4-3: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den mRNA-Gehalt verschiedener ErbB-Liganden von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentualer Anteil des mRNA-Gehalts verschiedener Gene relativ zur unbehandelten Kontrolle. 48 h nach Behandlung. Normalisierung des mRNA-Gehalts der verschiedenen Liganden erfolgte zum *GAPDH* mRNA-Gehalt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n \geq 5$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.4 Einfluss von EGFR und HER2 auf die Zellproliferation

In verschiedenen Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren EGFR und HER2 an der Regulation der Proliferation beteiligt sind (Wolf-Yadlin *et al.*, 2006; Yewale *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurden unterschiedliche Strategien entwickelt, um die Proliferation von Tumorzellen durch die Inhibierung von EGFR bzw. HER2 zu hemmen (Gutierrez und Schiff, 2011; Chong und Janne, 2013). Aus diesem Grund wurde untersucht, welchen Einfluss die Rezeptoren EGFR und HER2 auf die Zellproliferation der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG haben.

Die alleinige bzw. kombinierte Inkubation der Zelllinien LN-229 und U251MG mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab bzw. Trastuzumab (circa doppelten therapeutischen Initialdosis) hat, unabhängig von einer zusätzlichen Bestrahlung (6 Gy), keine signifikante Veränderung der Zellproliferation beider Zelllinien zur Folge (Abb. 4-4). Deshalb, wurden beide Zelllinien nachfolgend mit einer vier- bzw. achtmal höheren Antikörperkonzentrationen inkubiert. Auch die Inkubation mit erhöhten Konzentrationen der therapeutischen Antikörper verursachte keine signifikante Veränderung der Zellproliferation (Daten nicht gezeigt).

Die alleinige Transfektion der EGFR- bzw. HER2-siRNA reduziert die Zellproliferation beider Zelllinien um circa 40 % (EGFR) bzw. um circa 50 % (HER2: LN-229) und 65 % (HER2: U251MG) (Abb. 4-4). Die kombinierte Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA führt in Abhängigkeit der untersuchten Zelllinie zu einer Reduktion der Zellproliferation um 70 % (LN-229) bzw. 55 % (U251MG) (Abb. 4-4). Der Proliferationsunterschied zwischen der alleinigen HER2-siRNA Transfektion und der kombinierten Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA war nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich wurde untersucht, wie die Rezeptoren EGFR bzw. HER2 die Zellproliferation nach Bestrahlung beeinflussen. Hierzu wurden die Zellen 24 h nach Behandlung zusätzlich mit 6 Gy (Dosisleistung: 2 Gy/min) bestrahlt. Die alleinige Bestrahlung der Zellen hat eine Reduktion der Zellproliferation um circa 30 % (LN-229) bzw. 50 % (U251MG) zur Folge (Abb. 4-4). Die Kombination aus EGFR-siRNA Inkubation und Bestrahlung resultiert nur in der Zelllinie LN-229 in einer Reduktion der Zellproliferation um circa 50 % (Abb. 4-4). Die Kombination aus HER2-siRNA Inkubation und Bestrahlung führt in beiden Zelllinien zu einer Reduktion der Zellproliferation um circa 60 % (LN-229) bzw. 80 % (U251MG) (Abb. 4-4). Die Kombination aus simultaner Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA und zusätzlicher Bestrahlung hat nur in der Zelllinie LN-229 eine Reduktion der Zellproliferation um ca. 70 % zur Folge.

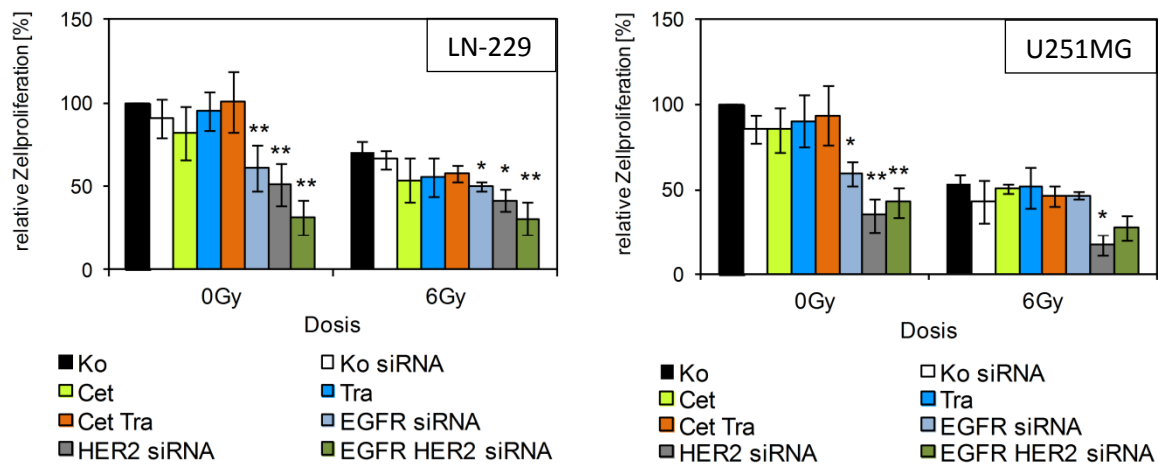


Abb. 4-4: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf die Zellproliferation von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentuale Zellproliferation relativ zur unbestrahlten und unbestrahlten Kontrolle. Die Zellen wurden 24 h nach Antikörperinkubation bzw. siRNA-Transfektion mit 6 Gy bestrahlt. Analyse der Zellen 72 h nach Behandlung bzw. 48 h nach Bestrahlung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,001$ vs. unbestrahlte Kontrolle bei 0 Gy bzw. 6 Gy. $n \geq 4$. (Ko: unbestrahlte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.5 Einfluss von EGFR und HER2 auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus

In Abschnitt 4.1.4 wurde der Einfluss von EGFR und HER2 auf die Zellproliferation der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG in Abhängigkeit einer Bestrahlung analysiert. Nachfolgend sollte deshalb der Einfluss beider Rezeptoren auf den Zellzyklus der Glioblastomzelllinien untersucht werden.

Die alleinige und einmalige Bestrahlung der Glioblastomzellen mit 6 Gy führt in beiden Zelllinien zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus (Abb. 4-5). Diese Akkumulation ist in U251MG Zellen (0 Gy: G2/M-Phase 19 %; 6 Gy: G2/M-Phase 39 %) ausgeprägter als in LN-229 Zellen (0 Gy: G2/M-Phase 11 %; 6 Gy: G2/M-Phase 20 %) (Abb. 4-5). Die alleinige bzw. die kombinierte Inkubation der Zelllinien LN-229 und U251MG mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab und Trastuzumab hat unabhängig von einer zusätzlichen Bestrahlung mit 6 Gy keine Veränderung des prozentualen Anteils der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen zur Folge.

Die Transfektion der EGFR-siRNA führt in LN-229 und U251MG Zellen zu einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus und zu einer Reduktion von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (Abb. 4-5). In LN-229 Zellen ist der Einfluss der EGFR-siRNA Transfektion auf den Zellzyklus jedoch geringer ausgeprägt als in U251MG Zellen (Abb. 4-5). In U251MG Zellen führt die Kombination aus EGFR-siRNA Transfektion und anschließender Bestrahlung zu einer Aufhebung

des strahleninduzierten G2/M-Arrests. Es kommt zu einer Akkumulation der U251MG Zellen in der G0/G1-Phase sowie zu einer Verringerung von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (Abb. 4-5). Die Transfektion der HER2-siRNA resultiert in bestrahlten bzw. unbestrahlten LN-229 Zellen in einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1-Phase und in einer Verringerung von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. In U251MG Zellen führt die Transfektion der HER2-siRNA dagegen zu einer Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Dieser Effekt wird durch eine zusätzliche Bestrahlung (6 Gy) deutlich verstärkt (Abb. 4-5). Demgegenüber führt die simultane Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA in LN-229 bzw. U251MG Zellen unabhängig von einer Bestrahlung zu keinen zusätzlichen Effekten, sondern zu einer der alleinigen Transfektion der HER2-siRNA (LN-229) bzw. der alleinigen Transfektion der EGFR-siRNA (U251MG) ähnlichen Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen (Abb. 4-5).

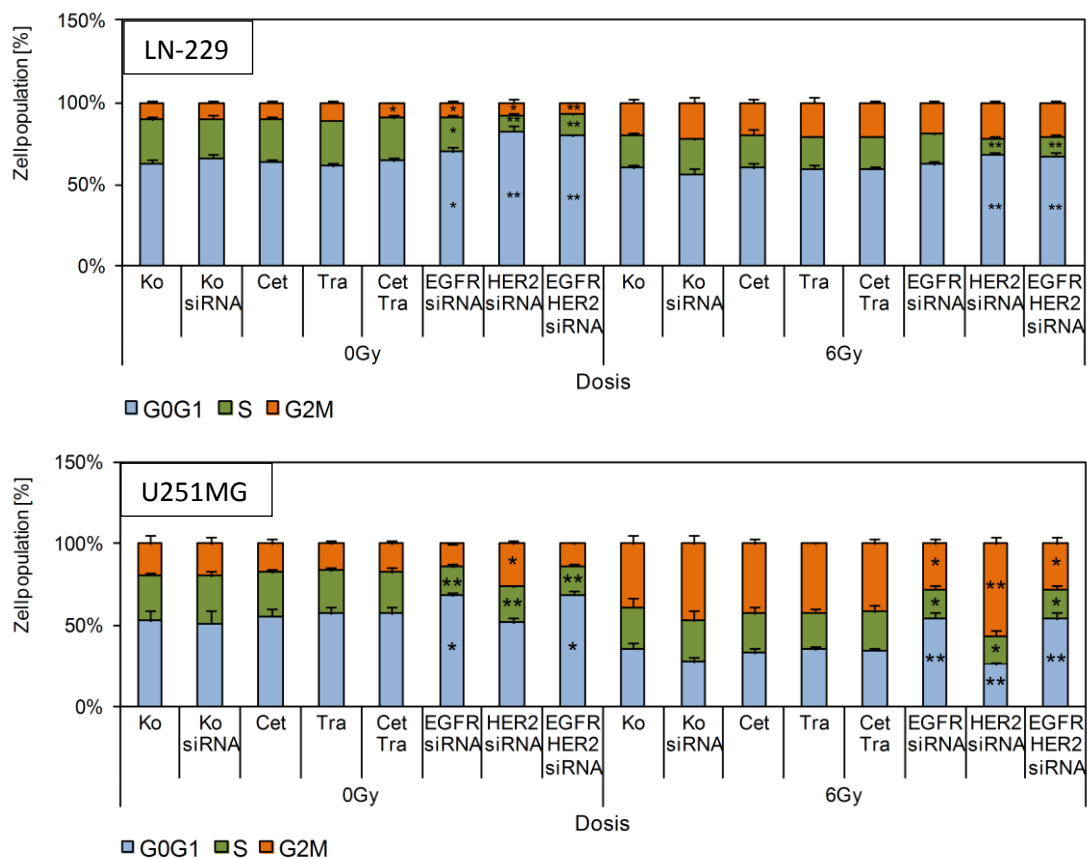


Abb. 4-5: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den Zellzyklus von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentualer Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen. Die Zellen wurden 24 h nach Antikörperinkubation bzw. siRNA-Transfektion mit 6 Gy bestrahlt. Analyse der Zellen 72 h nach Behandlung bzw. 48 h nach Bestrahlung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ vs. unbestrahlte Kontrolle bei 0 Gy bzw. 6 Gy. $n \geq 4$. (Ko: unbestrahlte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.5.1 Einfluss von EGFR und HER2 auf den *Cyclin D1* mRNA-Gehalt

Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl EGFR als auch HER2 als Rezeptortyrosinkinasen an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Neve *et al.*, 2000; Lurje und Lenz, 2009). Darüber hinaus ist beschrieben, dass beide Rezeptoren die Genexpression von Cyclinen auf verschiedene Art und Weise beeinflussen können (Lin *et al.*, 2001; Bazley und Gullick, 2005). Cyclin D1 (CCND1) reguliert die Transition des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase (Pestell, 2013). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von EGFR und HER2 auf den mRNA-Gehalt des *Cyclins D1* untersucht. Die Normalisierung des *Cyclins D1* mRNA-Gehalts erfolgte zum *GAPDH* mRNA-Gehalt (siehe Abschnitt 3.7.6).

Der *Cyclin D1* mRNA-Gehalt beider Zelllinien wird durch die alleinige bzw. kombinierte Inhibierung von EGFR bzw. HER2 mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab bzw. Trastuzumab nicht verändert. Die alleinige Transfektion der EGFR- oder HER2-siRNA und die kombinierte Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA führt in der Zelllinie LN-229 zu einer Reduktion des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts (Abb. 4-6). In der Zelllinie U251MG hat die Transfektion der EGFR-siRNA bzw. die kombinierte Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA keine Veränderung des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts zur Folge (Abb. 4-6). Im Gegensatz dazu führt die Transfektion der HER2-siRNA in der Zelllinie U251MG zu einer Erhöhung des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts (Abb. 4-6).

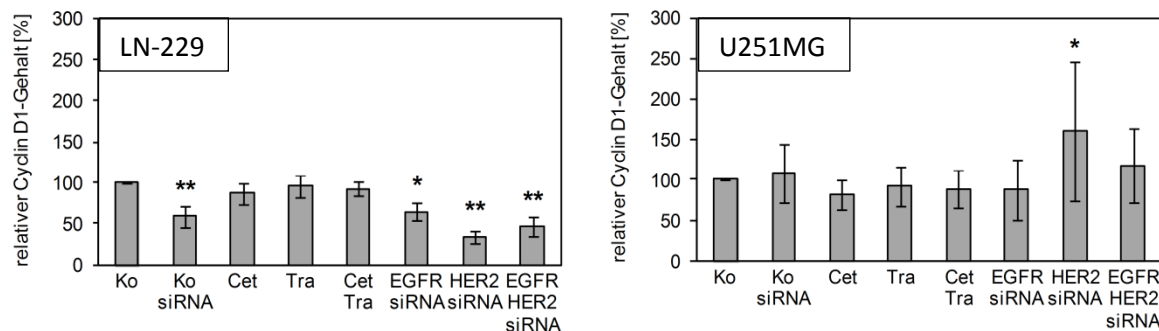


Abb. 4-6: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den *Cyclin D1* mRNA-Gehalt von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentualer Anteil des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts relativ zur unbehandelten Kontrolle. 48 h nach Behandlung. Die Normalisierung des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts erfolgte zum *GAPDH* mRNA-Gehalt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n \geq 5$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.6 Einfluss von EGFR und HER2 auf die Zellmigration

Für eine Vielzahl von Tumoren konnte bereits eine enge Verknüpfung von Migration und Tumorzell dissemination mit der Prognose von Tumorpatienten nachgewiesen werden (Friedl und

Wolf, 2003). Darüber hinaus ist die Metastasierung von Tumoren mit circa 90 % die Hauptursache aller tumorassoziierten Todesfälle (Valastyan und Weinberg, 2011). Weiterhin ist bekannt, dass sowohl EGFR als auch HER2 in einer Vielzahl von Tumorentitäten in die Regulation und Modulation von Migration, Invasion und Metastasierung involviert sind (Olayioye, 2001; Seshacharyulu *et al.*, 2012). Aus diesem Grund sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Rezeptoren EGFR und HER2 auf die zelluläre Migrationsrate der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG haben.

Die Analyse der Zellmigration erfolgte dabei mit Hilfe von Wundheilungsassays. In keiner der beiden Glioblastomzelllinien zeigt die Analyse der Wundheilungsassays eine Veränderung der zellulären Migration nach alleiniger bzw. kombinierter Inkubation mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab und Trastuzumab. Darüber hinaus führt auch die alleinige Inkubation beider Zelllinien mit der EGFR spezifischen siRNA zu keiner Veränderung der Zellmigration. Im Gegensatz dazu reduziert die alleinige Transfektion der HER2-siRNA die zelluläre Migration beider Zelllinien um circa 50 % (Abb. 4-7). Die kombinierte Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA führt ebenfalls zu einer signifikanten aber etwas schwächeren Reduktion der Migration (LN-229: 57 %; U251MG: 70 %) (Abb. 4-7).

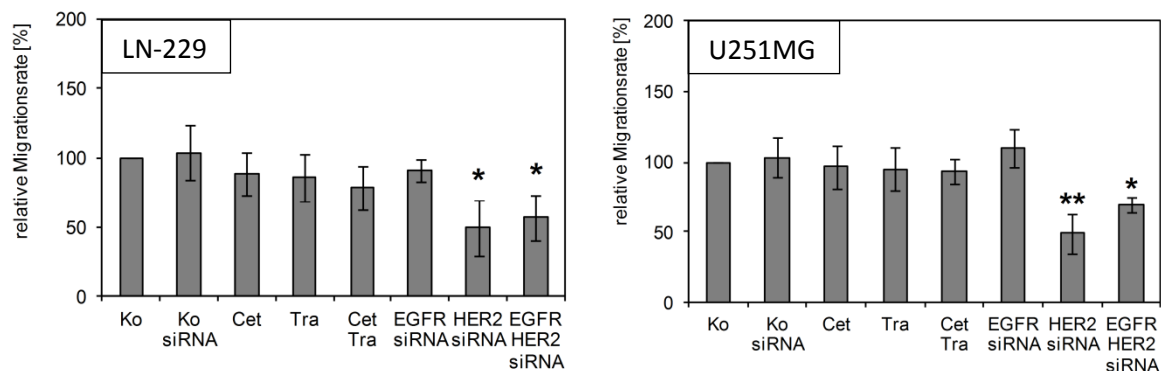


Abb. 4-7: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf die Zellmigration von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentuale Zellmigration relativ zur unbehandelten Kontrolle. 48 h nach Behandlung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n \geq 6$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.6.1 Einfluss von EGFR und HER2 auf den *MMP2* und *MMP10* mRNA-Gehalt

Matrix-Metalloproteasen sind an der Degradation extrazellulärer Matrixproteine und an der Freisetzung von Liganden aus membrangebundenen Vorläuferstufen beteiligt. Sie regulieren so indirekt bedeutende Prozesse der Tumorprogression wie Migration, Proliferation und Invasion (Murphy *et al.*, 1991; Newby, 2006). Deshalb wurde der Einfluss von EGFR und HER2 auf den

MMP2 bzw. *MMP10* mRNA-Gehalt untersucht. Die Normalisierung des *MMP2* bzw. *MMP10* mRNA-Gehalts erfolgte zum *GAPDH* mRNA-Gehalt (siehe Abschnitt 3.7.6).

Die Untersuchungen beider Glioblastomzelllinien zeigen keine Veränderung des *MMP2* bzw. *MMP10* mRNA-Gehalts nach alleiniger bzw. kombinierter Inhibierung von EGFR bzw. HER2 mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab bzw. Trastuzumab (t=48 h) (Abb. 4-8).

Die alleinige Transfektion der EGFR-siRNA bzw. die kombinierte Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA hat in beiden Zelllinien eine Erhöhung des *MMP2* bzw. *MMP10* mRNA-Gehalts zur Folge (Abb. 4-8). Im Gegensatz dazu führt die alleinige Transfektion der HER2-siRNA in beiden Zelllinien zu einer Reduktion des *MMP2* mRNA-Gehalts. Der *MMP10* mRNA-Gehalt bleibt nach Transfektion der HER2-siRNA unverändert (Abb. 4-8).

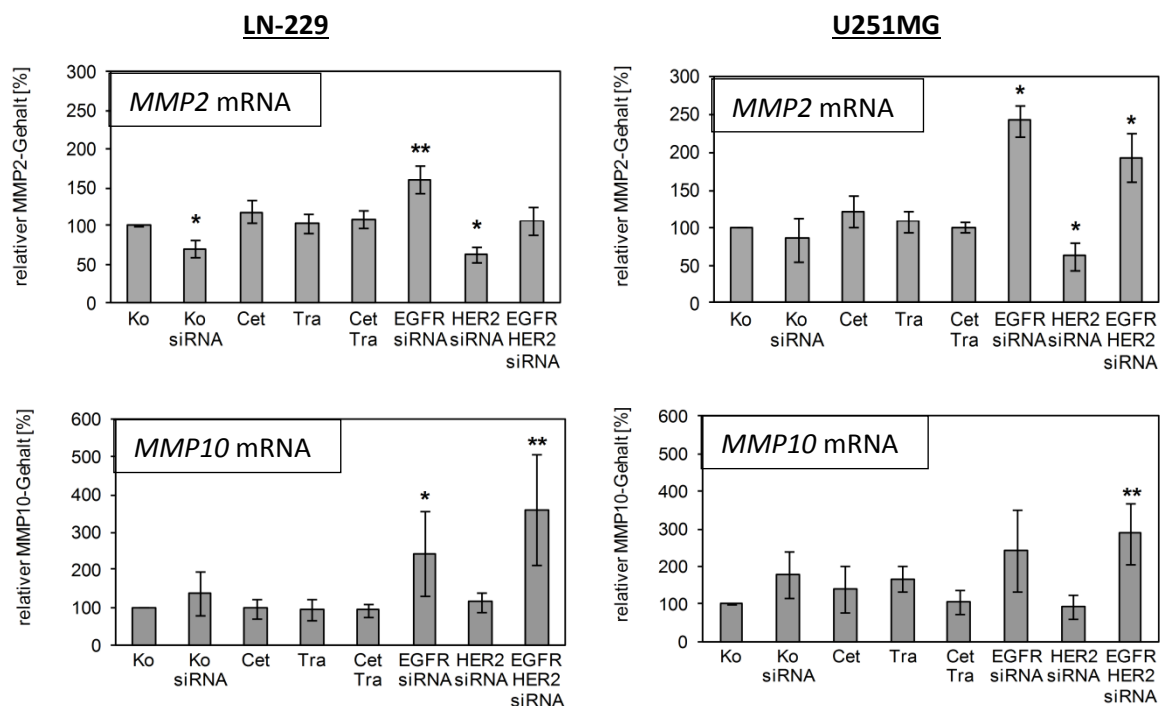


Abb. 4-8: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den *MMP2* und *MMP10* mRNA-Gehalt von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentualer Anteil des *MMP2* bzw. *MMP10* mRNA-Gehalts relativ zur unbehandelten Kontrolle. 48 h nach Behandlung. Die Normalisierung des *MMP2* bzw. *MMP10* mRNA-Gehalts erfolgte zum *GAPDH* mRNA-Gehalt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n \geq 5$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.6.2 Einfluss von EGFR und HER2 auf den uPA, uPAR bzw. PAI-1 Proteingehalt

Der Urokinaserezeptor (uPAR), sein Ligand Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und sein hauptsächlicher Negativregulator Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ-1 (PAI-1) sind entscheidend

an Prozessen der Tumorprogression und Metastasierung beteiligt, indem sie direkt bzw. indirekt auf Prozesse wie Zellinvasion, Zelladhäsion, Proteolyse der extrazellulären Matrix, Zellproliferation und Zellmigration Einfluss nehmen (Smith und Marshall, 2010; Czekay *et al.*, 2011; Noh *et al.*, 2013).

Die Bestimmung des Proteingehalts von uPA, uPAR und PAI-1 erfolgte mittels ELISA-Messung (Tabelle 4-2). Die Untersuchung der Zelllinie U251MG zeigt, dass die alleinige bzw. kombinierte Inkubation mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab bzw. Trastuzumab keine Veränderung des uPA, uPAR sowie des PAI-1 Proteingehalts zur Folge hat (Abb. 4-9). Auch in der Zelllinie LN-229 wird der Gehalt dieser Proteine durch die Inkubation mit Trastuzumab nicht verändert. Jedoch kommt es nach Cetuximab-Inkubation bzw. nach Inkubation mit beiden therapeutischen Antikörpern zu einer Reduktion des uPA, uPAR sowie des PAI-1 Proteingehalts um den Faktor 0,8 (Abb. 4-9).

Die alleinige Transfektion der EGFR-siRNA bzw. die kombinierte Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA führt in der Zelllinie LN-229 zu einer Erhöhung des uPAR bzw. PAI-1 Proteingehalts. Der Proteingehalt von uPA bleibt jedoch unverändert. Des Weiteren führt die Transfektion der HER2-siRNA in der Zelllinie LN-229 zu keiner Veränderung des uPA bzw. uPAR Proteingehalts jedoch zu einer 1,25 fachen Erhöhung des PAI-1 Proteingehalts. In der Zelllinie U251MG führt die alleinige Transfektion der EGFR-siRNA bzw. die kombinierte Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA zu einer deutlichen Steigerung des uPA, uPAR bzw. PAI-1 Proteingehalts. Die alleinige Transfektion der HER2-siRNA hat dagegen auf den uPA Proteingehalt keinen Einfluss, resultiert aber in einer Erhöhung des uPAR bzw. PAI-1 Proteingehalts (Abb. 4-9).

Tabelle 4-2: uPA, uPAR bzw. PAI-1 Proteingehalt.

Protein	LN-229	U251MG
uPA	0,2 ± 0,1	1,2 ± 0,6
uPAR	2,0 ± 0,6	2,1 ± 1,0
PAI-1	18,8 ± 6,9	13,2 ± 10,3

Einheit: ng uPA, uPAR bzw. PAI-1 Protein je mg Totalprotein.

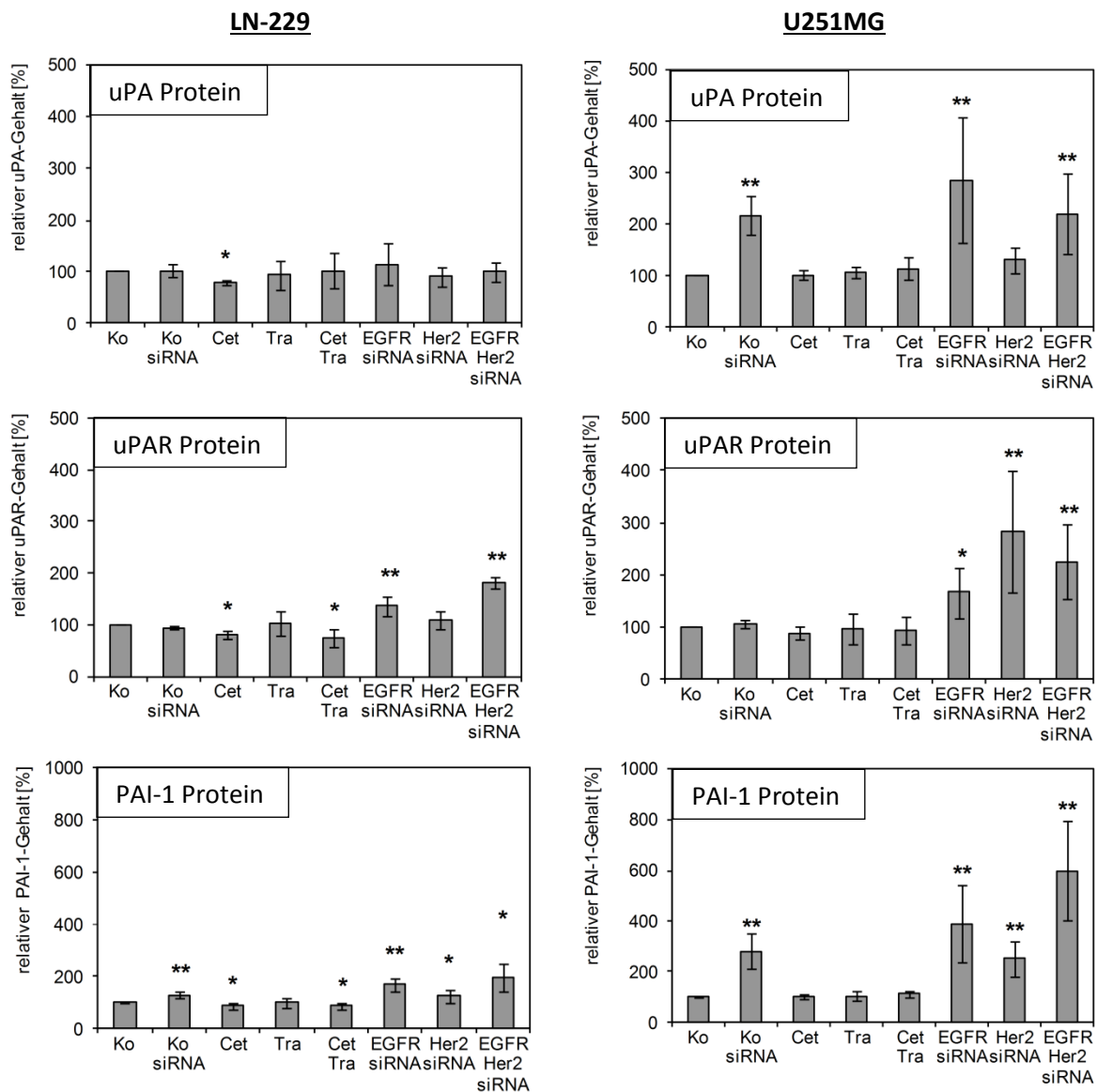


Abb. 4-9: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den uPA, uPAR und PAI-1 Proteingehalt von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentualer Anteil des uPA, uPAR und PAI-1 Proteingehalts relativ zur unbehandelten Kontrolle. 48 h nach Behandlung. Die Normalisierung des uPA, uPAR bzw. PAI-1 Proteingehalts erfolgte zum Totalproteingehalt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n \geq 5$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.7 Einfluss von EGFR und HER2 auf das klonogene Zellüberleben und die Radiosensitivität

Die mittlere Überlebenszeit von Glioblastompatienten beträgt trotz aggressivem Behandlungsregime aus radikaler chirurgischer Resektion des Tumors, postoperativer Radiotherapie und adjuvanter Chemotherapie nach Diagnose nur 12-15 Monate (van den Bent, 2006). Darüber hinaus ist seit längerem bekannt, dass EGFR an der Vermittlung von

Radioresistenz bei Glioblastomen und weiteren Tumoren beteiligt ist (Chakravarti *et al.*, 2004; Baumann *et al.*, 2007). Deshalb wurde untersucht, wie EGFR und HER2 das klonogene Zellüberleben bzw. die Radiosensitivität der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG beeinflussen.

Sowohl die alleinige als auch die simultane Inkubation mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab bzw. Trastuzumab führt in den Zelllinien LN-229 und U251MG, unabhängig von der applizierten Strahlendosis, zu keiner Veränderung des klonogenen Zellüberlebens (Abb. 4-10) und der Radiosensitivität (Tabelle 4-3; Abb. 4-11). Darüber hinaus führt auch die Inkubation mit vier- bzw. achtmal höheren Antikörperkonzentrationen zu keiner signifikanten Veränderung des klonogenen Zellüberlebens (Daten nicht gezeigt).

Die alleinige Transfektion der EGFR-siRNA hat weder in LN-229 noch in U251MG Zellen Einfluss auf das klonogene Zellüberleben der unbestrahlten Zellen. Die alleinige Transfektion der EGFR-siRNA führt jedoch in bestrahlten U251MG Zellen zu einer signifikanten Reduktion des klonogenen Zellüberlebens um circa 90 % (6 Gy). Im Gegensatz dazu reduziert die alleinige Transfektion der HER2-siRNA das klonogene Zellüberleben der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG um circa 70 % (0 Gy) bzw. um mehr als 95 % bei zusätzlicher Bestrahlung mit 6 Gy (Abb. 4-10). Die simultane Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA resultiert dagegen in einer geringeren Reduktion des klonogenen Zellüberlebens, als die alleinige Transfektion der HER2-siRNA (Abb. 4-10).

Des Weiteren zeigt sich, dass die alleinige Transfektion der EGFR-siRNA bzw. die simultane Transfektion der EGFR- und HER2-siRNA in keiner der beiden Glioblastomzelllinien zu einer Veränderung der Radiosensitivität führt (Tabelle 4-3; Abb. 4-11). Im Gegensatz dazu variieren die radiobiologischen Effekte nach Transfektion der HER2-siRNA zelllinienabhängig. So führt die alleinige Transfektion der HER2-siRNA in U251MG Zellen zu einer moderaten Radiosensitivierung (DMF10: 1,22) hat aber keinen Einfluss auf die Radiosensitivität von LN-229 Zellen (DMF10: 0,95) (Tabelle 4-3; Abb. 4-11).

Zur absoluten Genauigkeit der in dieser Arbeit bestimmten DMF10 Werte ist zu erwähnen, dass nur drei Dosiswerte (0 Gy, 2 Gy, 6 Gy) genutzt wurden, um mit Hilfe eines durch Interpolation optimierten linear-quadratischen Modells, den DMF10 Wert (Dosis modifizierender Faktor 10) zu bestimmen.

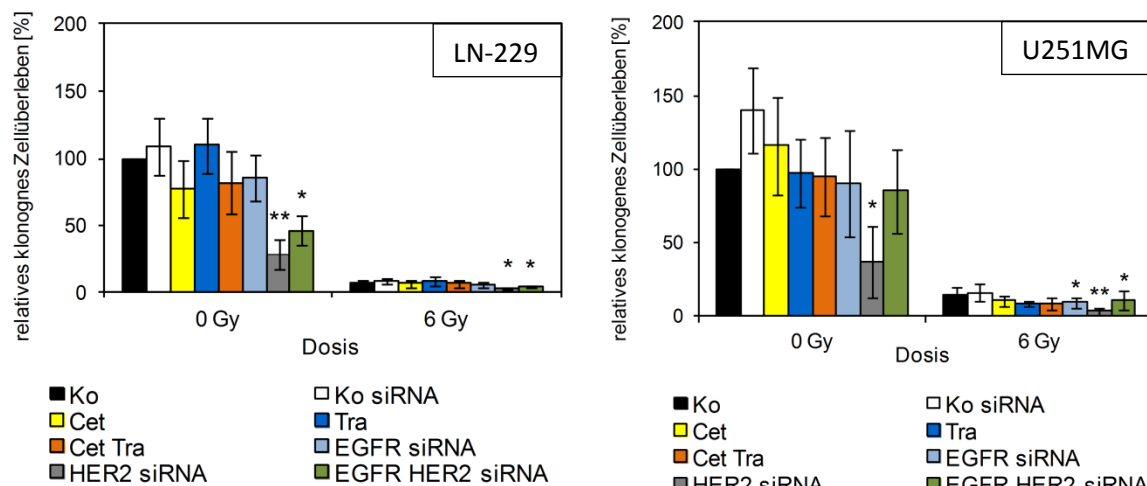


Abb. 4-10: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf das klonogene Zellüberleben von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentuales klonogenes Zellüberleben relativ zur unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle bei 0 Gy bzw. 6 Gy. $n \geq 4$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

Tabelle 4-3: Dosis modifizierender Faktor 10 (DMF10)

Behandlung	LN-229	U251MG
Ko	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
Ko siRNA	1,00 \pm 0,06	1,09 \pm 0,06
Cet	0,96 \pm 0,09	1,05 \pm 0,09
Tra	1,01 \pm 0,05	1,02 \pm 0,13
Cet Tra	0,99 \pm 0,05	1,09 \pm 0,13
EGFR siRNA	1,07 \pm 0,11	1,06 \pm 0,11
HER2 siRNA	0,95 \pm 0,05	1,22 \pm 0,14*
EGFR HER2 siRNA	0,98 \pm 0,06	1,11 \pm 0,20

Definition des DMF10 siehe Abschnitt 3.4.

* $p \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n \geq 4$.

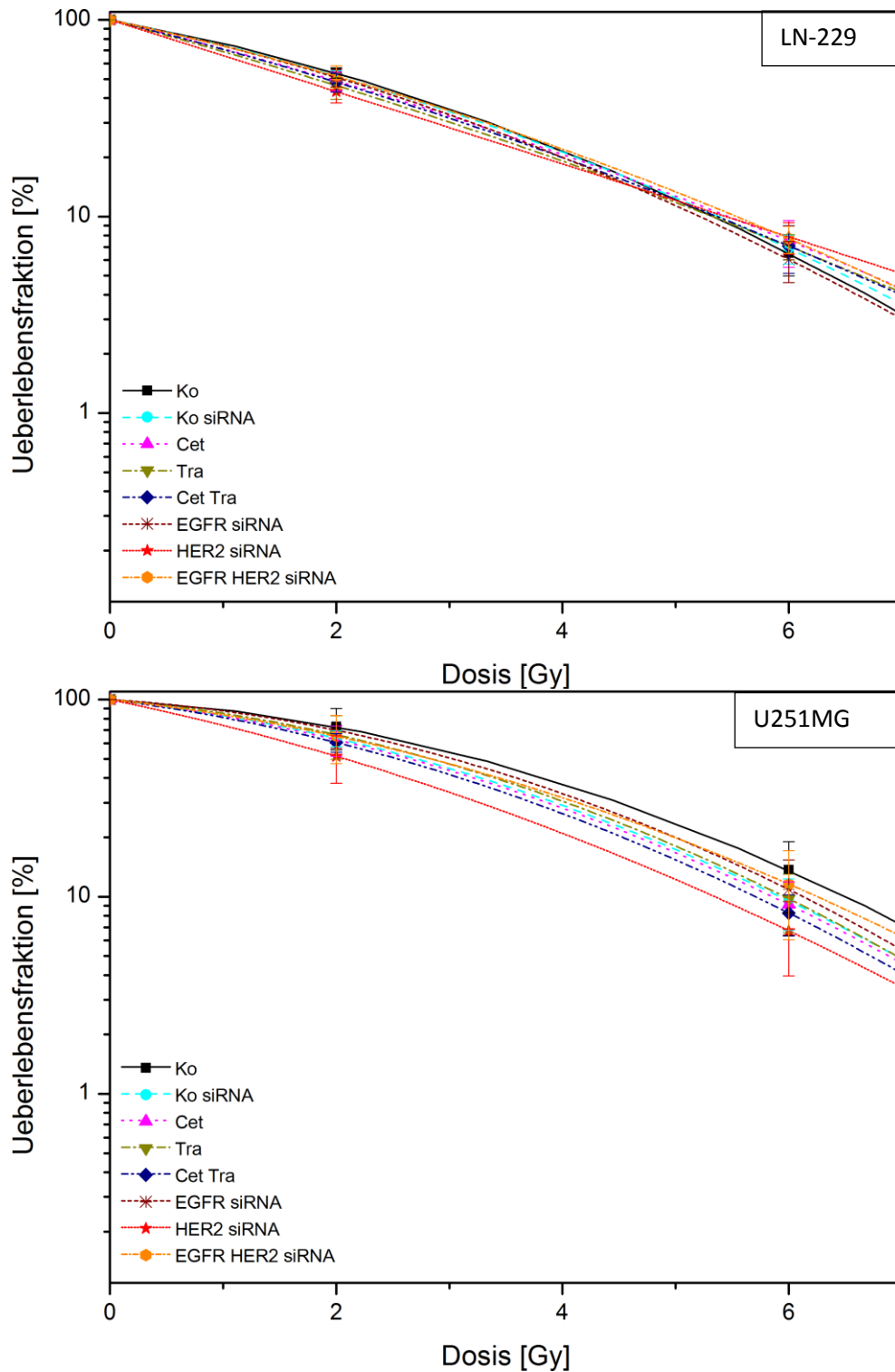


Abb. 4-11: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf die Radiosensitivität von LN-229 und U251MG Zellen.

Überlebensfraktion nach Behandlung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. $n \geq 4$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.8 Einfluss von EGFR und HER2 auf die Apoptose

Aus histologischen Studien und *in vitro* Analysen ist bekannt, dass Glioblastome eine deutlich erhöhte Apoptoseresistenz aufweisen und sich durch eine verstärkte Aktivierung von Signalwegen auszeichnen, die das Zellüberleben fördern (Adamson *et al.*, 2009; Krakstad und Chekenya, 2010). Darüber hinaus haben Untersuchungen gezeigt, dass sowohl EGFR als auch HER2 an der Vermittlung der Apoptoseresistenz in verschiedenen Tumorentitäten beteiligt sind (Rexer und Arteaga, 2012; Chong und Janne, 2013). Deshalb wurde analysiert, wie EGFR und HER2 die Apoptose der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG beeinflussen.

Auf die simultane Inkubation mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab und Trastuzumab bzw. auf die simultane Transfektion der EGFR- bzw. HER2-siRNA wurde nachfolgend verzichtet, da in den vorangegangenen Versuchen keine überzeugenden zusätzlichen zellphysiologischen Effekte nachgewiesen werden konnten.

4.1.8.1 Einfluss von EGFR und HER2 auf die Spaltung von PARP

Die Spaltung der *Poly ADP ribose polymerase* (PARP) gilt seit langem als gesichertes Ereignis und Indikator einer zellulären Apoptoseinduktion (Gu *et al.*, 1995). Aus diesem Grund wurde im Zuge der Apoptoseuntersuchungen der Einfluss von EGFR und HER2 auf die Spaltung von PARP näher analysiert.

Die Western Blot Analysen zeigen, dass die Inkubation der Zelllinien LN-229 und U251MG mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab bzw. Trastuzumab (72 h) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu keiner verstärkten Spaltung von PARP führt (Abb. 4-12). Die Transfektion der EGFR-siRNA resultiert dagegen nur in der Zelllinie LN-229 in einer Zunahme des Proteingehalts von gespaltenem PARP. Demgegenüber hat die Transfektion der HER2-siRNA bei beiden Glioblastomzelllinien eine Erhöhung des gespaltenen PARP Proteingehalts zur Folge (Abb. 4-12).

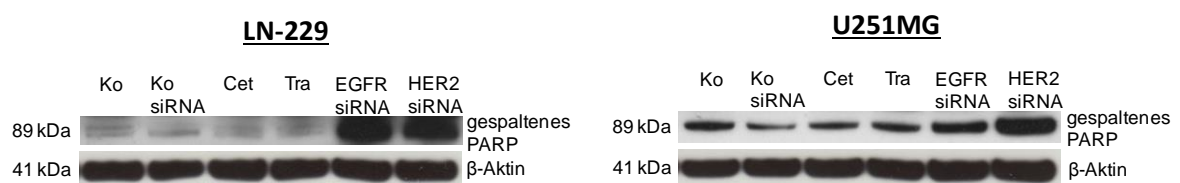


Abb. 4-12: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den Proteingehalt von gespaltenem PARP in LN-229 und U251MG Zellen.

Western Blot Analyse des gespaltenen PARP. 72 h nach Behandlung. Aktin dient als Ladekontrolle. $n \geq 3$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.8.2 Einfluss von EGFR und HER2 auf die Aktivität der Caspasen 3/7

Caspasen sind neben anderen Funktionen essenziell in den zellulären Prozess der Apoptose involviert. Wird die Apoptose durch extrinsische bzw. intrinsische Signale induziert, kommt es im Folgenden zur Aktivierung der zu den Cysteinproteasen gehörenden Caspasen (Cohen, 1997). Im Zuge der Untersuchung der Bedeutung von EGFR und HER2 für die Vermittlung der Apoptoseresistenz in Glioblastomen wurde deshalb zusätzlich die Aktivität der Caspasen 3/7 mittels Caspase-Glo® 3/7 Assay quantifiziert.

Die Inkubation mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab bzw. Trastuzumab resultiert in beiden Zelllinien in keiner erhöhten Caspase 3/7 Aktivität (Abb. 4-13). Die Transfektion der EGFR-siRNA führt nur in der Zelllinie LN-229 zu einer erhöhten Caspase 3/7 Aktivität. Die Transfektion der HER2-siRNA hat bei beiden Glioblastomzelllinien eine Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität zur Folge (Abb. 4-13).

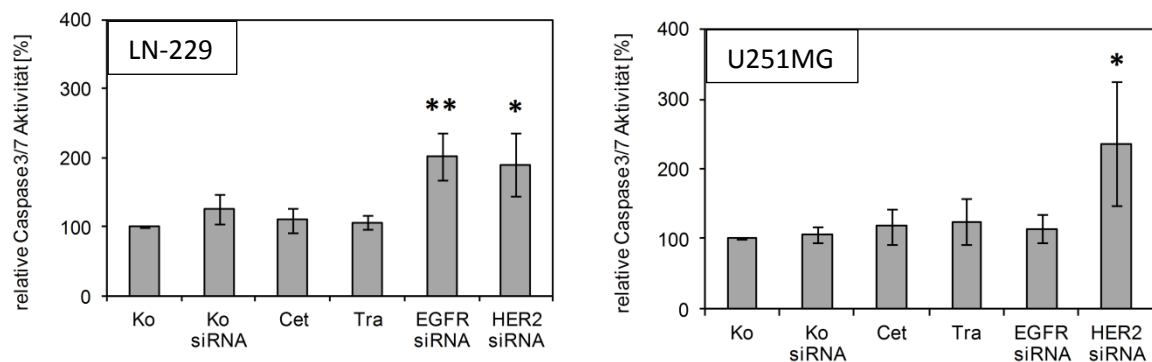


Abb. 4-13: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf die Aktivität der Caspasen 3/7 von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentuale Caspase 3/7 Aktivität relativ zur unbehandelten Kontrolle. 72 h nach Behandlung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n \geq 6$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.8.3 Einfluss von EGFR und HER2 auf die Apoptose

Zur fluoreszenzmikroskopischen Quantifizierung apoptotischer nukleärer Veränderungen wie die Chromatinkondensation (Pyknose) oder die Fragmentierung des Zellkerns wurden die Zelllinien LN-229 und U251MG mit Hilfe des Farbstoffs DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid) gefärbt und die Anzahl apoptotischer Zellkerne quantifiziert.

In der Zelllinie LN-229 können nach DAPI-Färbung weder in der Kontrolle noch nach Cetuximab und Trastuzumab-Inkubation bzw. nach Transfektion der EGFR-siRNA und HER2-siRNA

morphologisch sichtbare apoptosetypische, nukleäre Veränderungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In der Zelllinie U251MG führt weder die Inkubation mit Cetuximab bzw. Trastuzumab noch die Transfektion der EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA zur signifikanten Erhöhung der Apoptose (Abb. 4-14). Im Gegensatz dazu zeigt sich nach siRNA-vermittelter Reduktion der *HER2*-Genexpression eine signifikante Zunahme der Apoptose auf 11 % (Abb. 4-14). Die mikroskopischen Untersuchungen zeigen dabei vor allem das Auftreten von Kernpyknosen (Daten nicht gezeigt).

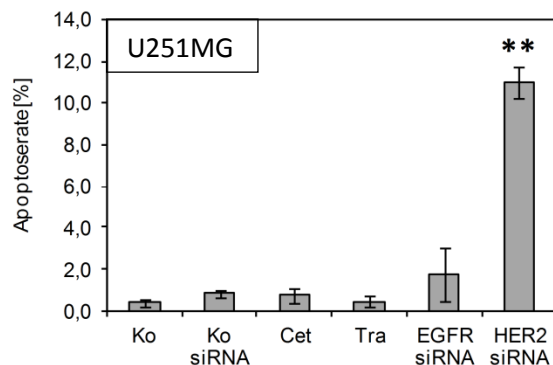


Abb. 4-14: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf die Apoptose von U251MG Zellen.

Prozentuale Apoptoserate relativ zur unbehandelten Kontrolle. 72 h nach Behandlung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. ** $p \leq 0,001$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n=4$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.1.9 Einfluss von EGFR und HER2 auf die Vitalität

In weiteren Untersuchungen mittels Trypanblaufärbung wurde analysiert, welchen Einfluss die Rezeptoren EGFR und HER2 auf die Vitalität der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG haben. Perforierte bzw. abgestorbene Zellen werden hierbei durch den Farbstoff Trypanblau dunkelblau angefärbt. Vitale Zellen bzw. Zellen mit intakter Zellmembran werden im Gegensatz dazu nicht gefärbt und erscheinen unter dem Mikroskop deshalb weiß.

Die Vitalitätsanalysen zeigen keine Veränderung der zellulären Vitalität der Zelllinien LN-229 bzw. U251MG durch die Inkubation mit den therapeutischen Antikörpern Cetuximab bzw. Trastuzumab ($t=72$ h) (Abb. 4-15). Des Weiteren hat auch die Transfektion der EGFR-siRNA in beiden Zelllinien keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität. Die Transfektion der HER2-siRNA führt in der Zelllinie LN-229 zu keiner, in der Zelllinie U251MG dagegen zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität um circa 15 % (Abb. 4-15).

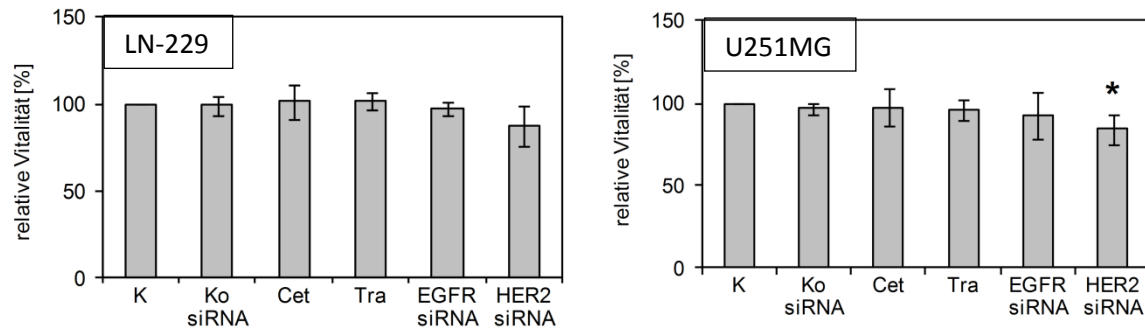


Abb. 4-15: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf die Vitalität von LN-229 und U251MG Zellen.

Prozentualer Anteil vitaler Zellen relativ zur unbehandelten Kontrolle. 72 h nach Behandlung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. * $p \leq 0,05$ vs. unbehandelte Kontrolle. $n \geq 6$. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

4.2 Bedeutung von EGFR und HER2 in Glioblastomen

EGFR und HER2 sind bekannte Regulatoren der Zellproliferation, Differenzierung, Zellmigration und Apoptose von Tumorzellen und sind darüber hinaus beispielsweise in Kopf-Hals-Tumoren und Brustkarzinomen von prognostischer Bedeutung (Andrulis *et al.*, 1998; Yarden, 2001; Shen *et al.*, 2014). Des Weiteren ist die Amplifikation des *EGFR*-Gens mit 36 % eine der häufigsten genetischen Veränderungen in primären Glioblastomen (Ohgaki und Kleihues, 2007). Auch HER2 ist funktionell in die molekulare Pathogenese von malignen Gliomen involviert. So steigt die Genexpression von *HER2* mit zunehmender maligner Transformation des Astrozytoms an (Mineo *et al.*, 2006). Deshalb wurde im Folgenden die prognostische Bedeutung des *HER2* bzw. *EGFR* mRNA-Gehalts in primären Glioblastomen näher untersucht.

4.2.1 *EGFR* und *HER2* mRNA-Gehalt in primären Glioblastomen

Das mediane Alter der untersuchten Glioblastompatienten beträgt 63 Jahre (Schwankungsbereich: 27-78 Jahre). Die Normalisierung des *HER2* bzw. *EGFR* mRNA-Gehalts erfolgte zum *POLR2A* mRNA-Gehalt (siehe Abschnitt 3.7.6). Der mediane *HER2* bzw. *EGFR* mRNA-Gehalt im Tumorgewebe bzw. im tumorassoziierten Normalgewebe der Glioblastompatienten ist in Tabelle 4-4 dargestellt. Der *EGFR* mRNA-Gehalt im Tumorgewebe bzw. im tumorassoziierten Normalgewebe ist etwa 10-mal höher als der *HER2* mRNA-Gehalt. Der Vergleich zwischen Tumorgewebe und tumorassoziierten Normalgewebe der Glioblastompatienten zeigt weder für EGFR noch für HER2 einen signifikanten Expressionsunterschied (Mann-Whitney-U-Test: Tumor $n=34$, Normalgewebe $n=7$; *EGFR*: $p=0,747$; *HER2* $p=0,161$). Die zusätzliche Beurteilung der Diskriminierungskraft des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts mittels ROC-Kurven Analyse zeigt

ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumorgewebe und dem tumorassoziierten Normalgewebe (*EGFR* mRNA-Gehalt: AUC (Fläche unter der Kurve)=0,542, 95 % KI 0,325-0,759, $p=0,729$), (*HER2* mRNA-Gehalt: AUC=0,676, 95 % KI 0,505-0,848, $p=0,146$) (Abb. 4-16). Die Assoziation des tumorösen *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts mit den klinisch-pathologischen Parametern der Glioblastompatienten wurde mittels des exakten Tests nach Fisher analysiert. Es ergibt sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem *EGFR* bzw. dem *HER2* mRNA-Gehalt und den vorliegenden klinisch-pathologischen Parametern (Anhang: Tabelle 8-1).

Tabelle 4-4: Medianer *HER2* bzw. *EGFR* mRNA-Gehalt im Tumor- und Normalgewebe von Glioblastompatienten.

Probenmaterial	Probenzahl	Median	Schwankungsbereich
Tumor			
<i>HER2</i> mRNA	34	$3,4 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-3} - 1,6 \cdot 10^{-1}$
<i>EGFR</i> mRNA	34	$5,1 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-2} - 2,8 \cdot 10^1$
Normalgewebe			
<i>HER2</i> mRNA	7	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$8,0 \cdot 10^{-3} - 4,5 \cdot 10^{-2}$
<i>EGFR</i> mRNA	7	$3,9 \cdot 10^{-1}$	$6,1 \cdot 10^{-2} - 9,7$

Einheit: Kopien *EGFR* bzw. *HER2* je Kopie *POLR2A*.

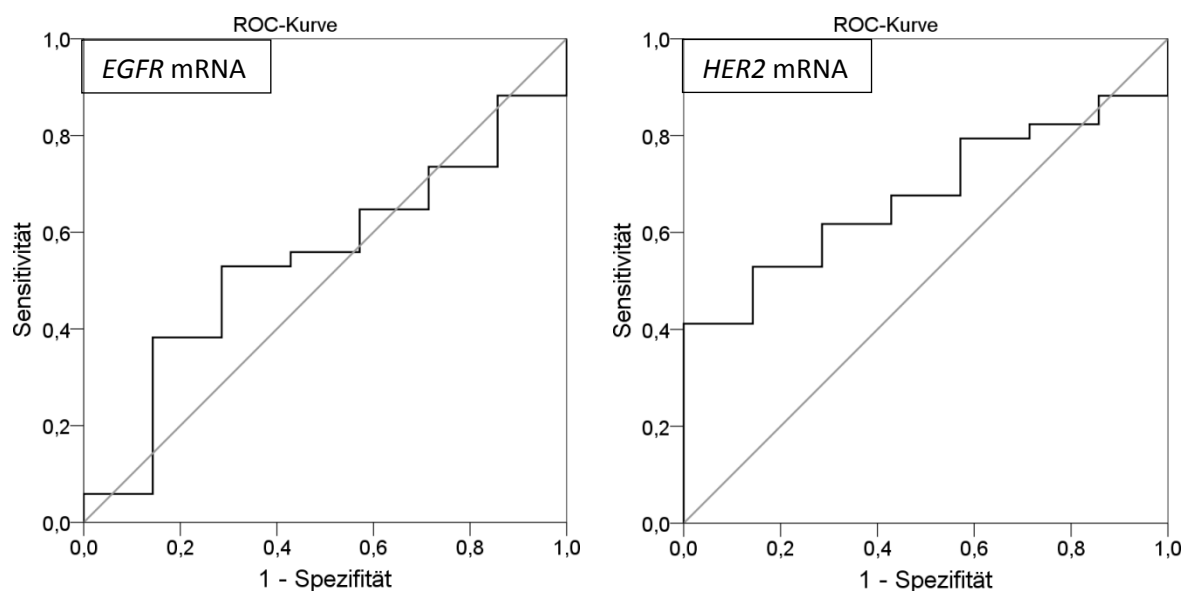


Abb. 4-16: Darstellung der Diskriminierungskraft des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts zur Unterscheidung zwischen Tumor- und tumorassoziiertem Normalgewebe in Glioblastompatienten mit Hilfe von ROC-Kurven.

Die zentrale Linie indiziert die Bezugslinie jedes Datensets, bei der kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen Tumorgewebe und tumorassoziiertes Normalgewebe festzustellen ist. Zustandsgrößen: *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalt im Tumorgewebe.

4.2.2 Korrelation des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts mit dem Überleben von Glioblastompatienten

An einer Patientenkohorte von 34 primären Glioblastomen wurde nachfolgend der prognostische Einfluss des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts auf das Gesamtüberleben der Glioblastompatienten analysiert. Die Kaplan-Meier Überlebensanalysen bzw. Cox-Regressionsanalysen zeigen, dass bei Unterteilung der Glioblastom-Patientenkohorte in zwei Gruppen entsprechend des medianen *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts keine Korrelation zum Gesamtüberleben der Glioblastompatienten festzustellen ist (Daten nicht gezeigt).

Deshalb wurde die Glioblastom-Patientenkohorte nachfolgend entsprechend des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts in drei Gruppen (Terzile) unterteilt und nachfolgend Kaplan-Meier Überlebensanalysen bzw. die Cox-Regressionsanalysen durchgeführt. Die Analysen zeigen, dass der *EGFR* mRNA-Gehalt nicht mit dem Gesamtüberleben der Glioblastompatienten assoziiert ist (Tabelle 4-5). Glioblastompatienten mit einem verringerten bzw. einem erhöhten *HER2* mRNA-Gehalt (unteres bzw. oberes Terzil) weisen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben und höheres Sterberisiko auf als Glioblastompatienten mit einem mittleren *HER2* mRNA-Gehalt (mittleres Terzil) (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Kaplan-Meier Überlebensanalysen, univariate- bzw. multivariate Cox-Regressionsanalysen: Gesamtüberleben von Glioblastompatienten entsprechend des in Terzile unterteilten *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts.

	Kaplan-Meier Überlebensanalysen		Univariate Cox-Regressionsanalysen		Multivariate Cox-Regressionsanalysen			
	n	Monate (Mittel)	p-Wert	RR (95 % KI)	p-Wert	n	RR (95 % KI)	p-Wert
<i>EGFR</i> unteres Terzil (0,010-0,122)	12	8,9	0,917	1,1 (0,5-2,5)	0,857	9	0,9 (0,4-2,5)	0,897
<i>EGFR</i> mittleres Terzil [#] (>0,122-1,057)	11	10,7		#		10	#	
<i>EGFR</i> oberes Terzil (>1,057-28,353)	11	11,7		0,9 (0,4-2,1)	0,815	9	0,7 (0,3-1,8)	0,456
<i>HER2</i> unteres Terzil (0,002-0,017)	12	10,2	0,029*	1,7 (0,7-4,0)	0,214	10	7,1 (1,8-28,9)	0,006*
<i>HER2</i> mittleres Terzil [#] (>0,017-0,052)	11	15,0		#		9	#	
<i>HER2</i> oberes Terzil (>0,052-0,163)	11	6,1		3,3 (1,3-8,4)	0,010*	9	13,7 (3,2-59,3)	<0,001**

Patientenzahl gesamt: *EGFR* & *HER2* mRNA: n=28. Die Normalisierung des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts erfolgte zum *POLR2A* mRNA-Gehalt. Multivariate Cox-Regressionsanalyse: adjustiert nach Tumorresektion und Karnofsky Index. [#] Referenzgruppe; RR: relatives Risiko; KI: Konfidenzintervall. * p≤0,05 und ** p≤0,001 vs. Referenzgruppe. n=Anzahl der Patienten.

4.3 Bedeutung von EGFR und HER2 in Weichteilsarkomen

Sowohl EGFR als auch HER2 beeinflussen tumorbiologische Prozesse wie Proliferation, Zellmigration und Apoptose (Yarden, 2001). Beide Rezeptoren haben darüber hinaus in einer Vielzahl von Tumorentitäten prognostische Relevanz. Da die Datenlage zur prognostischen Bedeutung von EGFR und HER2 in Weichteilsarkomen (WTS) sehr begrenzt und zum Teil widersprüchlich ist, wurde der prognostische Einfluss von EGFR und HER2 in WTS im Folgenden näher untersucht.

4.3.1 mRNA-Gehalt und Proteingehalt von EGFR und HER2 in Weichteilsarkomen

Das mediane Alter der untersuchten Weichteilsarkompatienten beträgt 59 Jahre (Schwankungsbereich: 14-87 Jahre). Die Normalisierung des *HER2* bzw. *EGFR* mRNA-Gehalts erfolgte zum *HPRT1* mRNA-Gehalt (siehe Abschnitt 3.7.6). Die Normalisierung des EGFR bzw. HER2 Proteingehalts erfolgte zum Totalproteingehalt. Der mediane tumoröse mRNA- bzw. Proteingehalt von HER2 bzw. EGFR sowie der mediane *HER2* und *EGFR* mRNA-Gehalt des tumorassoziierten Normalgewebes ist in Tabelle 4-6 dargestellt. Es zeigt sich, dass die WTS-Tumorproben einen ähnlichen *EGFR* und *HER2* mRNA-Gehalt bzw. einen ähnlichen EGFR und HER2 Proteingehalt aufweisen (Tabelle 4-6). Eine vergleichende Analyse weist ferner für *EGFR* einen 58-fach höheren mRNA-Gehalt im Tumor als im umgebenden Normalgewebe nach (Wilcoxon Rang Test: $p=0,023$; $n=15$). Im Gegensatz dazu weist *HER2* einen 3,9-fach verminderten mRNA-Gehalt im Tumor als im umgebenden Normalgewebe auf (Wilcoxon Rang Test: $p=0,001$; $n=18$). Eine zusätzliche Analyse zur Beurteilung der Diskriminierungskraft des *EGFR* und *HER2* mRNA-Gehalts zwischen Tumorgewebe und tumorassoziiertem Normalgewebe mittels ROC-Kurven zeigt ebenfalls einen signifikanten Unterschied (*EGFR* mRNA-Gehalt: AUC (Fläche unter der Kurve)=0,778, 95 % KI 0,608-0,948, $p<0,001$), (*HER2* mRNA-Gehalt: AUC=0,753, 95 % KI 0,642-0,865, $p<0,001$) (Abb. 4-17). Der Schwellenwert (maximaler Youden Index: maximale Sensitivität bei minimaler 1-Spezifität) zur optimalen Trennung der Gruppenzugehörigkeit Tumorgewebe/tumorassoziiertes Normalgewebe beträgt 0,0023 Kopien *EGFR*/Kopien *HPRT1* (96 % Sensitivität und 33,3 % 1-Spezifität) bzw. 0,2838 Kopien *HER2*/Kopien *HPRT1* (66,7 % Sensitivität und 24,2 % 1-Spezifität). Die Assoziation des tumorösen mRNA- bzw. Proteingehalts von EGFR und HER2 mit klinisch-pathologischen Parametern wurde darüber hinaus mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher analysiert (Anhang: Tabelle 8-2; Tabelle 8-3). Dabei zeigt sich eine signifikante Assoziation zwischen dem mRNA-Gehalt bzw. dem Proteingehalt von EGFR und der Tumorlokalisation (Fisher's Exakt Test: *EGFR* mRNA: $p<0,001$; EGFR Protein: $p=0,024$). Zusätzlich korreliert der *HER2* mRNA-Gehalt mit dem histologischen Subtyp der Tumoren (Fisher's Exakt

Test: $p=0,025$). Darüber hinaus zeigt sich keine weitere Assoziation zwischen dem tumorösen mRNA- bzw. Proteingehalt von EGFR und HER2 und klinisch-pathologischen Parametern der WTS-Patienten (Geschlecht, Tumorstadium, Metastasierung; Auftreten von Rezidiven).

Tabelle 4-6: Medianer EGFR bzw. HER2 mRNA- und Proteingehalt im Tumor- und Normalgewebe von WTS-Patienten.

Probenmaterial	Probenzahl	Median	Schwankungsbereich
Tumorgewebe			
HER2 mRNA	124	$9,3 \cdot 10^{-2}$	$7,6 \cdot 10^{-4} - 3,2 \cdot 10^1$
HER2 Protein	53	$8,0 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^{-2} - 2,1 \cdot 10^1$
EGFR mRNA	124	$4,2 \cdot 10^{-2}$	$4,5 \cdot 10^{-4} - 1,2 \cdot 10^2$
EGFR Protein	55	1,1	$1,6 \cdot 10^{-1} - 2,9 \cdot 10^1$
Normalgewebe			
HER2 mRNA	18	$3,6 \cdot 10^{-1}$	$1,6 \cdot 10^{-2} - 9,2$
EGFR mRNA	15	$7,2 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-5} - 1,1$

Einheit: mRNA: Kopien EGFR bzw. HER2 je Kopie HPRT1, Protein: ng Protein je mg Totalprotein.

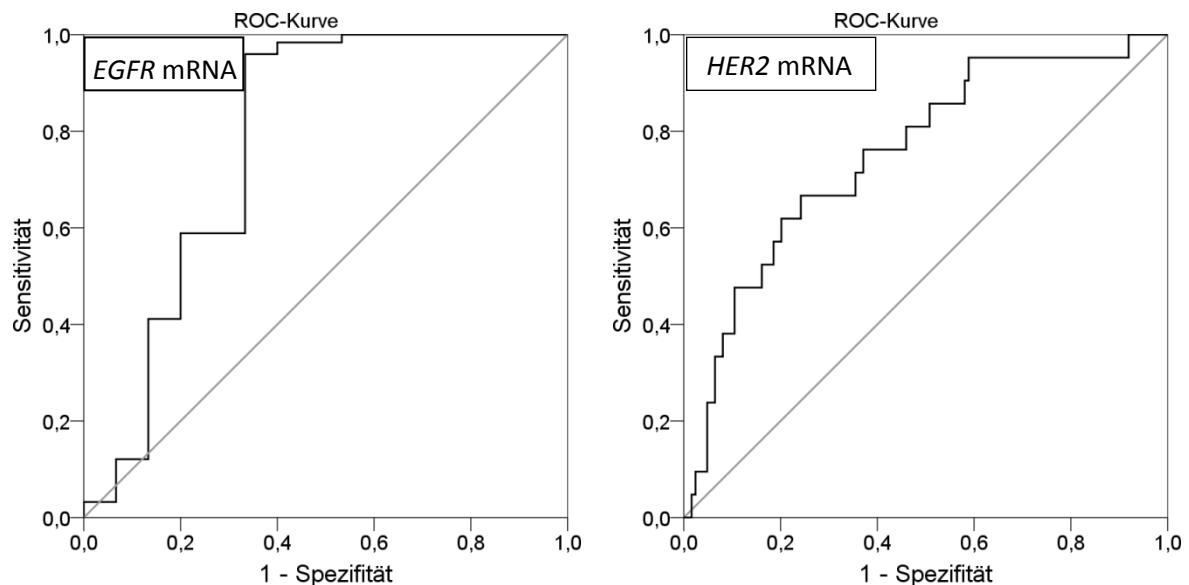


Abb. 4-17: Darstellung der Diskriminierungskraft des EGFR bzw. HER2 mRNA-Gehalts zur Unterscheidung zwischen Tumor- und tumorassoziertem Normalgewebe in WTS-Patienten mit Hilfe von ROC-Kurven.

Die zentrale Linie indiziert die Bezugslinie jedes Datensets, bei der kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen Tumorgewebe und tumorassoziertem Normalgewebe festzustellen ist. Zustandsgrößen: EGFR mRNA-Gehalt im Tumorgewebe bzw. HER2 mRNA-Gehalt im tumorassozierten Normalgewebe.

4.3.2 Korrelation des mRNA-Gehalts und des Proteingehalts von EGFR bzw. HER2 mit dem Überleben von WTS-Patienten

Nachfolgend wurde der prognostische Einfluss des mRNA-Gehalts bzw. des Proteingehalts von EGFR bzw. HER2 auf das Überleben der WTS-Patienten untersucht. Die Unterteilung der WTS-Patientenkohorte anhand der mittels ROC-Kurven ermittelten Schwellenwerte für den *EGFR* und *HER2* mRNA-Gehalt, führte zu einer für weitere multivariate Cox-Regressionsanalysen sehr ungünstigen Gruppeneinteilung. Deshalb wurden die WTS-Patientenkohorte entsprechend des medianen mRNA- bzw. Proteingehalts von EGFR und HER2 in zwei Gruppen unterteilt. Die Kaplan-Meier Überlebensanalysen zeigen, dass ein niedriger *EGFR* mRNA-Gehalt (\leq Median), anders als ein niedriger EGFR Proteingehalt (\leq Median), im Trend mit einem kürzeren mittleren tumorspezifischen Überleben der WTS-Patienten assoziiert ist (*EGFR* mRNA: $p=0,063$; EGFR Protein: $p=0,181$; Log-Rank-Test) (Tabelle 4-7). In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse (adjustiert nach Tumorstadium, histologischem Subtyp, Tumorresektion und Tumorlokalisation) zeigt sich zudem, dass sowohl ein niedriger mRNA-Gehalt als auch ein niedriger Proteingehalt des EGFR mit einem 2,5-fach bzw. 3,0-fach erhöhten Risiko assoziiert ist, am Tumor zu versterben (*EGFR* mRNA: $p=0,003$; EGFR Protein: $p=0,014$) (Tabelle 4-7). Nachfolgend wurde die prognostische Bedeutung von HER2 für das Überleben von WTS-Patienten untersucht. Dabei zeigt sich, dass ein niedriger *HER2* mRNA-Gehalt (\leq Median) in WTS-Patienten in einer Kaplan-Meier Überlebensanalyse bzw. einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse signifikant mit einem kürzeren mittleren tumorspezifischen Überleben bzw. einem 3,0-fach erhöhtem Risiko assoziiert ist, am Tumor zu versterben [Kaplan-Meier Überlebensanalyse: $p=0,010$ (Log-Rank-Test); multivariat: $p>0,001$] (Tabelle 4-7). Der HER2 Proteingehalt ist dagegen weder in einer Kaplan-Meier Überlebensanalyse noch in Cox-Regressionsanalysen mit dem tumorspezifischen Überleben der WTS-Patienten assoziiert (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7: Kaplan-Meier Überlebensanalysen, univariate- bzw. multivariate Cox-Regressionsanalysen: Tumorspezifisches Überleben von WTS-Patienten stratifiziert entsprechend des medianen mRNA- und Proteingehalts von EGFR bzw. HER2.

	Kaplan-Meier Überlebensanalyse		Univariate Cox-Regressionsanalyse		Multivariate Cox-Regressionsanalyse		
	n	Monate (Mittel)	p-Wert	RR (95 % KI)	p-Wert	RR (95 % KI)	p-Wert
RNA							
<i>EGFR</i> ≤ Median	62	58	0,063	1,6 (0,97-2,7)	0,067	2,5 (1,4-4,5)	0,003*
<i>EGFR</i> > Median [#]	62	74		#		#	
<i>HER2</i> ≤ Median	62	47	0,010*	2,0 (1,2-3,4)	0,012*	3,0 (1,6-5,7)	>0,001**
<i>HER2</i> > Median [#]	62	79		#		#	
Protein							
<i>EGFR</i> ≤ Median	28	47	0,181	1,6 (0,8-3,4)	0,187	3,0 (1,3-7,2)	0,014*
<i>EGFR</i> > Median [#]	27	68		#		#	
<i>HER2</i> ≤ Median	26	56	0,894	0,95 (0,5-2,0)	0,895	0,9 (0,3-2,2)	0,734
<i>HER2</i> > Median [#]	27	63		#		#	

Patientenzahl gesamt: *EGFR* & *HER2* mRNA: n=124; *EGFR* Protein: n=55; *HER2* Protein: n=53. Die Normalisierung des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts erfolgte zum *HPRT1* mRNA-Gehalt. Die Normalisierung des *EGFR* Proteingehalts erfolgte zum Totalproteingehalt. Multivariate Cox-Regressionsanalyse: adjustiert nach Tumorstadium, histologischem Subtyp, Tumorresektion und Tumorlokalisation. [#] Referenzgruppe; RR: relatives Risiko; KI: Konfidenzintervall. * p≤0,05 und ** p≤0,001 vs. Referenzgruppe. n=Anzahl der Patienten.

5 Diskussion

Glioblastome sind die häufigsten Tumoren des zentralen Nervensystems und weisen aufgrund ihres sehr schnellen und infiltrativen Wachstums eine sehr ungünstige (infauste) Prognose auf (Liebermann *et al.*, 1985; Wong *et al.*, 1987). Die mediane Überlebenszeit der Patienten beträgt selbst bei optimaler Therapie vom Zeitpunkt der Diagnose nur 14,6 Monate (Stupp *et al.*, 2005). In Glioblastomen liegt der ErbB-Rezeptor EGFR häufig in amplifizierter bzw. in mutierter Form vor (Ohgaki und Kleihues, 2007). EGFR wird unter anderem auch in Glioblastompatienten als mögliches Ziel einer gerichteten Therapie angesehen, da er in die Prozesse der Tumorgenese und Radioresistenz involviert ist (Huang *et al.*, 1997; Ohgaki und Kleihues, 2007; Mukherjee *et al.*, 2009; Fedrigo *et al.*, 2011). Der bevorzugte Dimerisierungspartner des EGFR ist der Rezeptor HER2 (Tzahar *et al.*, 1996). Dieser trägt zur Entwicklung und Progression von Tumoren bei und ist in die maligne Transformation von Astrozytomen involviert (Yarden und Sliwkowski, 2001; Mineo *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der zwei ErbB-Rezeptoren EGFR und HER2 für tumor- und radiobiologische Prozesse von Glioblastomen näher untersucht. Des Weiteren sollte analysiert werden, wie EGFR und HER2 zum malignen Phänotyp von Glioblastomen beitragen. Hierzu sollte der Einfluss des Verlustes von EGFR und HER2 auf zellphysiologische und radiobiologische Prozesse *in vitro* untersucht werden. Dazu wurde die Genexpression von *EGFR* und *HER2* zum einen mit Hilfe spezifischer siRNAs vermindert (schematische Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 8-4), zum anderen wurden die Rezeptoren durch die therapeutischen Antikörper Cetuximab (EGFR-spezifisch) und Trastuzumab (HER2-spezifisch) inhibiert. Die Analysen wurden an den Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG durchgeführt, da diese im Gegensatz zu anderen Glioblastomzelllinien EGFR und HER2 auf mRNA- und Proteinebene exprimieren (Daten nicht gezeigt).

5.1 Bedeutung von EGFR und HER2 für die Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG

5.1.1 Genexpression verschiedener Rezeptoren und Liganden nach Transfektion von EGFR- und HER2-spezifischer siRNAs

Zum besseren Verständnis sind alle zellphysiologischen und zellbiologischen Effekte nach Transfektion von EGFR- bzw. HER2 spezifischer siRNAs schematisch in Tabelle 8-4 zusammengefasst.

Die Transfektion der EGFR-spezifischen siRNA führte in den Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG zu einer deutlichen Reduktion des EGFR mRNA- und Proteingehalts (Abb. 4-1, Abb. 4-2). Zusätzlich zeigte sich in LN-229 Zellen ein Anstieg des HER2 mRNA- und Proteingehalts bzw. ein

Anstieg des *HER3* mRNA-Gehalts. In Studien an Kolonkarzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass eine EGFR Inhibierung mit Hilfe des Tyrosinkinaseinhibitors (TKI) Erlotinib zu einer kompensatorischen Aktivierung von HER2 führte (Learn *et al.*, 2006). An HER2 überexprimierenden Mammakarzinomzelllinien konnte zudem eine kompensatorische Änderung des HER3 Phosphorylierung-Dephosphorylierung Gleichgewichts nach EGFR bzw. HER2 Inhibierung mit Hilfe der Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib (inhibiert EGFR), Gefitinib (inhibiert EGFR) und AG-825 (inhibiert HER2) dokumentiert werden. Die damit verbundene Aktivierung und nachfolgende Interaktion von HER3 mit anderen ErbB-Rezeptoren stellt einen wichtigen Resistenzmechanismus von Tumoren gegenüber einer gezielten EGFR bzw. HER2 Therapie dar (Sergina *et al.*, 2007). Eine kompensatorische Steigerung des HER3 mRNA- und Proteingehalts sowie die Anreicherung von HER3 in der Zellmembran stellen weitere Resistenzmechanismen gegenüber einer gerichteten EGFR bzw. HER2 Tyrosinkinaseinhibitortherapie dar (Sergina *et al.*, 2007; Garrett *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2012). Als Mitglied der ErbB Rezeptor Familie wird HER3 in Tumoren häufig zusammen mit anderen Rezeptortyrosinkinasen exprimiert und fördert durch die Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs die Initiation und Progression von Tumoren (Ma *et al.*, 2014). HER3 ist darüber hinaus in der Lage nach Inhibierung von EGFR die Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs wiederherzustellen. Dies erfolgt durch die Interaktion mit anderen ErbB-Rezeptoren, wodurch es zu einer Um- bzw. Neuverteilung der Signaltransduktion auf andere ErbB-Rezeptoren kommt (Jain *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2012).

Die eigenen Untersuchungen wiesen ferner nach, dass die Reduktion der *EGFR*-Genexpression (siRNA) zu einer Steigerung des Urokinaserezeptor Proteingehalts führte. Der Urokinaserezeptor ist über Glykosylphosphatidylinositol in der Membran verankert und so in der Lage mit einer Vielzahl transmembraner Proteine (Integrinen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren) und Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR, HER2 und HER3) zu interagieren. Der Urokinaserezeptor und die interagierenden transmembranen Proteine und Rezeptoren können über Signaleffektoren wie FAK, SRC und AKT verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren und fördern so die Proliferation und Progression verschiedener humaner Tumoren (Meng *et al.*, 2006; O'Halloran *et al.*, 2013; Noh *et al.*, 2013).

Die Verringerung der *EGFR*-Genexpression resultierte außerdem in einer Erhöhung des mRNA-Gehalts der ErbB Liganden *EGF*, *HB-EGF* und *TGF- α* . Der Ligand EGF fördert die Proliferation von Mammakarzinomen und Glioblastomen (Osborne *et al.*, 1980; Lund-Johansen *et al.*, 1990; Mardin *et al.*, 2013). In Myelomen und Ovarialkarzinomen wurde zudem eine Förderung der Proliferation durch HB-EGF Stimulation beschrieben (Wang *et al.*, 2002; Yagi *et al.*, 2005). Die kompensatorische Änderung der *uPAR*-, *EGF*-, *HB-EGF*- und *TGF- α* -Genexpression stellt

möglicherweise einen weiteren Resistenzmechanismus der Glioblastomzelllinien dar, mit dem diese auf die verringerte *EGFR*-Genexpression reagieren.

Die Reduktion der *HER2*-Genexpression (siRNA) führte in den Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG zu einer deutlichen Reduktion des *HER2* mRNA- und Proteingehalts. Darüber hinaus kam es in der Zelllinie U251MG zu einem Anstieg des *EGFR* mRNA- und Proteingehalts bzw. zu einem Anstieg des uPAR Proteingehalts. In Kolonkarzinomzellen verursachte die Inhibierung von *HER2* mittels scFv-Fragment Antikörper (*single chain variable fragment*), welcher für den Verbleib von *HER2* im Endoplasmatischen Retikulum sorgt, eine verstärkte Expression und Aktivierung von *EGFR* (Hu *et al.*, 2005). Die eigenen Untersuchungen zeigten weiter, dass die Reduktion der *HER2*-Genexpression keinen Einfluss auf den mRNA-Gehalt der Liganden *EGF* und *TGF- α* hatte, aber in der Zelllinie LN-229 zu einer Reduktion des *HB-EGF* mRNA-Gehalts beitrug.

Die simultane Transfektion der *EGFR*- und *HER2*-siRNA verursachte in beiden Glioblastomzelllinien eine ähnliche Reduktion des *EGFR* mRNA- und Proteingehalts wie es auch bei alleiniger Transfektion der *EGFR*-siRNA zu beobachten war. Die Reduktion des *HER2* mRNA- und Proteingehalts war jedoch weniger deutlich ausgeprägt als nach alleiniger Transfektion der *HER2*-siRNA. Zudem zeigte sich eine kompensatorische Erhöhung des *HER3* mRNA-Gehalt (LN-229) bzw. eine Erhöhung des uPAR Proteingehalts (LN-229 und U251MG). Die simultane Transfektion der *EGFR*- und *HER2*-siRNA führte zudem zu einer Erhöhung des mRNA-Gehalts der ErbB Liganden *EGF* und *TGF- α* .

Zusammenfassend kann die gezeigte Erhöhung der Genexpression verschiedener Rezeptoren und Liganden durch die Reduktion der *EGFR*- bzw. der *HER2*-Genexpression (siRNA) als kompensatorischer Mechanismus gedeutet werden, mit dem die Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG auf den Verlust von wachstumsstimulierenden Signalen reagieren. Dies stimmt mit Studien überein die zeigen konnten, dass Glioblastome durch die gleichzeitige Co-Aktivierung verschiedener Rezeptortyrosinkinasen gekennzeichnet sind. Dies führt einerseits zu einer redundanten Aktivierung von Signaltransduktionswegen und verringert andererseits die Abhängigkeit von einzelnen Rezeptortyrosinkinasen. Glioblastome fördern so die Resistenzentwicklung gegenüber zielgerichteten „Targettherapien“ (Stommel *et al.*, 2007; Snuderl *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2014).

5.1.2 Einfluss der verminderten *EGFR*- und *HER2*-Genexpression auf die Proliferation und den Zellzyklus von Glioblastomzelllinien

Sowohl *EGFR* als auch *HER2* sind maßgeblich an der Regulation der Proliferation verschiedener humaner Tumorzelllinien beteiligt (Yarden, 2001; Holbro *et al.*, 2003). Die eigenen Untersuchungen der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG zeigten in diesem Zusammenhang

eine signifikante Reduktion der Proliferation nach Reduktion der *EGFR*-Genexpression (siRNA). In einer anderen Studie an der Glioblastomzelllinie U251MG führte die Reduktion der *EGFR*-Genexpression mittels Antisense- bzw. siRNA ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der Proliferation (Kang *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde für weitere Glioblastomzelllinien (LN-229, U251MG, U87MG, T98G und HS683) eine deutliche Inhibierung der Proliferation nach Inkubation mit dem EGFR Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib beschrieben (Ramis *et al.*, 2012). Hierbei ist jedoch einschränkend zu erwähnen, dass Erlotinib kein spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor des EGFR ist, sondern sechs weitere Tyrosinkinasen hemmt (Conradt *et al.*, 2011).

Die Proliferation wird wesentlich durch eine ungestörte Progression der Zelle durch den Zellzyklus beeinflusst. Der Zellzyklus ist die Abfolge zellulärer Ereignisse, die zur Zellteilung führt. Sowohl EGFR als auch HER2 sind in Tumoren an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Neve *et al.*, 2000; Lui und Grandis, 2002). EGFR reguliert die Transition der Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Busse *et al.*, 2000; Lo und Hung, 2006; Chen *et al.*, 2012b). Die eigenen Zellzyklusanalysen zeigten übereinstimmend, dass die Reduktion der *EGFR*-Genexpression (siRNA) bei beiden Glioblastomzelllinien (LN-229, U251MG) eine Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase bzw. eine Reduktion der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus induzierte. In Übereinstimmung damit resultierte die EGFR-Inhibierung mit Hilfe des Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib in verschiedenen Glioblastomzelllinien (LN-229, U251MG, U87MG, T98G, HS683) in einer Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Ramis *et al.*, 2012). In der Glioblastomzelllinie TJ905 führte die Verringerung der *EGF*-Genexpression (siRNA) ebenfalls zu einem G0/G1-Arrest und zu einer Inhibierung der Zellproliferation (Kang *et al.*, 2005).

EGFR kann nach Aktivierung über den Prozess der Endozytose in den Zellkern transloziert werden und aktiviert hier, allein oder im Zusammenspiel mit Transkriptionsfaktoren wie E2F1, die Expression von G1/S-Regulatoren (B-Myb, Cyclin D1 und Cyclin E) (Lo und Hung, 2006; Brand *et al.*, 2011). Des Weiteren bindet EGFR im Zellkern AT-reiche Konsensussequenzen von Promotoren und induziert so die Expression von Cyclin D1 (Lin *et al.*, 2001). Hierdurch kommt es zu einer Beschleunigung des Zellzyklus bzw. zu einer gesteigerten Proliferation (Joaquin und Watson, 2003; Tao *et al.*, 2005; Lo und Hung, 2006; Brand *et al.*, 2011). In Übereinstimmung damit zeigten die eigenen Untersuchungen in der Zelllinie LN-229 eine Verringerung des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts nach Reduktion der *EGFR*-Genexpression (siRNA). In der Glioblastomzelllinie U251MG kam es nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression dagegen zu keiner Veränderung des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts.

Es ist zu erwähnen, dass das Tumorsuppressorgen PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) in der Zelllinie U251MG mutiert ist (<https://cansar.icr.ac.uk>). Der Verlust eines funktionalen PTEN resultiert in einen steigenden Gehalt des Phospholipids PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-

triphosphate). PIP3 rekrutiert seinerseits verschiedene Proteine wie PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*) an die Plasmamembran. PDK1 ist in der Lage Akt (Proteinkinase B) zu aktivieren. Akt ist wiederum entscheidend an der G1 Zellzyklusprogression beteiligt (Manning und Cantley, 2007; Foster *et al.*, 2010). Neben Cyclin D1 sind eine Vielzahl weiterer Gene (*E2F*, *RP*, *B-MYB*, *C-MYC*, *Cyclin A*, *Cyclin E*, *Cdk2*, *Cdc2*, *Cdk4*, *Cdk6* sowie *p16*) an der Regulation der Transition von Zellen von der G1- in die S-Phase beteiligt (Donjerkovic und Scott, 2000; Foster *et al.*, 2010). Möglicherweise wurde der Zellzyklus der Zelllinie U251MG nach Reduktion der *EGFR*-Genexpression über einen dieser Regulatoren beeinflusst.

Die Verringerung der *HER2*-Genexpression (siRNA) führte in beiden Zelllinien (LN-229; U251MG) zu einer Reduktion der Proliferation. In der Glioblastomzelllinie LN-229 zeigte sich zudem eine Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase bzw. eine Abnahme der Anzahl der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. In Mamma-, Ovarial-, Magen- und nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen resultierte die Inhibierung von *HER2* ebenfalls in einer verringerten Zellproliferation (Scholl *et al.*, 2001; Choudhury *et al.*, 2004; Faltus *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2005; Wolf-Yadlin *et al.*, 2006). In Mamma- und Ovarialkarzinomen konnten außerdem eine verzögerte G1/S-Phase Progression nach Verringerung der *HER2*-Genexpression (siRNA) bzw. durch die Inhibierung von *HER2* (Antikörper) gezeigt werden (Neve *et al.*, 2000; Lane *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004). *HER2* kann die G1/S-Transition über die Aktivitätsänderung verschiedener G1-Regulatoren modifizieren (Zacsek *et al.*, 2005). In Mammakarzinomen führte die Inhibierung von *HER2* (Antikörper) beispielsweise über die Deaktivierung des MAP-Kinase- bzw. des PI3K/AKT-Signalwegs zur Verringerung des Cyclin-D Proteingehalts und letztlich zur Inhibierung der G1/S-Transition (Abb. 5-1) (Neve *et al.*, 2001; Zacsek *et al.*, 2005). In Übereinstimmung dazu zeigten die eigenen Untersuchungen der Zelllinie LN-229 eine Reduktion des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts nach Verringerung der *HER2*-Genexpression (siRNA).

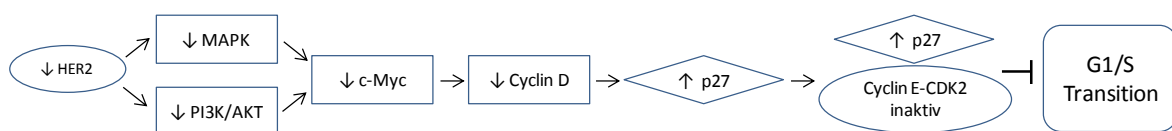


Abb. 5-1: HER2 vermittelte Zellzyklusregulation, modifiziert nach (Zacsek *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zur Zelllinie LN-229, verursachte die Verringerung der *HER2*-Genexpression in der Zelllinie U251MG eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Eine regulatorische Beteiligung von *HER2* an der G2/M-Transition ist bisher jedoch kaum beschrieben. In Mammakarzinomen zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen einem erhöhten *HER2* Proteingehalt und der nukleären Lokalisation des *Forhead* Box Proteins *FOXM1*. Die Expression

von FOXM1 ist während der G2/M-Transition erhöht und unterstützt den Eintritt in die M-Phase (Bektas *et al.*, 2008). An HER2-positiven Mammakarzinomen wurde zudem eine differenzielle Expression verschiedener Gene (*PLK4*, *CEP57*, *CKAP5*, *ALMS1* sowie *TUBA1A*) beschrieben die an der G2/M-Transition beteiligt sind (Kalari *et al.*, 2013). Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass die Verringerung der *HER2*-Genexpression (siRNA) in der Zelllinie U251MG zu einem Anstieg des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts führte (reguliert G1/S-Transition). Der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus blieb in der Zelllinie U251MG jedoch unverändert.

Die eigenen Untersuchungen zeigten weiter, dass die simultane Reduktion der *EGFR*- und *HER2*-Genexpression (siRNA) zu keiner verstärkten Beeinflussung der Proliferation, des Zellzyklus oder des *Cyclin D1* mRNA-Gehalts führte. Stattdessen ähnelten die Effekte denen einer alleinigen Reduktion der *HER2*- bzw. *EGFR*-Genexpression. Als mögliche Erklärung für diese Befunde kommt die in Abschnitt 5.1.1 bereits diskutierte kompensatorische Erhöhung der Genexpression verschiedener Rezeptoren und Liganden in Betracht. Diese resultierten möglicherweise in einer andauernden Signaltransduktion und verhinderten so die Induktion stärkerer Effekte in Bezug auf die Proliferation und den Zellzyklus. In Lungenkarzinomen konnte hingegen gezeigt werden, dass die Inkubation mit dem dualen EGFR/HER2 Tyrosinkinaseinhibitor BIBW2992 zu einer deutlicheren Inhibierung des Wachstums führt, als die Inkubation mit dem EGFR Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (Li *et al.*, 2008). In Blasenkarzinomen wurde zudem nachgewiesen, dass die EGFR Inhibierung mittels Erlotinib nur bei zusätzlicher Reduktion der *HER2*-Genexpression (shRNA) zu einer Reduktion des Wachstums führte (Tsai *et al.*, 2015).

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit der Einfluss von EGFR und HER2 auf die Proliferation und den Zellzyklus in Kombination mit einer Bestrahlung untersucht. In den Zelllinien LN-229 und U251MG zeigte sich durch Bestrahlung mit 6 Gy eine Proliferationsinhibierung und eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Die Induktion von DNA-Schäden insbesondere durch Bestrahlung führt zum Arrest von Zellen in der G1-Phase bzw. in der G2-Phase des Zellzyklus (Rowley und Leeper, 1985; Rutgers *et al.*, 1989; Knox *et al.*, 1993; Kastan und Kuerbitz, 1993; Maity *et al.*, 1994). Ein Arrest dient dabei der Sicherstellung der DNA-Reparatur, um so eine Weitergabe von DNA-Schäden an die Tochterzellen zu vermeiden. Der Arrest in der G1-Phase hemmt die DNA-Synthese und damit den Eintritt in die S-Phase. In vielen Tumorzellen ist jedoch der G1-Arrest, aufgrund der Deregulierung bzw. Mutation von Regulatoren der G1-Phase (p53, Cyclin D1), gestört. In diesem Zusammenhang ist auch für die Zelllinien LN-229 und U251MG die Mutation von p53 beschrieben (cansar.icr.ac.uk). Der Arrest in der G2-Phase verhindert demgegenüber den Eintritt in die Mitose (Arita *et al.*, 1997; Cuddihy und O'Connell, 2003; Hall und Giaccia, 2012; Yan *et al.*, 2014).

Die Kombination aus Bestrahlung (6 Gy) und zusätzlicher Reduktion der *EGFR*-Genexpression (siRNA) führte in der Zelllinie LN-229 zu einer Proliferationsinhibierung aber zu keiner Beeinflussung des strahleninduzierten G2/M-Arrests. In der Zelllinie U251MG zeigte sich dagegen keine Beeinflussung der Proliferation jedoch eine Aufhebung des strahleninduzierten G2/M-Arrests und Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. In ähnlicher Weise führt die Kombination aus *EGFR*-Inhibierung und Bestrahlung (TKI: Gefitinib) in der Plattenepithelkarzinom Zelllinie A431, im Vergleich zu einer alleinigen Bestrahlung, zu einer Verringerung von Zellen in der G2/M-Phase sowie zu einer Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus (Solomon *et al.*, 2003).

Die Kombination aus Bestrahlung und zusätzlicher Reduktion der *HER2*-Genexpression führte in beiden Glioblastomzelllinien zu einer Proliferationsinhibierung. In der Glioblastomzelllinie LN-229 zeigte sich zudem eine Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, in U251MG Zellen dagegen eine Verstärkung des strahleninduzierten G2/M-Arrests. Im Gegensatz dazu resultierte eine *HER2*-Inhibierung bzw. eine Reduktion der *HER2*-Genexpression (TKI: CP724714, shRNA bzw. dominant-negative *HER2* Mutante) in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in einer Aufhebung des strahleninduzierten G2/M-Arrests. *HER2* ist hier, im Gegensatz zu *EGFR*, *HER3* oder *HER4*, durch die Inhibierung der Cyclin-abhängigen Kinase 1 (CDK1) essentiell an der Induktion des strahleninduzierten G2/M-Arrests beteiligt (Yan *et al.*, 2014).

Die Kombination aus Bestrahlung (6 Gy) und simultaner Reduktion der *EGFR*- und *HER2*-Genexpression (siRNA) führt nur in der Zelllinie LN-229 zu einer signifikanten Beeinflussung der Proliferation. Die Auswirkung auf den Zellzyklus ähnelte in der Zelllinie LN-229 dem nach Reduktion der *HER2*-Genexpression, in der Zelllinie U251MG dem nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression.

Zusammenfassend zeigte sich, dass der Einfluss von *EGFR* und *HER2* auf die Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit von der untersuchten Tumorzelllinie schwankt. Dies ist möglicherweise auf eine zelllinienabhängig, unterschiedliche Regulation von Signalwegen durch *EGFR* und *HER2* zurückzuführen. Die eigenen Analysen zeigten zusätzlich, dass *HER2* die Proliferation und den Zellzyklus der Glioblastomzelllinien stärker beeinflusst als *EGFR*. Eine simultane gegen *EGFR* und *HER2* gerichtete Therapie scheint im Vergleich zur alleinigen Reduktion der *EGFR*- bzw. *HER2*-Genexpression zur deutlicheren Hemmung der Proliferation ungeeignet zu sein.

5.1.3 Einfluss der verminderten *EGFR*- und *HER2*-Genexpression auf die Migration von Glioblastomzelllinien

Das diffuse und infiltrative Wachstum von Glioblastomen ist ein schwerwiegendes Problem, das einer erfolgreichen Therapie von Glioblastompatienten entgegensteht. Deshalb wurde das

Migrationsverhalten der Zelllinien LN-229 und U251MG nach Reduktion der *EGFR*- bzw. der *HER2*-Genexpression (siRNA) mit Hilfe eines Wundheilungsassays untersucht. Die Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA) hatte keinen Einfluss auf die Migration der Zelllinien LN-229 und U251MG. Vollmann *et al.* berichteten ebenfalls, dass eine Reduktion der *EGFR*-Genexpression (siRNA) keinen Effekt auf die Zellmigration der Glioblastomzelllinien LN-18 und U373MG hatte (Vollmann *et al.*, 2006). Die Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib führte jedoch zu einer deutlichen Hemmung der Migration der Glioblastomzelllinien LN-229, U87MG und T96G (Wundheilungsassays) (Ramis *et al.*, 2012). Erlotinib ist jedoch kein EGFR-spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor, sondern hemmt sechs weitere Tyrosinkinasen (Conradt *et al.*, 2011). An humanen Gliomgewebeschnitten wurde darüber hinaus beschrieben, dass sich der invasive Randbereich vom soliden Teil des Tumors unterscheidet. Der invasive Randbereich weist häufig stark EGFR-positiv gefärbte Zellen auf, welche zudem ein hohes Verhältnis von Kern- zu zytoplasmatisch lokalisiertem EGFR aufweisen (Burel-Vandenbos *et al.*, 2013). Zusätzlich wurde an humanen Gliomgewebeschnitten eine signifikante Korrelation zwischen der Amplifikation des *EGFR*-Gens und einer erhöhten Migration von Glioblastomzellen beschrieben. Die Inhibierung von EGFR (TKI: Gefitinib) resultierte hierbei in einer signifikanten Reduktion der Migration bzw. Invasion der Glioblastomzellen (Parker *et al.*, 2013). Zusammenfassend zeigt die vorhandene Datenlage keinen eindeutigen Effekt von EGFR auf die Migration von Glioblastomzellen. Dieser scheint durch Faktoren wie das genutzte Analysesystem (Gewebeschnitte vs. Wundheilungsassay), die Lokalisation der Zellen im Tumor und die Inhibierungsstrategie (TKI vs. siRNA) beeinflusst zu sein.

Die für Gliome typische mesenchymale Migration wird durch die Aktivierung der Protease uPA und von Matrix-Metalloproteasen (MMP9) ermöglicht (Friedl und Wolf, 2003). Matrix-Metalloproteasen wie MMP2 und MMP10 vermitteln durch enzymatische Proteolyse die Reorganisation der extrazellulären Matrix und beeinflussen so die Migration und Invasion in verschiedenen Tumorentitäten (Nabeshima *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Al Alem *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). Die eigenen Untersuchungen der Zelllinien LN-229 und U251M zeigten nach der Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA) eine Erhöhung des *MMP2* und *MMP10* mRNA-Gehalts sowie eine deutliche Zunahme des uPAR (Urokinaserezeptor), uPA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) und PAI-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ-1) Proteingehalts. Der Urokinaserezeptor beeinflusst verschiedene für Tumoren bedeutsame Prozesse wie Invasion, Migration, Adhäsion und Proliferation. Zum einen reguliert uPAR nach Bindung seines Liganden uPA die Proteolyse der extrazellulären Matrix. Zum anderen nimmt uPAR durch die Interaktion mit transmembranen Proteinen (Integrinen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren) und Wachstumsfaktorrezeptoren (z. B. EGFR, HER2 und HER3) Einfluss auf

verschiedene Signaltransduktionswege (Ras–ERK-, Ras–MAPK- und FAK-Signalweg) (Blasi und Carmeliet, 2002; Smith und Marshall, 2010; O'Halloran *et al.*, 2013). Der Faktor PAI-1 inhibiert die Protease uPA und trägt damit zur Aufrechterhaltung der umgebenden extrazellulären Matrix bei. Die durch die Interaktion von uPA und PAI-1 regulierte Balance beim Abbau der extrazellulären Matrix fördert so die Migration von Tumorzellen (Czekay *et al.*, 2011). Zusätzlich ist PAI-1 durch die Beeinflussung der Endozytose und des Recyclings von uPAR in der Lage, das Migrationsverhalten von Tumorzellen zu verändern (Smith und Marshall, 2010; Czekay *et al.*, 2011).

In der EGFRvIII exprimierenden Glioblastomzelllinie U373MG konnte nach Inkubation mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib eine Zunahme des uPA Proteingehalts und eine dadurch bedingte Aktivierung einer uPAR abhängigen Signaltransduktion gezeigt werden [EGFRvIII: konstitutiv aktive EGFR Mutante, Deletion der Exone 2-7] (Hu *et al.*, 2014). Dies war in einem *Transwell*-Migrationsassay mit einer verstärkten Migration der Glioblastomzellen verbunden (Hu *et al.*, 2014). Die kompensatorische Aktivierung der uPAR-Signaltransduktion stellt möglicherweise einen Resistenzmechanismus der Glioblastomzellen zur Aufrechterhaltung der Zellmigration und Tumorprogression nach Inhibierung der EGFR-Signaltransduktion dar (O'Halloran *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014). Aus *in vitro* und *in vivo* Studien an Glioblastomen geht zudem hervor, dass die Verringerung der uPAR-Genexpression (shRNA) zur Inhibierung der Migration und Invasion führte (Gondi *et al.*, 2007; Raghu *et al.*, 2011).

Welchen Einfluss die untersuchten Marker (MMP2, MMP10, uPA, uPAR und PAI-1) auf die Migration der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG haben, ist grundsätzlich nur schwer abzuschätzen. Da dieser durch die Höhe ihrer Genexpression, aber vor allem durch das stöchiometrische Verhältnis der Einzelkomponenten zueinander bestimmt wird (Czekay *et al.*, 2011). Die veränderte Genexpression der untersuchten Migrationsmarker hatte nach Verringerung der EGFR-Genexpression (siRNA) allerdings keinen Einfluss auf die Migration der Zelllinien LN-229 und U251MG.

Zusätzlich wurde untersucht ob HER2 die Migration der Glioblastomzelllinien beeinflusst. Die Verringerung der HER2-Genexpression (siRNA) bewirkte in den Zelllinien LN-229 und U251MG eine deutliche Reduktion der Migrationsrate. In Übereinstimmung dazu beschrieben zahlreiche Studien einen Einfluss von HER2 auf die Migration verschiedener Tumorzelllinien (Seton-Rogers *et al.*, 2004; Yamauchi *et al.*, 2008; Zaoui *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2010). In Mammakarzinomen war HER2 in Zusammenspiel mit HER3 an der Vermittlung der Neuregulin-induzierten (NRG- β 1) Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Adam *et al.*, 1998). Die Regulation und Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts ist ein wesentlicher Prozess bei der Migration und der Infiltration von Tumorzellen in das umgebende Gewebe (Cavallaro und Christofori, 2004;

Yamaguchi und Condeelis, 2007). Die Inhibierung von HER2 (Antikörper) schwächt demzufolge die Bildung von motilen Aktin-Zytoskelettstrukturen und hemmt somit die Migration von Mammakarzinomzellen (Adam *et al.*, 1998).

HER2 beeinflusste zusätzlich die Invasion von Glioblastomzellen indem es die *MMP2*- und *MMP9*-Genexpression reguliert (Xu und Xie, 2013). Die eigenen Untersuchungen der Zelllinien LN-229 und U251MG wiesen übereinstimmend eine Reduktion des *MMP2* mRNA-Gehalts nach Verringerung der *HER2*-Genexpression (siRNA) nach. Der *MMP10* mRNA-Gehalt sowie der uPA Proteingehalt wurden dagegen nicht beeinflusst. Es zeigte sich jedoch eine Erhöhung des PAI-1 (LN-229 und U251MG) bzw. uPAR Proteingehalts (U251MG).

Die simultane Verminderung der *EGFR*- und *HER2*-Genexpression (siRNA) resultierte in einer etwas schwächeren Reduktion der Migrationsrate der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG als die alleinige Verminderung der *HER2*-Genexpression. Sie führte zudem zu einer Erhöhung der *MMP2* und *MMP10* mRNA-Gehalte bzw. zu einer Zunahme des uPA, uPAR und PAI-1 Proteingehalts. Die Beeinflussung dieser Migrationsmarker ähnelte jedoch eher den Effekten nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression (EGFR: kein Effekt auf die Migration).

Wie bereits erwähnt kann der Einfluss der untersuchten Marker (*MMP2*, *MMP10*, uPA, uPAR und PAI-1) nach Reduktion der *HER2*- bzw. *HER2*- und *EGFR*-Genexpression auf die Migration nur schwer bestimmt werden. Dieser wird durch die Expressionshöhe und das stöchiometrische Verhältnis der genannten Einzelkomponenten beeinflusst.

In Wundheilungsassays werden methodisch sowohl Migrations- als auch Proliferationseffekte gemessen. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass die Reduktion der Migration nach Verringerung der *HER2*- bzw. *HER2*- und *EGFR*-Genexpression zum Teil auf eine verminderte Proliferation bzw. auf die Induktion von apoptotischen Prozessen zurückzuführen war.

Zusammenfassend zeigten die eigenen Analysen, dass HER2, anders als EGFR, die Migration der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG beeinflusst. Um die Migration von Glioblastomen wirksam zu hemmen, sollte deshalb vor allem HER2 als therapeutisches Ziel näher untersucht werden. Im Vergleich zur alleinigen Reduktion der *HER2*-Genexpression war die simultane Verringerung der *EGFR*- und *HER2*-Genexpression zur stärkeren Inhibierung der Migration nicht geeignet.

5.1.4 Einfluss der verminderten *EGFR*- und *HER2*-Genexpression auf das klonogene Zellüberleben und die Radiosensitivität von Glioblastomzelllinien

Eine Vielzahl von Studien konnte zeigen, dass EGFR in die Regulation der DNA-Reparatur involviert ist. Die durch EGFR aktivierte Signalkaskade regulierte dabei die Hauptprozesse der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen vor allem über den Weg des Nicht-Homologen *End-Joining* (NHEJ)

(Kriegs *et al.*, 2010). Folglich induzierte die Inhibierung von EGFR (monoklonale Antikörper, TKI, Antisense Oligonukleotide, dominant negative *EGFR* Mutante) eine Radiosensitivierung von Glioblastomen und weiterer Tumorentitäten (Chakravarti *et al.*, 2004; Dittmann *et al.*, 2005; Riesterer *et al.*, 2008; Geoerger *et al.*, 2008; Toulany und Rodemann, 2010).

Die eigenen Untersuchungen zeigten nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA) in Kombination mit einer Bestrahlung (6 Gy) allein in der Zelllinie U251MG eine geringe Reduktion des klonogenen Zellüberlebens. Die Radiosensitivität war jedoch bei beiden Glioblastomzelllinien (LN-229, U251MG) nach Reduktion der *EGFR*-Genexpression nicht beeinflusst. Auch andere Studien konnten zeigen, dass die Reduktion der *EGFR*-Genexpression (siRNA) zu keiner Radiosensitivierung von Glioblastomzelllinien (U251MG, T98G) führte (Choi *et al.*, 2014). In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zeigte sich ebenfalls keine Radiosensitivierung nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA) (Choi *et al.*, 2010). Für die Glioblastomzelllinien U87MG und U373MG konnte dagegen nach adenoviraler Transduktion einer dominant negativen *EGFR* Mutante eine vollständige Inhibierung der strahleninduzierten Aktivierung von EGFR sowie eine deutliche Radiosensitivierung nachgewiesen werden (Lammering *et al.*, 2001). In einem *in vivo* Maus-Modell konnte zudem gezeigt werden, dass die Kombination aus Bestrahlung und EGFR-Inhibierung (TKI: Gefitinib) in Gliomen mit *EGFR*-Amplifikation, im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung, zu einer signifikanten Wachstumsverzögerung führte (Geoerger *et al.*, 2008).

An der Vermittlung der zellulären Radioresistenz sind darüber hinaus Regulatoren wie PI3K und AKT beteiligt (Toulany *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2010). Der PI3K-AKT Signalweg ist zudem für das Überleben von Tumorzellen von entscheidender Bedeutung (Toulany *et al.*, 2007). Die eigenen Untersuchungen zeigten nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA) für beide Glioblastomzelllinien (LN-229 und U251MG) eine kompensatorische Verstärkung des mRNA- und Proteingehalts von HER2, HER3 und uPAR bzw. der Liganden (EGF, HB-EGF, TGF- α und uPA). Diese Rezeptoren und Liganden sind an der Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs beteiligt (Chandrasekar *et al.*, 2003; Citri und Yarden, 2006; Gondi *et al.*, 2007). Möglicherweise kommt es durch die kompensatorische Verstärkung der Genexpression der genannten Rezeptoren und Liganden zu einer anhaltenden Signaltransduktion, welche die Induktion einer Radiosensitivierung nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA) in den Zelllinien LN-229 und U251MG entgegenwirkt. Diesbezüglich wurde in Glioblastomzellen nach EGFR-Inhibierung (TKI: AG1478) eine verstärkte Expression von IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor), eine anhaltende Signaltransduktion über den PI3K-AKT Signalweg und eine Resistenz gegenüber einer strahleninduzierten Apoptose beschrieben. Erst die kombinierte Inhibierung von EGFR und IGF1R führte zu einer verstärkten strahleninduzierten Apoptose (Chakravarti *et al.*, 2002).

Die weiteren Analysen zeigten nach Verringerung der *HER2*-Genexpression (siRNA), bei beiden Glioblastomzelllinien (LN-229 und U251MG), eine deutliche Reduktion des klonogenen Zellüberlebens, eine leichte Radiosensitivierung (DMF10: 1,22) in der Zelllinie U251MG aber keinen Einfluss auf die Radiosensitivität der Zelllinie LN-229. Seit langem ist bekannt, dass die Radiosensitivität von Zellen in Abhängigkeit vom Zellzyklus schwankt. So sind Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus radioresistenter und in der späten S-Phase eher radiosensitiver (BERGONIE und Tribondeau, 1959; Pawlik und Keyomarsi, 2004). Wie in Abschnitt 5.1.2 diskutiert führte die Verringerung der *HER2*-Genexpression nur in U251MG aber nicht in LN-229 Zellen zu einer Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Deshalb ist zu vermuten, dass die Radiosensitivierung der Zelllinie U251MG durch eine Verschiebung des Zellzyklus hervorgerufen wurde. In Übereinstimmung dazu wiesen Gao *et al.* in der Zelllinie U251MG nach Verringerung der *HER2*-Genexpression (shRNA) ebenfalls eine Reduktion des klonogenen Zellüberlebens sowie eine Verstärkung dieses Effekts nach zusätzlicher Bestrahlung (6 Gy) nach (Gao *et al.*, 2010). Gao *et al.* zeigten außerdem in einem Maus-Xenograft Modell, dass die Verringerung der *HER2*-Genexpression (shRNA) zu einer Inhibierung des Tumorwachstums führte. Dieser Effekt wurde durch eine zusätzliche Bestrahlung (2 Gy pro Tag für 5 Tage insgesamt) deutlich verstärkt (Gao *et al.*, 2010). Auch in Mammakarzinomen führte die Inhibierung von HER2 (Antikörper sowie *Affibody*) bzw. die Reduktion der *HER2*-Genexpression (siRNA) zu einer Radiosensitivierung (Steffen *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009; Ekerljung *et al.*, 2012; Duru *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu zahlreichen Studien, die beschrieben, dass die simultane Inhibierung von EGFR und HER2 (TKIs bzw. Antikörper) zu einer Radiosensitivierung verschiedener Tumorentitäten führte (Fukutome *et al.*, 2006; Sambade *et al.*, 2009; Kimple *et al.*, 2010), zeigten die eigenen Analysen für die Glioblastomzelllinien U251MG und LN-229 keine Radiosensitivierung nach simultaner Reduktion der *EGFR*- und *HER2*-Genexpression (siRNA).

Die simultane Reduktion der *EGFR*- und *HER2*-Genexpression führte in den Glioblastomzelllinien U251MG und LN-229 zu einer ähnlichen kompensatorischen Verstärkung der Genexpression von *HER2*, *HER3* und *uPAR* bzw. ihrer Liganden (*EGF*, *HB-EGF*, *uPA*), wie die alleinige Reduktion der *EGFR*-Genexpression. Dadurch kam es möglicherweise wie zuvor erwähnt zu einer anhaltenden Aktivierung des PI3K-AKT Signalwegs, wodurch die Induktion einer Radiosensitivierung verhindert wurde. Darüber hinaus führte die Reduktion der Genexpression beider Rezeptoren, anders als die alleinige Reduktion der *HER2*-Genexpression, nicht zu einer Akkumulation der Zellen in der radiosensitiven G2/M-Phase des Zellzyklus.

Zusammenfassend zeigten die eigenen Untersuchungen, dass HER2 das klonogene Zellüberleben und die Radiosensitivität der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG stärker beeinflusste als EGFR. Der Einfluss von HER2 auf die Radiosensitivität variierte dabei zelllinienabhängig. Eine

simultane gegen EGFR und HER2 gerichtete Therapie (siRNA) schien zur Induktion radiobiologischer Effekte nicht geeignet zu sein.

5.1.5 Einfluss der verminderten *EGFR*- und *HER2*-Genexpression auf die Apoptose von Glioblastomzelllinien

Glioblastome zeichnen sich durch eine besonders ausgeprägte Apoptoseresistenz aus (Krakstad und Chekenya, 2010; Ramis *et al.*, 2012; Eisele und Weller, 2013). Eine Steigerung der Apoptoserate bietet damit eine direkte Interventionsmöglichkeit zur Therapie dieser malignen Tumoren. Nach Induktion der Apoptose über den extrinsischen bzw. intrinsischen Weg werden verschiedene Initiator-Caspasen (Caspasen 2, 8, 9 und 10) aktiviert. Diese aktivieren wiederum Effektor-Caspasen (Caspasen 3, 6 und 7), welche durch Degradation intrazellulärer Proteine und Aktivierung der caspaseaktivierten DNase (DFF40/CAD) zur Spaltung der genomischen DNA und damit zum Zelltod führen (Widmann *et al.*, 1998; Elmore, 2007). Deshalb wurde untersucht, wie die Reduktion der *EGFR*- und *HER2*-Genexpression (siRNA) die Apoptose der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG beeinflusst.

Die eigenen Analysen zeigten nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA) nur in der Zelllinie LN-229 eine gesteigerte Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7 bzw. eine verstärkte Spaltung von PARP [*Poly (ADP-ribose) polymerase*]. Die Spaltung und die damit verbundene Deaktivierung von PARP gilt als Indikator für die Induktion von Apoptose (Boulares *et al.*, 1999; Mullen, 2004). In seiner aktiven Form detektiert und bindet PARP DNA Einzel- und Doppelstrangbrüche und ist in die Reparatur von DNA-Schäden involviert (Kim *et al.*, 2005). In den eigenen Untersuchungen der Zelllinien LN-229 und U251MG führte die Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA) jedoch weder zur Beeinflussung der Vitalität noch zur Bildung apoptotischer Zellkerne. Auch in anderen Glioblastomzelllinien (LN-229, U87MG, HS683, T98G, U251MG und U373MG) hatte die Inhibierung von EGFR (TKI: Erlotinib) keinen Einfluss auf die Vitalität bzw. die Apoptoseinduktion (Ramis *et al.*, 2012).

Tumore entwickeln häufig Resistenzen gegen gezielte EGFR-Therapien. Diese werden unter anderem durch die Aktivierung alternativer Signalwege (MET-Amplifikation, Verstärkung der *HER2*-Genexpression, Mutation und konstitutive Aktivierung von KRAS oder Aktivierung des mTOR Signalweges) vermittelt. Deshalb führte die Inhibierung von EGFR (TKI, Antikörper) häufig nicht zur Zunahme der Apoptoserate (Chong und Janne, 2013; Eisele und Weller, 2013). In Übereinstimmung dazu zeigten die eigenen Analysen der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA), wie unter Abschnitt 5.1.1 diskutiert, eine kompensatorische Steigerung der Genexpression verschiedener Rezeptoren (*HER2*, *HER3*, *uPAR*) und Liganden (*EGF*, *HB-EGF*, *uPA*). Diese sind zur Aktivierung

unterschiedlicher Signaltransduktionswege (PI3-Kinase, AKT, RAF-Kinasen, MAPK) befähigt (Smith und Marshall, 2010; O'Halloran *et al.*, 2013; Roskoski, Jr., 2014) und verhindern so möglicherweise die Apoptoseinduktion nach Reduktion der *EGFR*-Genexpression (siRNA).

Die Verringerung der *HER2*-Genexpression (siRNA) führte bei beiden Glioblastomzelllinien (LN-229 und U251MG) zu einer gesteigerten Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7 bzw. zu einer verstärkten Spaltung von PARP. Dies resultierte jedoch allein in der Zelllinie U251MG in einer leichten Reduktion der Vitalität bzw. in einer Zunahme apoptotischer Zellkerne um circa 11 %. Gao *et al.* zeigten nach Reduktion der *HER2*-Genexpression (shRNA) in der Zelllinie U251MG ebenfalls eine Caspase 3/7 Aktivierung und eine Steigerung der Apoptoserate (Gao *et al.*, 2010). Die regulatorische Bedeutung von HER2 für apoptotische Prozesse wurde zudem in zahlreichen weiteren Studien beschrieben. Eine erhöhte *HER2*-Genexpression führte beispielsweise in Mammakarzinomen zu einer verstärkten Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L (Kumar *et al.*, 1996). Darüber hinaus inhibierte HER2 in Mammakarzinomen durch Translokation in die Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom c. Dadurch wurde die Bildung des Apoptosoms und somit der mitochondriale Apoptoseweg gehemmt (Ding *et al.*, 2012).

Die eigenen Untersuchungen zeigten bei beiden Glioblastomzelllinien keine Bildung apoptotischer Zellkerne nach Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA). Die Verringerung der *HER2*-Genexpression (siRNA) führte zudem allein in U251MG Zellen zu einer geringen Zunahme apoptosetypischer Zellkerne. Für die Glioblastomzelllinie LN-18 wurde in diesem Zusammenhang beschrieben, dass die Aktivierung des caspaseabhängigen Zelltods nicht zur Umbildung des Chromatins zu Apoptosekörperchen führt (Sanchez-Osuna *et al.*, 2014). Diese Zelllinie exprimiert nur geringe Mengen der für die DNA-Fragmentierung notwendigen caspaseaktivierten DNase (DFF40/CAD). Eine Erhöhung der *DFF40/CAD*-Genexpression führte zwar zur Degradation der DNA in Oligonukleotide, jedoch nicht zur Bildung von Apoptosekörperchen. Sanchez-Osuna *et al.* postulierten deshalb die Notwendigkeit eines weiteren DFF40/CAD-unabhängigen Mechanismus zur Bildung von Apoptosekörperchen nach Apoptoseinduktion (Sanchez-Osuna *et al.*, 2014). Es kann deshalb vermutet werden, dass auch die Zelllinien LN-229 und U251MG ähnliche Defekte aufweisen, welche die Ausbildung von apoptosetypischen Zellkernen nach Reduktion der *EGFR*- bzw. der *HER2*-Genexpression verhindern.

Zusammenfassend zeigten die eigenen Untersuchungen, dass die Reduktion der *HER2*-Genexpression (siRNA), im Gegensatz zur Verringerung der *EGFR*-Genexpression (siRNA), zelllinienabhängig die Bildung apoptosetypischer Zellkerne induzierte. Ferner wurde deutlich, dass die Aktivierung der Caspasen 3/7 und die Spaltung von PARP in Glioblastomen nicht zwangsläufig zur Bildung apoptosetypischer Zellkerne führte.

5.1.6 Inhibierung von EGFR und HER2 durch therapeutische Antikörper

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Cetuximab- (monoklonaler Antikörper gegen EGFR) bzw. Trastuzumab-Therapie (monoklonaler Antikörper gegen HER2) die Prognose von Kopf-Hals- (Bonner *et al.*, 2006) bzw. Mammakarzinompatienten (Slamon, 2000) verbessert. Slamon *et al.* berichteten, dass die Kombination aus Chemo- und Trastuzumab-Therapie das mediane Überleben von Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom verlängert (25,1 vs. 20,3 Monate; $p=0,046$). Zusätzlich reduzierte sich das Sterberisiko um 20 % im Vergleich zu Patienten mit einer ausschließlichen Chemotherapie (Slamon *et al.*, 2001). Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich konnte eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens nach einer Kombination aus Radio- und Cetuximab-Therapie im Vergleich zu einer alleinigen Radiotherapie gezeigt werden ($RR=0,74$; 95 % $CI=0,57-0,97$; $p=0,03$) (Bonner *et al.*, 2006). Neuere Untergruppenanalysen der Studien von Bonner *et al.* (Bonner *et al.*, 2006; Bonner *et al.*, 2010) zeigten jedoch, dass Patienten, die eine akzelerierte Strahlentherapie mit *Concomitant-Boost* erhalten hatten, im Gegensatz zu Patienten die mit einer konventionellen Strahlentherapie behandelt wurden, nicht von einer Cetuximab-Therapie profitierten (Rowan, 2010). [*Concomitant-Boost* Bestrahlungen verbessern das Überleben von Patienten im Vergleich zu Standard Bestrahlungen (Bestrahlung einmal täglich) (Rowan, 2010)]. Eine weitere Untergruppenanalyse der Studien von Bonner *et al.* legte zudem nahe, dass eine Cetuximab-Therapie vor allem Patienten mit HPV-ähnlichem (Humane Papillomviren) Phänotyp nützt (Riaz *et al.*, 2013).

Die durch eine Cetuximab-Therapie hervorgerufenen *in vivo* Effekte können sich jedoch deutlich von *in vitro* Effekten unterscheiden. Die eigenen *in vitro* Untersuchungen der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG zeigten nach Cetuximab-Inkubation keine Beeinflussung des EGFR mRNA- und Proteingehalts. Zusätzlich konnte kein bzw. nur ein geringer Einfluss auf die Genexpression der Rezeptoren *HER2* und *HER3*, verschiedener ErbB Liganden (*EGF*, *HB-EGF* und *TGF- α*), des Zellzyklusregulators *Cyclin D1*, verschiedener Migrations- bzw. Invasionsmarker (*MMP2*, *MMP10*, *uPAR*, *uPA* und *PAI-1*) sowie auf die Aktivität der Caspasen 3/7 bzw. die Spaltung von PARP nachgewiesen werden. Trotz dieser vereinzelt, geringen Effekte blieb die Cetuximab-Inkubation ohne signifikante Auswirkungen auf die Proliferation, den Zellzyklus, die Migration sowie die Induktion der Apoptose. Schulte *et al.* beschrieben übereinstimmend, dass eine Inkubation mit Cetuximab keine Beeinträchtigung der Proliferation und Migration der Glioblastomzelllinie BS153 zur Folge hatte (Schulte *et al.*, 2013). Eine Cetuximab-Therapie induzierte auch in Kopf-Hals Tumoren und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen *in vitro* keinerlei antitumorale Effekte (Upez-Albaitero und Ferris, 2007; Chen *et al.*, 2012a). In Lungenkarzinomen führte eine Cetuximab-Inkubation nur in einem Teil der EGFR-exprimierenden Zelllinien zu einer Inhibierung

der Zellproliferation und zu einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus (Raben *et al.*, 2005). Raben *et al.* postulierten deshalb die Validierung von prädiktiven Selektionsmarkern für die Cetuximab-Therapie von Patienten (Raben *et al.*, 2005). Diesbezüglich gelten Mutationen in den GTPasen *KRAS* und *NRAS* bzw. in der Serin/Threonin-Proteinkinase *BRAF* als negative Prädiktoren für den Erfolg einer Cetuximab-Therapie (De Roock *et al.*, 2010). Demgegenüber führte eine Cetuximab-Inkubation verschiedener Kolonkarzinomzelllinien unabhängig vom *KRAS*-/*BRAF*-Mutationsstatus zu keiner Inhibierung des Wachstums (Matsuo *et al.*, 2011).

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* kein Einfluss einer Cetuximab-Inkubation auf das klonogene Zellüberleben und die Radiosensitivität der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG nachgewiesen werden. Combs *et al.* konnten dagegen in verschiedenen Glioblastomzelllinien (LN-229, U87MG, LN-18, NCH-82 und NCH-89), *in vitro*, eine starke Reduktion des klonogenen Zellüberlebens nach Cetuximab-Inkubation zeigen (Combs *et al.*, 2007). In einem Nacktmausmodell der Glioblastomzelllinie U87MG wurde zudem eine signifikante Radiosensitivierung nach Cetuximab-Inkubation beschrieben (Miqueli *et al.*, 2009). In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten berichteten Baumann *et al.* dagegen, dass in den meisten *in vitro* Tumormodellen keine Radiosensitivierung nach der Inkubation mit Cetuximab nachgewiesen werden kann (Baumann *et al.*, 2007).

Darüber hinaus konnten Hasselbach *et al.* in der Gliomzelllinie SK-MG-3 keine Beeinflussung des AKT-Signalwegs durch eine Cetuximab-Inkubation zeigen (Hasselbalch *et al.*, 2010). Zudem konnte Cetuximab zwar die Bindung von EGF an seinen Rezeptor EGFR unterbinden, war jedoch nicht in der Lage die Aktivierung von EGFR durch Heregulin- β 1 zu inhibieren (Yang *et al.*, 2006a). Zusätzlich konnte in *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen gezeigt werden, dass Cetuximab nicht die intrazelluläre Transaktivierung von EGFR durch verschiedene Alpha-1-Adrenorezeptoren hemmt (Ulu *et al.*, 2013). Cetuximab stimulierte zudem die Phosphorylierung von EGFR (Wildtyp) sowie der Mutante EGFRvIII in Glioblastom- (U-373MG, BS153) und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien (NCI-H292, NCI-H460) (Yoshida *et al.*, 2008; Jutten *et al.*, 2009; Schulte *et al.*, 2013). Matsuo *et al.* beschrieben außerdem die Phosphorylierung und Aktivierung des EGFR/MAPK Signalwegs durch eine Cetuximab-Inkubation (Matsuo *et al.*, 2011). Zusätzlich konnte die Bindung von Cetuximab an EGFR dessen Transport in den Zellkern stimulieren. Im Zellkern wirkte EGFR dann als potenzieller Transkriptionsfaktor. EGFR beeinflusste hier die Expression verschiedener Gene (*Cyclin D1*, *iNOS*, *B-MYB*, *Aurora Kinase A* sowie *COX-2*) und förderte so die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Cetuximab (Liao und Carpenter, 2009; Li *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurden an den Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG, *in vitro*, ebenfalls die Folgen einer Trastuzumab-Inkubation analysiert. Diese hatte keinen Einfluss auf den mRNA-Gehalt von *HER2*, führte aber zu einer leichten bis mittleren Reduktion des HER2 Proteingehalts. In Übereinstimmung dazu wurde in zahlreichen Studien eine Internalisierung und nachfolgende Degradation von HER2 nach Trastuzumab-Inkubation gezeigt (zum Buschenfelde *et al.*, 2002; Mittendorf *et al.*, 2006; Fiszman und Jasnis, 2011). Die eigenen Untersuchungen zeigten außerdem keinen signifikanten Einfluss der Trastuzumab-Inkubation auf die Genexpression der Rezeptoren *EGFR* und *HER3*, verschiedener ErbB Liganden (*EGF*, *HB-EGF* und *TGF- α*), des Zellzyklusregulators *Cyclin D1*, der Migrations- bzw. Invasionsmarker *MMP2*, *MMP10*, *uPAR*, *uPA* und *PAI-1* sowie auf die Aktivierung der Caspasen 3/7 oder die Spaltung von PARP.

Für HER2-überexprimierende Mammakarzinomzelllinien wurde nach Trastuzumab-Inkubation, *in vitro*, eine Radiosensitivierung, eine Inhibierung des klonogenen Zellüberlebens, der Migration, des Zellzyklus und der Proliferation sowie die Induktion von Apoptose beschrieben (Lane *et al.*, 2001; Yakes *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2003; Longva *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2012). Die Trastuzumab-Inkubation der Glioblastomzelllinien U351MG und A172 führte im Gegensatz zur Glioblastomzelllinie U87MG zu einer gesteigerten Zytotoxizität und Apoptoserate (Mineo *et al.*, 2004). Die eigenen Untersuchungen der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG konnten dagegen keinen dieser Effekte nachweisen. In einer weiteren *in vitro* Studie an Mammakarzinomzellen (MCF10A) wurde ebenfalls beschrieben, dass Trastuzumab nicht in der Lage war die Liganden-induzierte Bildung von HER2-Heterodimeren bzw. das durch HER2-Heterodimere vermittelte Zellwachstum zu inhibieren (Ghosh *et al.*, 2011).

Die eigenen Untersuchungen wiesen für die Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG außerdem nach, dass die simultane Cetuximab- und Trastuzumab-Inkubation, *in vitro*, zu keiner bzw. zu einer geringen Beeinflussung der Genexpression der Rezeptoren *EGFR*, *HER2* und *HER3* führte. Zudem konnte kein bzw. nur ein geringer Effekt auf die Genexpression verschiedener ErbB Liganden (*EGF*, *HB-EGF* und *TGF- α*), des Zellzyklusregulators *Cyclin D1* sowie auf die Migrations- bzw. Invasionsmarker *MMP2*, *MMP10*, *uPAR*, *uPA* und *PAI-1* nachgewiesen werden. Trotz einzelner Effekte auf die Genexpression dieser Marker führte die simultane Cetuximab- und Trastuzumab-Inkubation zu keiner signifikanten Beeinflussung der Proliferation, des Zellzyklus, der Migration, des klonogenen Zellüberlebens bzw. der Radiosensitivität.

Sowohl für Cetuximab als auch für Trastuzumab ist bekannt, dass diese eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) induzieren können, welche in entscheidendem Maße zur antitumoralen Wirkung von Cetuximab bzw. Trastuzumab beiträgt (Clynes *et al.*, 2000; Barok *et al.*, 2007; Upez-Albaitero und Ferris, 2007; Srivastava *et al.*, 2013; Nakadate *et al.*, 2014). Die ADCC ist ein nicht-phagozytischer Prozess, bei dem zytotoxische Effektorzellen (natürliche

Killerzellen, Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten) antikörperbeladene Zielzellen durch Freisetzung von zytotoxischen Granula oder die Expression von zelltodinduzierenden Molekülen töten (Teillaud, 2001). Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien beschrieben, dass die Wirkung einer durch Cetuximab bzw. Trastuzumab induzierten und durch NK-Zellen (natürliche Killerzellen) vermittelten ADCC durch die adjuvante Therapie mit immunmodulatorischen Interleukinen wie IL2, IL-12 und IL-21 signifikant verstärkt werden konnte (Roda *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2008; Jaime-Ramirez *et al.*, 2011). In Tumorzellen (Mammakarzinom: MCF-7, AU565, SKBR3, Ovarialkarzinom: SKOV3) mit erhöhter *HER2*-Genexpression konnte zudem die Internalisierung von *HER2*-Trastuzumab Komplexen gezeigt werden. Diese resultierte in einer verstärkten Präsentation von *HER2*- bzw. Trastuzumab-Epitopen in MHC-Klasse-I-Komplexen (Haupthistokompatibilitätskomplex). Nachfolgend kam es dadurch zu einer verstärkten Stimulation von *HER2*- bzw. trastuzumabspezifischen CTLs (zytotoxische T-Lymphozyten) und zu einer verstärkten Lyse der Tumorzellen durch *HER2*- bzw. trastuzumabspezifische CTLs (zum Buschenfelde *et al.*, 2002; Mittendorf *et al.*, 2006).

Diese Daten legen zusammenfassend nahe, dass die Aktivierung des Immunsystems für die Induktion antitumorale Effekte durch die therapeutischen Antikörper Cetuximab und Trastuzumab, *in vivo*, von entscheidender Bedeutung ist. Darüber hinaus zeigten die eigenen Untersuchungen, dass sowohl die alleinige als auch die simultane Inhibierung von EGFR und *HER2* mittels Cetuximab bzw. Trastuzumab ungeeignet war, um *in vitro* in Abwesenheit immunologischer Komponenten (z. B. zytotoxische T-Lymphozyten) antitumorale Effekte zu induzieren.

5.2 Klinische und prognostische Bedeutung von EGFR und HER2 in primären Glioblastomen und Weichteilsarkomen

5.2.1 Histopathologische und klinische Bedeutung von EGFR und HER2 in primären Glioblastomen

Glioblastome weisen als Tumoren des zentralen Nervensystems aufgrund ihres sehr schnellen und infiltrativen Wachstums auch bei optimaler Therapie eine sehr ungünstige Prognose auf (Nieder *et al.*, 2005; Stupp *et al.*, 2005; Dolecek *et al.*, 2012). Um die Prognose von Glioblastompatienten zu verbessern, ist die molekulare Charakterisierung dieser Tumorentität von entscheidender Bedeutung. EGFR ist an den Prozessen der Tumorgenese und Tumorprogression beteiligt und wird deshalb als ein mögliches Ziel einer gerichteten Tumorthherapie betrachtet (Huang *et al.*, 1997; Kopp *et al.*, 2003; Ohgaki und Kleihues, 2007; Yatabe *et al.*, 2008).

Die eigenen Analysen an 34 primären Glioblastomen zeigten für den *EGFR* mRNA-Gehalt keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe. Verschiedene Studien am Tumorgewebe von Glioblastomen beschrieben dagegen eine erhöhte *EGFR*-Genexpression bzw. Amplifikation des *EGFR*-Gens (Voelzke *et al.*, 2008; Belda-Iniesta *et al.*, 2008). Glioblastome (Grad IV Tumoren) wiesen zudem signifikant häufiger *EGFR*-positive Zellen auf, als anaplastische Astrozytome (Grad III Tumoren) (Rainov *et al.*, 1997). Eine intensive immunhistochemische (IHC) *EGFR*-Färbung verbunden mit einem hohen Verhältnis von Kern- zu zytoplasmatisch lokalisiertem *EGFR* charakterisierte darüber hinaus Glioblastomzellen im infiltrativen Randbereich des Tumors, im Gegensatz zu Zellen, die im soliden Teil des Tumors lokalisiert waren (Burel-Vandenbos *et al.*, 2013). Primäre und sekundäre Glioblastome unterschieden sich zudem in der Häufigkeit von *EGFR*-Alterationen. Circa 36 % der primären Glioblastome, aber nur 8 % der sekundären Glioblastome wiesen eine Amplifikation des *EGFR*-Gens auf. Ein erhöhter *EGFR* Proteingehalt (IHC) war in 63 % der primären Glioblastome, aber nur in circa 10 % der sekundären Glioblastome nachweisbar (Watanabe *et al.*, 1996; Ohgaki, 2005; Ohgaki und Kleihues, 2007).

Darüber hinaus zeigten die eigenen Analysen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem *EGFR* mRNA-Gehalt und klinisch-pathologischen Parametern der Glioblastompatienten (Alter, Geschlecht, Karnofsky Index, Tumorlokalisation). In Übereinstimmung dazu wiesen Studien an Glioblastomen keine signifikante Assoziation zwischen der Amplifikation des *EGFR*-Gens bzw. einer erhöhten Genexpression von *EGFR* und prognostisch relevanten Parametern (Alter, Geschlecht und Karnofsky Index) nach (Hurtt *et al.*, 1992; Shinojima *et al.*, 2003; Quan *et al.*, 2005).

Die eigenen Analysen zum *HER2* zeigten in den 34 untersuchten primären Glioblastomen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem *HER2* mRNA-Gehalt im Tumor- und Normalgewebe. An astrozytären Tumoren wurde diesbezüglich eine Abnahme des *HER2* Proteingehalts mit steigendem Malignitätsgrad der Tumoren beschrieben. Diffuse Astrozytome (Grad II Tumore) und anaplastische Astrozytome (Grad III Tumore) wiesen dabei einen hohen, Glioblastome (Grad IV Tumore) dagegen einen geringen *HER2* Proteingehalt (IHC) auf (Reszec *et al.*, 2011). Reszec *et al.* konnten *HER2* zudem in sekundären Glioblastomen (gehen aus anaplastischen Astrozytomen hervor) aber nicht in primären Glioblastomen auf Proteinebene nachweisen (Reszec *et al.*, 2011). In Übereinstimmung damit dokumentierten Koka *et al.* nur in 15,4 % der Glioblastompatienten einen erhöhten *HER2* Proteingehalt (IHC) (Koka *et al.*, 2003). In Glioblastomen konnte zudem keine Amplifikation des *HER2*-Gens (FISH-Analyse) nachgewiesen werden (Haynik *et al.*, 2007). Kristt und Yarden beschrieben dagegen einen Anstieg des *HER2* Proteingehalts (IHC) mit steigendem Malignitätsgrad astrozytärer Tumoren (Kristt und Yarden, 1996).

Die eigenen Analysen zeigten des Weiteren keine signifikante Korrelation zwischen dem *HER2* mRNA-Gehalt und klinisch-pathologischen Parametern der Glioblastompatienten (Alter, Geschlecht, Karnofsky Index, Tumorlokalisation). In Übereinstimmung damit konnten Mineo *et al.* an Gliom- und Glioblastompatienten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem *HER2* Proteingehalt und klinisch-prognostischen Parametern (Alter, Tumorlokalisation und Karnofsky Index) nachweisen (Mineo *et al.*, 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl *EGFR* als auch *HER2* in den Prozess der malignen Transformation von Glioblastomen involviert sind. Die studienabhängigen Differenzen erschweren jedoch eine abschließende Bewertung. Die eigenen Untersuchungen deuteten auf eine eher untergeordnete klinische Relevanz beider Rezeptoren hin.

5.2.2 Histopathologische und klinische Bedeutung von *EGFR* und *HER2* in Weichteilsarkomen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zum klinischen Einfluss von *EGFR* in Weichteilsarkomen (WTS) sind von besonderer Bedeutung, da bisher nur wenige *EGFR*-Studien zu WTS veröffentlicht wurden. Im Gegensatz zu den untersuchten Glioblastomen, zeigte sich im Tumorgewebe der WTS ein höherer *EGFR* mRNA-Gehalt als im umgebenden Normalgewebe. Studien an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs und Nierenkarzinomen stellten ebenfalls eine höhere *EGFR*-Genexpression im Tumor- als im Normalgewebe fest (Merseburger *et al.*, 2005; Shaib *et al.*, 2012). Mammakarzinome wiesen dagegen einen niedrigeren *EGFR* mRNA-Gehalt als normale Brustzellen aus terminalen duktulo-lobulären Einheiten auf (Meseure *et al.*, 2012). In Prostatakarzinomen war der *EGFR* mRNA-Gehalt gegenüber dem Normalgewebe erhöht, der *EGFR* Proteingehalt (IHC) hingegen erniedrigt (Turkeri *et al.*, 1994). In WTS zeigten verschiedene Studien, dass der *EGFR* Proteingehalt (IHC) studienabhängig und in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp schwankt (Duda *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006b). Dobashi *et al.* beschrieben außerdem, dass sowohl benigne (gutartige) Läsionen als auch maligne (bösartige) WTS *EGFR* auf Proteinebene exprimieren (IHC). *EGFR* wurde jedoch nur in malignen WTS phosphoryliert (Dobashi *et al.*, 2007). Die immunhistochemische Quantifizierung des *EGFR* Proteingehalts wurde in WTS zudem stark durch den verwendeten Antikörper beeinflusst (Kersting *et al.*, 2006).

Die eigenen Untersuchungen der WTS wiesen außerdem eine Korrelation zwischen dem mRNA- bzw. Proteingehalt von *EGFR* und der Tumorlokalisation nach (siehe Tabelle 8-2). Aus der zur Verfügung stehenden Literatur ist bisher nur wenig zur klinischen und histologischen Relevanz von *EGFR* bekannt. Sato *et al.* beschrieben im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten keine Korrelation zwischen dem *EGFR* Proteingehalt (IHC) und der Tumorlokalisation, wohl aber zum histologischen Subtyp und dem Tumorstadium (Sato *et al.*, 2005).

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit die histopathologische und klinische Bedeutung von HER2 für WTS untersucht. Das WTS-Tumorgewebe wies einen niedrigeren *HER2* mRNA-Gehalt auf als das umgebende Normalgewebe. Auch das Tumorgewebe von Uterus- und Synovialsarkomen wies einen geringen HER2 mRNA- bzw. Proteingehalt auf (Amant *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2005; Zafrakas *et al.*, 2009). In anderen Studien am Tumorgewebe von Synovial- und Rhabdomyosarkomen wurde dagegen ein erhöhter HER2 mRNA- bzw. Proteingehalt festgestellt (Allander *et al.*, 2002; Krskova *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2010). Das Tumorgewebe von Mamma-, Blasen- und papillären Schilddrüsenkarzinomen verfügte zudem über einen signifikant höheren HER2 mRNA- bzw. Proteingehalt (IHC) verglichen mit dem umgebenden Normalgewebe (Haugen *et al.*, 1992; Underwood *et al.*, 1995; Ljuslinder *et al.*, 2005).

Die eigenen Analysen zeigten weiter, dass allein der *HER2* mRNA-, nicht jedoch der HER2 Proteingehalt, mit dem histologischen Subtyp der WTS korrelierte. Darüber hinaus konnten die eigenen Analysen keine Korrelation zwischen dem HER2 mRNA- bzw. Proteingehalt und dem Geschlecht, dem Tumorstadium, der Metastasierung und dem Auftreten von Rezidiven nachweisen. Drei Studien an Synovialsarkomen fanden ebenfalls keine Korrelation zwischen dem HER2 mRNA- bzw. Proteingehalt und den genannten histologischen Parametern (Nuciforo *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2005; Krskova *et al.*, 2007). Eine weitere Studie an Synovialsarkomen beschrieb dagegen eine signifikante Korrelation zwischen dem HER2 Proteingehalt (IHC) und dem Geschlecht sowie zwischen dem *HER2* mRNA-Gehalt und dem Auftreten von Rezidiven (Nuciforo *et al.*, 2003).

Zusammenfassend wird deutlich, dass bei WTS studien- und tumorabhängige Unterschiede in Bezug auf die histopathologische und klinische Relevanz der *EGFR*- bzw. der *HER2*-Genexpression bestehen. Die eigenen Analysen ergaben einen ersten Hinweis darauf, dass sich die Genexpression von *EGFR* und *HER2* in WTS möglicherweise beim Prozess der malignen Transformation in gegensätzlicher Weise ändert. Der *EGFR* mRNA-Gehalt schien bei diesem Prozess zu steigen, während der *HER2* mRNA-Gehalt sank.

5.2.3 Prognostische Bedeutung von EGFR und HER2 in primären Glioblastomen

Die eigenen Analysen an primären Glioblastomen wiesen für den *EGFR* mRNA-Gehalt weder bei einer medianen Gruppierung der Patientenkohorte noch bei einer Einteilung in drei gleich große Gruppen (Terzile) eine prognostische Relevanz für das Gesamtüberleben nach. Verschiedene Studien zur prognostischen Bedeutung von EGFR in Glioblastompatienten zeichnen ein sehr heterogenes Bild. Die Amplifikation des *EGFR*-Gens wurde in einer Studie als unabhängiger Prädiktor für ein verkürztes Gesamtüberleben von Glioblastompatienten nachgewiesen (multivariate Cox-Regression: RR=1,67; 95 % KI=1,03-2,72; p=0,038). Patienten mit einer

Amplifikation des *EGFR*-Gens und zusätzlicher Amplifikation des mutierten *EGFRvIII*-Gens [konstitutiv aktive EGFR Mutante, Deletion der Exone 2-7] wiesen dabei eine besonders schlechte Prognose auf (multivariate Cox-Regression: RR=2,71; 95 % KI=1,36-5,39; p=0,0044) (Shinojima *et al.*, 2003). Ein erhöhter EGFR Proteingehalt korrelierte darüber hinaus mit einem verkürzten Überleben von Glioblastompatienten (Hiesiger *et al.*, 1993; Etienne *et al.*, 1998; Korshunov *et al.*, 1999). In einer anderen Glioblastomstudie wies die Amplifikation des *EGFR*-Gens hingegen keine prognostische Bedeutung auf. Der EGFR Proteingehalt (IHC) korrelierte jedoch im Gegensatz dazu mit einem verlängerten medianen Gesamtüberleben der Glioblastompatienten (multivariate Cox-Regression: RR=0,76; 95 % KI=0,63-0,93; p=0,008) (Wrensch *et al.*, 2006). Rainov *et al.* konnten im Gegensatz dazu keine signifikante Korrelation zwischen dem EGFR-Proteingehalt (IHC) und dem Überleben von Glioblastompatienten zeigen (Rainov *et al.*, 1997). In einer Metaanalyse wurde berichtet, dass die vorliegende Datenlage keine genaue Vorhersage zur prognostischen Relevanz der Amplifikation des *EGFR*-Gens bei Glioblastompatienten erlaubt (Huncharek und Kupelnick, 2000).

Für die prognostische Bedeutung und den Beitrag zum malignen Potenzial von Glioblastomen scheint insbesondere die zelluläre Lokalisation von EGFR entscheidend zu sein. An humanen Gliomgewebeschnitten konnte gezeigt werden, dass sich infiltrative Glioblastome von benignen Gliomen durch einen hohen EGFR-Proteingehalt (IHC) verbunden mit einem hohen Verhältnis von Kern- zu zytoplasmatisch lokalisiertem EGFR unterscheiden (Burel-Vandenbos *et al.*, 2013). Die unterschiedliche prognostische Relevanz von EGFR in Glioblastomen lässt sich auch dadurch erklären, dass laut Van Meir *et al.* vier Glioblastom-Subtypen (proneural, neural, klassisch und mesenchymal) differenziert werden müssen. Diese Subtypen grenzen sich deutlich aufgrund ihres molekularen Expressionsprofils verschiedener Gene, ihrer Mutationen und dem Therapieansprechen voneinander ab (Van Meir *et al.*, 2010).

Verschiedene Glioblastomstudien beschrieben zudem eine altersabhängige prognostische Relevanz von EGFR. Simmons *et al.* wiesen beispielsweise keine prognostische Bedeutung des EGFR Proteingehalts (IHC) bei Betrachtung der gesamten Patientenkohorte nach (univariate Cox-Regression: RR=1,1; 95 % KI=0,7-1,6; p=0,61). Ältere EGFR-positive Glioblastompatienten (>55 Jahre) zeigten jedoch ein besseres Überleben (univariate Cox-Regression: RR=0,5; 95 % KI=0,3-0,9; p=0,02). In jüngeren EGFR-positiven Glioblastompatienten (<55 Jahre) wurde demgegenüber ein Trend zu einem kürzeren Überleben dokumentiert (univariate Cox-Regression: RR=1,7; 95 % KI=0,9-2,3; p=0,12) (Simmons *et al.*, 2001). Die Amplifikation des *EGFR*-Gens hatte im Gegensatz dazu unabhängig vom Alter keinen Einfluss auf das Überleben von Glioblastompatienten (Ohgaki *et al.*, 2004). Innerhalb dieser Arbeit wurde aufgrund der geringen Fallzahlen auf eine altersabhängige prognostische Analyse des *EGFR* mRNA-Gehalts verzichtet.

Zusätzlich wurde die prognostische Bedeutung von HER2 untersucht. Glioblastompatienten mit einem verringerten bzw. einem erhöhten *HER2* mRNA-Gehalt (unteres bzw. oberes Terzil) zeigten hierbei ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben und ein höheres Sterberisiko als Glioblastompatienten mit einem mittleren *HER2* mRNA-Gehalt (mittleres Terzil). Dies lässt vermuten, dass eine Deregulierung der *HER2*-Genexpression (Verstärkung bzw. Verringerung der Genexpression) in Glioblastomen zu einer Verschlechterung der Patientenprognose beiträgt. Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie zum HER2-Proteingehalt (IHC) kein signifikanter Unterschied zwischen langzeitüberlebenden (mediane Überlebenszeit > 4 Jahr) und kurzzeitüberlebenden Glioblastompatienten (mediane Überlebenszeit=61 Wochen) festgestellt werden (Hiesiger *et al.*, 1993). Torp *et al.* konnten ebenfalls keine prognostische Relevanz des HER2 Proteingehalts (IHC) (mediane Unterteilung) für das Überleben von Glioblastompatienten nachweisen (Torp *et al.*, 2007). Mineo *et al.* zeigten dagegen, dass ein erhöhter HER2 Proteingehalt (IHC) mit einem reduzierten Gesamtüberleben von Glioblastompatienten korrelierte (Log-Rank-Test: $p=0,04$) (Mineo *et al.*, 2007). Potti *et al.* beschrieben zudem, dass ein erhöhter HER2 Proteingehalt (IHC) mit einer erhöhten Mortalität von Glioblastompatienten assoziiert war (Varianzanalyse ANOVA: $p=0,01$) (Potti *et al.*, 2004a). Eine Studie an anaplastischen Astrozytomen zeigte außerdem beim Vergleich dreier monoklonaler HER2-Antikörper erhebliche quantitative Unterschiede bei der Immunreaktivität (alle drei Antikörper reagieren mit der internen HER2-Domäne). Ein erhöhter HER2 Proteingehalt korrelierte bei einem der drei Antikörper mit einem verkürzten Gesamtüberleben der Patienten (multivariate Cox-Regression: $RR=1,64$; 95 % $KI=1,17-2,30$; $p=0,004$). Bei den anderen zwei Antikörpern zeigte sich dagegen keine Korrelation mit dem Überleben der Patienten (Gulati *et al.*, 2010).

Eine abschließende Bewertung der prognostischen Relevanz von EGFR und HER2 für das Überleben von Glioblastompatienten konnte aufgrund der zum Teil sehr widersprüchlichen Literaturdaten nicht getroffen werden. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass die Prognose von Glioblastompatienten mit der *HER2*-Genexpression, aber nicht mit der Genexpression von *EGFR* korrelierte. Aus klinischer Sicht sollte deshalb HER2 als mögliches prognostisches Ziel von Glioblastomen näher analysiert werden.

5.2.4 Prognostische Bedeutung von EGFR und HER2 in Weichteilsarkomen

Aufgrund fehlender Studien wurde in eigenen Analysen die prognostische Bedeutung von EGFR in WTS näher untersucht. Die WTS-Patienten mit einem erhöhten (> Median) EGFR mRNA- bzw. Proteingehalt (ELISA) im Tumorgewebe wiesen hierbei ein signifikant reduziertes Risiko auf, am Tumor zu versterben. Für Rhabdomyosarkome wurde zudem beschrieben, dass EGFR und Fibrillin-2 doppelt-positive Patienten (IHC) ein signifikant besseres Gesamtüberleben als EGFR und

Fibrillin-2 doppelt-negative Patienten aufwiesen (Kaplan-Meier Überlebensanalyse: $p=0,025$) (Wachtel *et al.*, 2006). In malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) korrelierte dagegen ein erhöhter EGFR Proteingehalt (IHC) mit einem verkürzten krankheitsfreien Fünfjahresüberleben (Mittel 30,1 vs. 17,4 Monate; $p=0,048$), einer verkürzten Zeit bis zur Progression (Mittel 9,2 vs. 5,2 Monate; $p=0,005$) sowie einem reduzierten Fünfjahresüberleben (53 % vs. 25 %; $p=0,041$) (Keizman *et al.*, 2009). An Weichteilsarkomzelllinien konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination aus EGFR-Inhibierung (TKI: Gefitinib) und Chemotherapie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deutliche antitumorale Effekte induzierte (Ren *et al.*, 2008). In einer klinischen Studie an Synovialsarkompatienten mit erhöhtem EGFR Proteingehalt (IHC), konnte dagegen kein signifikanter therapeutischer Effekt einer EGFR-Inhibierung (TKI: Gefitinib) gezeigt werden (Ray-Coquard *et al.*, 2008).

Innerhalb dieser Arbeit wurde zusätzlich auch die prognostische Relevanz von HER2 für WTS-Patienten untersucht. WTS-Patienten mit einem erhöhten *HER2* mRNA-Gehalt ($>$ Median) im Tumorgewebe wiesen dabei ein signifikant reduziertes Risiko auf, am Tumor zu versterben. Der HER2 Proteingehalt hatte dagegen in WTS-Patienten keine prognostische Bedeutung. In Osteosarkomen korrelierte ein erhöhter HER2 Proteingehalt (IHC) mit einem längeren ereignisfreien Überleben und einem besseren Gesamtüberleben der Patienten (multivariate Cox-Regression: $RR=2,24$; 95 % $CI=1,07-4,72$; $p=0,03$ bzw. $RR=2,53$; 95 % $CI=1,09-5,67$; $p=0,03$) (Akatsuka *et al.*, 2002). Foster *et al.* berichteten dagegen, dass ein erhöhter HER2 Proteingehalt (IHC) in WTS-Patienten (Karzinosarkom, malignes fibröses Histiozytom bzw. Dermatofibrosarkom) mit einem erhöhten Risiko assoziiert war in den ersten acht Monaten nach Diagnose zu versterben ($p=0,035$; Odds-Verhältnis=2,2; 95 % CI 1,04-5,0) (Foster *et al.*, 2003). Zwei weitere Studien dokumentierten dagegen keine Korrelation zwischen dem HER2 Proteingehalt (IHC) und dem Überleben von WTS-Patienten (Log-Rank Test: Sato: $p=0,31$; Potti: $p=0,87$) (Sato *et al.*, 2003; Potti *et al.*, 2004b).

Die eigenen Untersuchungen von WTS zeigten, dass eine erhöhte *EGFR*- und *HER2*-Genexpression mit einem geringeren Risiko assoziiert war, am Tumor zu versterben. Eine zusammenfassende Analyse der Literaturdaten ermöglicht jedoch keine eindeutige Aussage zur prognostischen Bedeutung der *EGFR*- bzw. *HER2*-Genexpression in WTS. Diese lässt sich zum Teil durch die histologische Heterogenität der WTS ($>$ 50 Subtypen), ihre unterschiedliche Prognose und das unterschiedliche Therapieansprechen der einzelnen WTS-Subtypen erklären (Gronchi und Casali, 2013).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von EGFR und HER2 auf zellphysiologische und radiobiologische Prozesse der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG analysiert und ihre prognostische Bedeutung für Glioblastom- und Weichteilsarkompatienten bewertet.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Reduktion der *EGFR*-Genexpression (siRNA) zelllinienabhängig zu einer kompensatorischen Erhöhung der Genexpression der Rezeptoren *HER2* und *HER3* sowie der Liganden *EGF*, *HB-EGF* und *TGF α* führte. Die Verringerung der *EGFR*-Genexpression resultierte zudem in beiden Zelllinien in einer Reduktion der Proliferation und einer Akkumulation von Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Es zeigte sich darüber hinaus kein Einfluss auf die Migration beider Glioblastomzelllinien jedoch eine zelllinienabhängig Steigerung des mRNA- bzw. Proteingehalts der Migrationsmarker *MMP2*, *MMP10*, *uPA*, *uPAR* und *PAI-1*. Die Verringerung der *EGFR*-Genexpression hatte außerdem keine Auswirkungen auf das klonogene Zellüberleben der unbestrahlten Glioblastomzellen. Es zeigte sich auch kein Einfluss auf die Radiosensitivität. Die Reduktion der *EGFR*-Genexpression führte nur in der Glioblastomzelllinie LN-229 zur Aktivierung der Caspasen 3/7 sowie zur Spaltung von PARP, induzierte jedoch in keiner der beiden Zelllinien die Bildung apoptotischer Zellkerne.

Die Reduktion der *HER2*-Genexpression (siRNA) resultierte in der Zelllinie U251MG in einer kompensatorischen Erhöhung der *EGFR*-Genexpression. Verglichen mit EGFR bewirkte die Verringerung der *HER2*-Genexpression (siRNA) eine stärkere Reduktion der Proliferation und eine zelllinienabhängige Akkumulation von Zellen in der G0/G1- (LN-229) bzw. in der G2/M-Phase (U251MG) des Zellzyklus. Des Weiteren hemmte die Verringerung der *HER2*-Genexpression die Migration der Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG. Sie reduzierte zudem den mRNA-Gehalt des Migrationsmarkers *MMP2* und erhöhte zelllinienabhängigen den *uPAR* und *PAI-1* Proteingehalt. Die Reduktion der *HER2*-Genexpression verringerte das klonogene Zellüberleben und induzierte in der Glioblastomzelllinie U251MG eine moderate Radiosensitivierung (DMF10=1,22). Zudem führte die Reduktion der *HER2*-Genexpression in den Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG zur Aktivierung der Caspasen 3/7 sowie zur Spaltung von PARP, induzierte jedoch nur in U251MG Zellen die Bildung apoptotischer Zellkerne.

Die simultane Reduktion der *EGFR*- bzw. der *HER2*-Genexpression (siRNA) war im Vergleich zur alleinigen Verringerung der *EGFR*- bzw. der *HER2*-Genexpression nicht geeignet, um signifikant stärkere Effekte auf die Proliferation, den Zellzyklus, die Radiosensitivität und die Migration zu induzieren.

Die alleinige bzw. die simultane Inhibierung von EGFR und HER2 mit Hilfe der therapeutischen Antikörper Cetuximab und Trastuzumab führte in beiden Glioblastomzelllinien zu keiner Beeinflussung der Proliferation, des Zellzyklus, der Migration, der Apoptose, des klonogenen

Zellüberlebens oder der Radiosensitivität führte. Eine der zentralen Schlussfolgerungen dieser Arbeit ist deshalb, dass die Inhibierung der Rezeptoren EGFR und HER2 mittels Cetuximab bzw. Trastuzumab im Gegensatz zur Reduktion der *EGFR*- und *HER2*-Genexpression mittels siRNA nicht geeignet war, um in Glioblastomzelllinien *in vitro* antitumorale Effekte zu induzieren.

Die Untersuchung des Tumormaterials primärer Glioblastome deutete auf eine eher untergeordnete klinische Relevanz von EGFR und HER2 in Glioblastompatienten hin. Die Prognose der Glioblastompatienten korrelierte außerdem nicht mit dem *EGFR* mRNA-Gehalt. Dagegen wiesen Glioblastompatienten mit einem verringerten (RR=7,1, p=0,006) bzw. einem erhöhten (RR=13,7, p<0,001) *HER2* mRNA-Gehalt im Gegensatz zu Glioblastompatienten mit einem mittleren *HER2* mRNA-Gehalt ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben und höheres Sterberisiko auf.

In den analysierten WTS änderte sich der mRNA-Gehalt von *EGFR* und *HER2* beim Prozess der malignen Transformation in gegensätzlicher Weise. Der mRNA-Gehalt von *EGFR* lag im Tumorgewebe über dem des Normalgewebes. Der mRNA-Gehalt von *HER2* war im Tumorgewebe dagegen niedriger als im umgebenden Normalgewebe. Beide Rezeptoren wiesen zudem eine prognostische Bedeutung auf. Das Risiko der WTS-Patienten, am Tumor zu versterben, stieg sowohl bei sinkendem EGFR mRNA- (RR=2,5, p=0,003) und Proteingehalt (RR=3,0, p=0,014) als auch bei sinkendem *HER2* mRNA-Gehalt (RR=3,0, p<0,001).

Durch die multiple Inhibierung tumorbedeutender Rezeptoren (HER3, uPAR, VEGF) und zentraler Komponenten von Signaltransduktionskaskaden (PI3-Kinase, AKT, RAF-Kinasen, MAPK) könnte der sehr ausgeprägten Tendenz von Glioblastomen zur redundanten Aktivierung pro-tumoraler Signaltransduktionswege entgegengewirkt werden. Dies könnte zu einer Verbesserung der Therapie dieser Tumoren beitragen indem es der Resistenzentwicklung gegenüber zielgerichteten „Targettherapien“ entgegenwirkt. Zusätzlich sollte die Bedeutung der untersuchten Marker (uPA, uPAR, PAI-1, MMP2 und MMP10) für die Migration von Glioblastomen näher untersucht werden. Zur Verifizierung der gewonnenen Daten sollten die Untersuchungen auf weiter Glioblastomzelllinien ausgedehnt werden.

Darüber hinaus sollte die Genexpression von *EGFR* und *HER2* in einer zweiten Glioblastom- bzw. WTS-Kohorte untersucht werden, um so die klinische und prognostische Bedeutung dieser Rezeptoren für Glioblastom- und Weichteilsarkompatienten zu verifizieren. Zusätzlich ist eine genaue biologische Charakterisierung der verschiedenen WTS- und GBM-Subtypen von großem Interesse, um zukünftig eine optimierte und individualisierte Therapie dieser Tumoren zu ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Publikationen

Adam, L. *et al.*, 1998, Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase: *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, no. 43, p. 28238-28246.

Adamson, C. *et al.*, 2009, Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going: *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 18, no. 8, p. 1061-1083.

Akatsuka, T. *et al.*, 2002, ErbB2 expression is correlated with increased survival of patients with osteosarcoma: *Cancer*, v. 94, no. 5, p. 1397-1404.

Al Alem, L. F. *et al.*, 2013, Activation of the PKC pathway stimulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and expression of MMP7 and MMP10: *Biol.Reprod.*, v. 89, no. 3, p. 73.

Alexander, V., and J. H. DiMarco, 2001, Reappraisal of brain tumor risk among U.S. nuclear workers: a 10-year review: *Occup.Med.*, v. 16, no. 2, p. 289-315.

Allander, S. V. *et al.*, 2002, Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation: *Am.J.Pathol.*, v. 161, no. 5, p. 1587-1595.

Amado, R. G. *et al.*, 2008, Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer: *J.Clin.Oncol*, v. 26, no. 10, p. 1626-1634.

Amant, F. *et al.*, 2004, ERBB-2 gene overexpression and amplification in uterine sarcomas: *Gynecologic Oncology*, v. 95, no. 3, p. 583-587.

Andrade, C. R. *et al.*, 2010, Rhabdomyosarcoma of the head and neck: a clinicopathological and immunohistochemical analysis of 29 cases: *Brazilian Dental Journal*, v. 21, no. 1, p. 68-73.

Andrulis, I. L. *et al.*, 1998, neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer: *Journal of Clinical Oncology*, v. 16, no. 4, p. 1340-1349.

Arita, D. *et al.*, 1997, Induction of p53-independent apoptosis associated with G2M arrest following DNA damage in human colon cancer cell lines: *Japanese Journal of Cancer Research*, v. 88, no. 1, p. 39-43.

Arora, P. *et al.*, 2008, Persistent transactivation of EGFR and ErbB2/HER2 by protease-activated receptor-1 promotes breast carcinoma cell invasion: *Oncogene*, v. 27, no. 32, p. 4434-4445.

Arvold, N. D., and D. A. Reardon, 2014, Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient: *Clin.Interv.Aging*, v. 9, p. 357-367.

Balcer-Kubiczek, E. K., 2012, Apoptosis in radiation therapy: a double-edged sword: *Exp.Oncol*, v. 34, no. 3, p. 277-285.

Barok, M. *et al.*, 2007, Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance: *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 6, no. 7, p. 2065-2072.

- Baselga, J., and S. M. Swain, 2009, Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3: *Nat.Rev.Cancer*, v. 9, no. 7, p. 463-475.
- Baumann, M. *et al.*, 2007, EGFR-targeted anti-cancer drugs in radiotherapy: Preclinical evaluation of mechanisms: *Radiotherapy and Oncology*, v. 83, no. 3, p. 238-248.
- Bazley, L. A., and W. J. Gullick, 2005, The epidermal growth factor receptor family: Endocrine-Related Cancer, v. 12, p. S17-S27.
- Bektas, N. *et al.*, 2008, Tight correlation between expression of the Forkhead transcription factor FOXM1 and HER2 in human breast cancer: *Bmc Cancer*, v. 8.
- Belda-Iniesta, C. *et al.*, 2008, Epidermal growth factor receptor and glioblastoma multiforme: molecular basis for a new approach: *Clin.Transl.Oncol.*, v. 10, no. 2, p. 73-77.
- Berasain, C. *et al.*, 2011, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Crosstalks in Liver Cancer: *Cancers*, v. 3, no. 2, p. 2444-2461.
- BERGONIE, J., and L. Tribondeau, 1959, Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment: *Radiation Research*, v. 11, p. 587-588.
- Bertelsen, V., and E. Stang, 2014, The Mysterious Ways of ErbB2/HER2 Trafficking: *Membranes.(Basel)*, v. 4, no. 3, p. 424-446.
- Blasi, F., and P. Carmeliet, 2002, uPAR: a versatile signalling orchestrator: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 3, no. 12, p. 932-943.
- Bonner, J. A. *et al.*, 2006, Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck: *New England Journal of Medicine*, v. 354, no. 6, p. 567-578.
- Bonner, J. A. *et al.*, 2010, Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival: *Lancet Oncology*, v. 11, no. 1, p. 21-28.
- Bose, R. *et al.*, 2013, Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer: *Cancer discovery*, v. 3, no. 2, p. 224-237.
- Boulares, A. H. *et al.*, 1999, Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis - Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells: *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, no. 33, p. 22932-22940.
- Brand, T. M. *et al.*, 2011, The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and Its Role in Cancer: *Discovery Medicine*, v. 66, p. 419-432.
- Britten, C. D., 2004, Targeting ErbB receptor signaling: a pan-ErbB approach to cancer: *Mol.Cancer Ther.*, v. 3, no. 10, p. 1335-1342.
- Burel-Vandenbos, F. *et al.*, 2013, Cells with intense EGFR staining and a high nuclear to cytoplasmic ratio are specific for infiltrative glioma: a useful marker in neuropathological practice: *Neuro Oncol.*, v. 15, no. 10, p. 1278-1288.
- Busse, D. *et al.*, 2000, Reversible G(1) arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase requires up-regulation of p27(KIP1) independent of MAPK activity: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, no. 10, p. 6987-6995.

- Cabioglu, N. *et al.*, 2004, Crosstalk between CXCR4 and HER2-neu in breast cancer: Transactivation of HER2-neu by stromal derived factor-1 alpha through Src kinase activation: *Cancer Research*, v. 64, no. 7 Supplement, p. 907.
- Cao, N. *et al.*, 2009, NF-kappa B-Mediated HER2 Overexpression in Radiation-Adaptive Resistance: *Radiation Research*, v. 171, no. 1, p. 9-21.
- Cavallaro, U., and G. Christofori, 2004, Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer: *Nat.Rev.Cancer*, v. 4, no. 2, p. 118-132.
- Chakravarti, A. *et al.*, 2004, The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: A review of preclinical and correlative clinical data: *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 58, no. 3, p. 927-931.
- Chakravarti, A. *et al.*, 2002, 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*, v. 62, no. 1, p. 200-207.
- Chandrasekar, N. *et al.*, 2003, Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells: *Oncogene*, v. 22, no. 3, p. 392-400.
- Chen, D. J., and C. S. Nirodi, 2007, The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage: *Clin.Cancer Res*, v. 13, no. 22 Pt 1, p. 6555-6560.
- Chen, G. *et al.*, 2012a, Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells: the effect of combining RNA interference with tyrosine kinase inhibitors or cetuximab: *Bmc Medicine*, v. 10.
- Chen, S. J. *et al.*, 2012b, EGFR-mediated G1/S transition contributes to the multidrug resistance in breast cancer cells: *Molecular Biology Reports*, v. 39, no. 5, p. 5465-5471.
- Chinni, S. R. *et al.*, 2008, CXCL12/CXCR4 Transactivates HER2 in Lipid Rafts of Prostate Cancer Cells and Promotes Growth of Metastatic Deposits in Bone: *Molecular cancer research : MCR*, v. 6, no. 3, p. 10.
- Cho, H. S. *et al.*, 2003, Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab: *Nature*, v. 421, no. 6924, p. 756-760.
- Choi, E. J. *et al.*, 2014, Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases: *Bmc Cancer*, v. 14, p. 17.
- Choi, E. J. *et al.*, 2010, Targeting epidermal growth factor receptor-associated signaling pathways in non-small cell lung cancer cells: implication in radiation response: *Mol.Cancer Res.*, v. 8, no. 7, p. 1027-1036.
- Chong, C. R., and P. A. Janne, 2013, The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer: *Nature Medicine*, v. 19, no. 11, p. 1389-1400.
- Choudhury, A. *et al.*, 2004, Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines: *International Journal of Cancer*, v. 108, no. 1, p. 71-77.

- Citri, A. *et al.*, 2003, The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3: *Exp.Cell Res.*, v. 284, no. 1, p. 54-65.
- Citri, A., and Y. Yarden, 2006, EGF-ERBB signalling: towards the systems level: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, no. 7, p. 505-516.
- Clark, M. A. *et al.*, 2005, Soft-tissue sarcomas in adults: *N.Engl.J.Med.*, v. 353, no. 7, p. 701-711.
- Clynes, R. A. *et al.*, 2000, Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets: *Nature Medicine*, v. 6, no. 4, p. 443-446.
- Cobbs, C. S., 2011, Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis: *Herpesviridae.*, v. 2, no. 1, p. 10.
- Cohen, G. M., 1997, Caspases: the executioners of apoptosis: *Biochemical Journal*, v. 326, p. 1-16.
- Cohen, M. H. *et al.*, 2003, FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets: *Oncologist*, v. 8, no. 4, p. 303-306.
- Combs, S. E. *et al.*, 2007, In vitro responsiveness of glioma cell lines to multimodality treatment with radiotherapy, temozolomide, and epidermal growth factor receptor inhibition with cetuximab: *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 68, no. 3, p. 873-882.
- Conradt, L. *et al.*, 2011, Disclosure of Erlotinib as a Multikinase Inhibitor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: *Neoplasia*, v. 13, no. 11, p. 1026-1U57.
- Cuddihy, A. R., and M. J. O'Connell, 2003, Cell-cycle responses to DNA damage in G2, in WJ Kwang ed., *International Review of Cytology*: Academic Press, p. 99-140.
- Czekay, R. P. *et al.*, 2011, PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration: *Int.J.Cell Biol.*, v. 2011, p. 562481.
- Davis, R. J., 1995, Transcriptional regulation by MAP kinases: *Mol.Reprod.Dev.*, v. 42, no. 4, p. 459-467.
- De Roock, W. *et al.*, 2010, Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis: *Lancet Oncology*, v. 11, no. 8, p. 753-762.
- Ding, Y. *et al.*, 2012, Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism: *Nature Communications*, v. 3.
- Dittmann, K. *et al.*, 2005, Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase: *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, no. 35, p. 31182-31189.
- Dittmann, K. *et al.*, 2010, Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function: *Strahlenther.Onkol.*, v. 186, no. 1, p. 1-6.
- Dobashi, Y. *et al.*, 2007, Involvement of epidermal growth factor receptor and downstream molecules in bone and soft tissue tumors: *Human Pathology*, v. 38, no. 6, p. 914-925.
- Dolecek, T. A. *et al.*, 2012, CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009: *Neuro Oncol.*, v. 14 Suppl 5, p. v1-49.

Donjerkovic, D., and D. W. Scott, 2000, Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle: *Cell Res.*, v. 10, no. 1, p. 1-16.

Duda, R. B. *et al.*, 1993, Growth factor receptor and related oncogene determination in mesenchymal tumors: *Cancer*, v. 71, no. 11, p. 3526-3530.

Duru, N. *et al.*, 2012, HER2-Associated Radioresistance of Breast Cancer Stem Cells Isolated from HER2-Negative Breast Cancer Cells: *Clinical Cancer Research*, v. 18, no. 24, p. 6634-6647.

Eccles, S. A., 2011, The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology: *Int.J.Dev.Biol.*, v. 55, no. 7-9, p. 685-696.

Eisele, G., and M. Weller, 2013, Targeting apoptosis pathways in glioblastoma: *Cancer Letters*, v. 332, no. 2, p. 335-345.

Ekerljung, L. *et al.*, 2012, The HER2-Binding Affibody Molecule (Z(HER2:342))(2) Increases Radiosensitivity in SKBR-3 Cells: *Plos One*, v. 7, no. 11.

Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death: *Toxicol.Pathol.*, v. 35, no. 4, p. 495-516.

Enzinger, F. M. *et al.*, 2001, *Soft tissue tumours* St. Louis, Mosby, Inc.

Enzinger, F. M., and S. W. Weiss, 1995, *Soft tissue tumours* St. Louis, Mosby, Inc.

ESMO Clinical Practice Guidelines, 2014, Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up: *Annals of Oncology*, v. 25 Suppl 3, p. iii102-iii112.

Etienne, M. C. *et al.*, 1998, Epidermal growth factor receptor and labeling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome: *Clin.Cancer Res.*, v. 4, no. 10, p. 2383-2390.

Ewing, D., 1998, The oxygen fixation hypothesis: a reevaluation: *Am.J Clin.Oncol*, v. 21, no. 4, p. 355-361.

Faltus, T. *et al.*, 2004, Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells: *Neoplasia*, v. 6, no. 6, p. 786-795.

Fedrigo, C. A. *et al.*, 2011, Radioresistance of human glioma spheroids and expression of HSP70, p53 and EGFr: *Radiation Oncology*, v. 6.

Feiden, S., and W. Feiden, 2008, [WHO classification of tumours of the CNS: revised edition of 2007 with critical comments on the typing und grading of common-type diffuse gliomas]: *Pathologe*, v. 29, no. 6, p. 411-421.

Ferrari, A. *et al.*, 2011, Soft tissue sarcoma across the age spectrum: a population-based study from the Surveillance Epidemiology and End Results database: *Pediatr.Blood Cancer*, v. 57, no. 6, p. 943-949.

Fiszman, G. L., and M. A. Jasnis, 2011, Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer: *Int.J.Breast Cancer*, v. 2011, p. 352182.

Foster, D. A. *et al.*, 2010, Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s): *Genes Cancer*, v. 1, no. 11, p. 1124-1131.

- Foster, H. *et al.*, 2003, HER-2/neu overexpression detected by immunohistochemistry in soft tissue sarcomas: *American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials*, v. 26, no. 2, p. 188-191.
- Frampton, J. E., 2010, Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck: *Drugs*, v. 70, no. 15, p. 1987-2010.
- Friedl, P., and K. Wolf, 2003, Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms: *Nature Reviews Cancer*, v. 3, no. 5, p. 362-374.
- Fukutome, M. *et al.*, 2006, Enhancement of radiosensitivity by dual inhibition of the her family with ZD1839 ("Iressa") and trastuzumab ("Herceptin"): *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 66, no. 2, p. 528-536.
- Galluzzi, L. *et al.*, 2012, Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012: *Cell Death Differ.*, v. 19, no. 1, p. 107-120.
- Gao, L. *et al.*, 2010, Inhibition of Stat3 and Erbb2 Suppresses Tumor Growth, Enhances Radiosensitivity, and Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis in Glioma Cells: *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 77, no. 4, p. 1223-1231.
- Garrett, J. T. *et al.*, 2011, Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, no. 12, p. 5021-5026.
- Georger, B. *et al.*, 2008, EGFR tyrosine kinase inhibition radiosensitizes and induces apoptosis in malignant glioma and childhood ependymoma xenografts: *Int.J.Cancer*, v. 123, no. 1, p. 209-216.
- Ghosh, R. *et al.*, 2011, Trastuzumab Has Preferential Activity against Breast Cancers Driven by HER2 Homodimers: *Cancer Research*, v. 71, no. 5, p. 1871-1882.
- Gondi, C. S. *et al.*, 2007, Down-regulation of uPAR and uPA activates caspase-mediated apoptosis and inhibits the PI3K/AKT pathway: *Int.J.Oncol.*, v. 31, no. 1, p. 19-27.
- Graus-Porta, D. *et al.*, 1997, ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling: *Embo Journal*, v. 16, no. 7, p. 1647-1655.
- Gronchi, A., and P. G. Casali, 2013, Adjuvant therapy for high-risk soft tissue sarcoma in the adult: *Curr.Treat.Options Oncol.*, v. 14, no. 3, p. 415-424.
- Gu, Y. *et al.*, 1995, Cleavage of Poly(Adp-Ribose) Polymerase by Interleukin-1-Beta Converting-Enzyme and Its Homologs Tx and Nedd-2: *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, no. 32, p. 18715-18718.
- Guillou, L. *et al.*, 1997, Comparative study of the National Cancer Institute and French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group grading systems in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma: *Journal of Clinical Oncology*, v. 15, no. 1, p. 350-362.
- Gulati, S. *et al.*, 2010, Overexpression of c-erbB2 is a negative prognostic factor in anaplastic astrocytomas: *Diagn.Pathol.*, v. 5, p. 18.
- Gutierrez, C., and R. Schiff, 2011, HER2 Biology, Detection, and Clinical Implications: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 135, no. 1, p. 55-62.

- Hall, E. J., 2002, Radiobiology for the Radiologist. 5th ed: Radiology, v. 224, no. 2, p. 512.
- Hall, E. J., and A. J. Giaccia, 2012, Radiobiology for the Radiologist Wolters Kluwer Health.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg, 2011, Hallmarks of cancer: the next generation: Cell, v. 144, no. 5, p. 646-674.
- Hara, M. *et al.*, 2008, Interleukin-2 potentiation of cetuximab antitumor activity for epidermal growth factor receptor-overexpressing gastric cancer xenografts through antibody-dependent cellular cytotoxicity: Cancer Sci., v. 99, no. 7, p. 1471-1478.
- Harris, C. C., 1991, Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s: Cancer Res, v. 51, no. 18 Suppl, p. 5023s-5044s.
- Harris, R. C. *et al.*, 2003, EGF receptor ligands: Experimental Cell Research, v. 284, no. 1, p. 2-13.
- Hasselbalch, B. *et al.*, 2010, Cetuximab Insufficiently Inhibits Glioma Cell Growth Due to Persistent EGFR Downstream Signaling: Cancer Investigation, v. 28, no. 8, p. 775-787.
- Haugen, D. R. F. *et al.*, 1992, Expression of C-ErbB-2 Protein in Papillary Thyroid Carcinomas: British Journal of Cancer, v. 65, no. 6, p. 832-837.
- Haynik, D. M. *et al.*, 2007, HER-2/neu expression in glioblastoma multiforme: Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol., v. 15, no. 1, p. 56-58.
- Hiesiger, E. M. *et al.*, 1993, Prognostic relevance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-neu/erbB2 expression in glioblastomas (GBMs): J.Neurooncol., v. 16, no. 2, p. 93-104.
- Holbro, T. *et al.*, 2003, The ErbB receptors and their role in cancer progression: Exp.Cell Res., v. 284, no. 1, p. 99-110.
- Hu, J. *et al.*, 2014, Neutralizing the EGF receptor in glioblastoma cells stimulates cell migration by activating uPAR-initiated cell signaling: Oncogene.
- Hu, Y. P. *et al.*, 2005, Reorganization of ErbB family and cell survival signaling after knock-down of ErbB2 in colon cancer cells: Journal of Biological Chemistry, v. 280, no. 29, p. 27383-27392.
- Huang, H. J. S. *et al.*, 1997, The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling: Journal of Biological Chemistry, v. 272, no. 5, p. 2927-2935.
- Hudis, C. A., 2007, Drug therapy: Trastuzumab - Mechanism of action and use in clinical practice: New England Journal of Medicine, v. 357, no. 1, p. 39-51.
- Huncharek, M., and B. Kupelnick, 2000, Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis: Oncol.Res., v. 12, no. 2, p. 107-112.
- Hurt, M. R. *et al.*, 1992, Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis: J.Neuropathol.Exp.Neurol., v. 51, no. 1, p. 84-90.
- Hynes, N. E., and H. A. Lane, 2005, ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors: Nat.Rev.Cancer, v. 5, no. 5, p. 341-354.

Jaime-Ramirez, A. C. *et al.*, 2011, IL-12 Enhances the Antitumor Actions of Trastuzumab via NK Cell IFN-gamma Production: *Journal of Immunology*, v. 186, no. 6, p. 3401-3409.

Jain, A. *et al.*, 2010, HER Kinase Axis Receptor Dimer Partner Switching Occurs in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition despite Failure to Block Cellular Proliferation: *Cancer Research*, v. 70, no. 5, p. 1989-1999.

Jiang, N. *et al.*, 2012, Advances in Targeting HER3 as an Anticancer Therapy: *Chemother.Res.Pract.*, v. 2012, p. 817304.

Joaquin, M., and R. J. Watson, 2003, Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor: *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, no. 11, p. 2389-2401.

Johnson, E. *et al.*, 2010, HER2/ErbB2-induced Breast Cancer Cell Migration and Invasion Require p120 Catenin Activation of Rac1 and Cdc42: *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, no. 38, p. 29491-29501.

Jordan, B. F., and P. Sonveaux, 2012, Targeting tumor perfusion and oxygenation to improve the outcome of anticancer therapy: *Front Pharmacol.*, v. 3, p. 94.

Jutten, B. *et al.*, 2009, Binding of cetuximab to the EGFRvIII deletion mutant and its biological consequences in malignant glioma cells: *Radiother.Oncol.*, v. 92, no. 3, p. 393-398.

Kalari, K. R. *et al.*, 2013, An Integrated Model of the Transcriptome of HER2-Positive Breast Cancer: *Plos One*, v. 8, no. 11.

Kang, C. S. *et al.*, 2005, An in vitro study on the suppressive effect of glioma cell growth induced by plasmid-based small interference RNA (siRNA) targeting human epidermal growth factor receptor: *Journal of Neuro-Oncology*, v. 74, no. 3, p. 267-273.

Kang, C. S. *et al.*, 2006, Suppression of EGFR expression by antisense or small interference RNA inhibits U251 glioma cell growth in vitro and in vivo: *Cancer Gene Therapy*, v. 13, no. 5, p. 530-538.

Karunagaran, D. *et al.*, 1996, ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: Implications for breast cancer: *Embo Journal*, v. 15, no. 2, p. 254-264.

Kastan, M. B., and S. J. Kuerbitz, 1993, Control of G1 arrest after DNA damage: *Environ.Health Perspect.*, v. 101 Suppl 5, p. 55-58.

Keizman, D. *et al.*, 2009, Expression and significance of EGFR in malignant peripheral nerve sheath tumor: *J.Neurooncol.*, v. 94, no. 3, p. 383-388.

Kelley, R. K., and A. H. Ko, 2008, Erlotinib in the treatment of advanced pancreatic cancer: *Biologics : Targets & Therapy*, v. 2, no. 1, p. 83-95.

Kersting, C. *et al.*, 2006, Pitfalls in immunohistochemical assessment of EGFR expression in soft tissue sarcomas: *J.Clin.Pathol.*, v. 59, no. 6, p. 585-590.

Kim, M. Y. *et al.*, 2005, Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD(+) into a nuclear signal: *Genes & Development*, v. 19, no. 17, p. 1951-1967.

- Kimble, R. J. *et al.*, 2010, Radiosensitization of epidermal growth factor receptor/HER2-positive pancreatic cancer is mediated by inhibition of Akt independent of ras mutational status: *Clin.Cancer Res.*, v. 16, no. 3, p. 912-923.
- Kiyatkin, A. *et al.*, 2006, Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops: *J.Biol.Chem.*, v. 281, no. 29, p. 19925-19938.
- Knox, S. J. *et al.*, 1993, Correlation of tumor sensitivity to low-dose-rate irradiation with G2/M-phase block and other radiobiological parameters: *Radiation Research*, v. 135, no. 1, p. 24-31.
- Kobayashi, K., and K. Hagiwara, 2013, Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC): *Targeted Oncology*, v. 8, no. 1, p. 27-33.
- Koka, V. *et al.*, 2003, Role of Her-2/neu overexpression and clinical determinants of early mortality in glioblastoma multiforme: *Am.J.Clin.Oncol.*, v. 26, no. 4, p. 332-335.
- Kopp, R. *et al.*, 2003, Clinical implications of the EGF receptor/ligand system for tumor progression and survival in gastrointestinal carcinomas: evidence for new therapeutic options: *Recent Results Cancer Res.*, v. 162, p. 115-132.
- Kordes, S. *et al.*, 2014, Targeted therapy for advanced esophagogastric adenocarcinoma: *Crit Rev.Oncol Hematol.*, v. 90, no. 1, p. 68-76.
- Korshunov, A. *et al.*, 1999, Prognostic value of tumour associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases: *J.Clin.Pathol.*, v. 52, no. 8, p. 574-580.
- Krakstad, C., and M. Chekenya, 2010, Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics: *Molecular Cancer*, v. 9.
- Kriegs, M. *et al.*, 2010, The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining: *Dna Repair*, v. 9, no. 8, p. 889-897.
- Kristt, D. A., and Y. Yarden, 1996, Differences between phosphotyrosine accumulation and Neu/ErbB-2 receptor expression in astrocytic proliferative processes. Implications for glial oncogenesis: *Cancer*, v. 78, no. 6, p. 1272-1283.
- Krskova, L. *et al.*, 2007, Molecular and immunohistochemical analysis of ERBB2 expression in correlation with proliferation rate. in synovial sarcoma: *Diagnostic Molecular Pathology*, v. 16, no. 4, p. 211-217.
- Kumar, R. *et al.*, 1996, Overexpression of HER2 modulates Bcl-2, Bcl-X(L), and tamoxifen-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells: *Clinical Cancer Research*, v. 2, no. 7, p. 1215-1219.
- Lammering, G. *et al.*, 2001, Radiosensitization of malignant glioma cells through overexpression of dominant-negative epidermal growth factor receptor: *Clinical Cancer Research*, v. 7, no. 3, p. 682-690.
- Lammerts van Bueren, J. J. *et al.*, 2008, The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 105, no. 16, p. 6109-6114.

- Lane, H. A. *et al.*, 2000, ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: Receptor overexpression does not determine growth dependency: *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, no. 9, p. 3210-3223.
- Lane, H. A. *et al.*, 2001, Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling: *Annals of Oncology*, v. 12, p. 21-22.
- Laperriere, N. *et al.*, 2002, Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review: *Radiother.Oncol.*, v. 64, no. 3, p. 259-273.
- Lattanzio, R. *et al.*, 2013, Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis: *Adv.Biol.Regul.*, v. 53, no. 3, p. 309-318.
- Le, X. F. *et al.*, 2012, Modulation of MicroRNA-194 and Cell Migration by HER2-Targeting Trastuzumab in Breast Cancer: *Plos One*, v. 7, no. 7.
- Leahy, D. J., 2004, Structure and function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors: *Adv.Protein Chem.*, v. 68, p. 1-27.
- Learn, P. A. *et al.*, 2006, Compensatory increases in Her-2/neu activation in response to EGFR tyrosine kinase inhibition in colon cancer cell lines: *Journal of Surgical Research*, v. 136, no. 2, p. 227-231.
- Leserer, M. *et al.*, 2000, Epidermal growth factor receptor signal transactivation: *Life*, v. 49, no. 5, p. 405-+.
- Li, C. R. *et al.*, 2010, Dasatinib blocks cetuximab- and radiation-induced nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma: *Radiotherapy and Oncology*, v. 97, no. 2, p. 330-337.
- Li, D. *et al.*, 2008, BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models: *Oncogene*, v. 27, no. 34, p. 4702-4711.
- Li, S. *et al.*, 2005, Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab: *Cancer Cell*, v. 7, no. 4, p. 301-311.
- Liang, K. *et al.*, 2003, Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab: *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 2, no. 11, p. 1113-1120.
- Liao, H. J., and G. Carpenter, 2009, Cetuximab/C225-Induced Intracellular Trafficking of Epidermal Growth Factor Receptor: *Cancer Research*, v. 69, no. 15, p. 6179-6183.
- Liebermann, T. A. *et al.*, 1985, Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin: *Nature*, v. 313, no. 5998, p. 144-147.
- Lin, S. Y. *et al.*, 2001, Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor: *Nature Cell Biology*, v. 3, no. 9, p. 802-808.
- Ljuslinder, I. *et al.*, 2005, Increased copy number at 3p14 in breast cancer: *Breast Cancer Research*, v. 7, no. 5, p. R719-R727.

- Lo, H. W., and M. C. Hung, 2006, Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival: *British Journal of Cancer*, v. 94, no. 2, p. 184-188.
- Lo, H. W., 2010, Nuclear Mode of the EGFR Signaling Network: Biology, Prognostic Value, and Therapeutic Implications: *Discovery Medicine*, v. 10, no. 50, p. 44-51.
- Longva, K. E. *et al.*, 2005, Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2: *International Journal of Cancer*, v. 116, no. 3, p. 359-367.
- Louis, D. N. *et al.*, 2007, The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system: *Acta Neuropathol.*, v. 114, no. 2, p. 97-109.
- Lui, V. W., and J. R. Grandis, 2002, EGFR-mediated cell cycle regulation: *Anticancer Research*, v. 22, no. 1A, p. 1-11.
- Lund-Johansen, M. *et al.*, 1990, Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro: *Cancer Research*, v. 50, no. 18, p. 6039-6044.
- Lurje, G., and H. J. Lenz, 2009, EGFR Signaling and Drug Discovery: *Oncology*, v. 77, no. 6, p. 400-410.
- Ma, J. *et al.*, 2014, Targeting of erbB3 receptor to overcome resistance in cancer treatment: *Molecular Cancer*, v. 13.
- Maity, A. *et al.*, 1994, The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review: *Radiother.Oncol.*, v. 31, no. 1, p. 1-13.
- Manning, B. D., and L. C. Cantley, 2007, AKT/PKB signaling: navigating downstream: *Cell*, v. 129, no. 7, p. 1261-1274.
- Mardin, B. R. *et al.*, 2013, EGF-Induced Centrosome Separation Promotes Mitotic Progression and Cell Survival: *Developmental Cell*, v. 25, no. 3, p. 229-240.
- Marmor, M. D. *et al.*, 2004, Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors: *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, v. 58, no. 3, p. 903-913.
- Matsui, Y. *et al.*, 2005, Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model: *Int.J.Oncol.*, v. 27, no. 3, p. 681-685.
- Matsuo, T. *et al.*, 2011, Analysis of the anti-tumor effect of cetuximab using protein kinetics and mouse xenograft models: *BMC Res.Notes*, v. 4, p. 140.
- McCubrey, J. A. *et al.*, 2007, Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1773, no. 8, p. 1263-1284.
- Meloche, S., and J. Pouyssegur, 2007, The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition: *Oncogene*, v. 26, no. 22, p. 3227-3239.
- Meng, S. *et al.*, 2006, uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 103, no. 46, p. 17361-17365.

Merseburger, A. S. *et al.*, 2005, Membranous expression and prognostic implications of epidermal growth factor receptor protein in human renal cell cancer: *Anticancer Research*, v. 25, no. 3B, p. 1901-1907.

Meseure, D. *et al.*, 2012, Profiling of EGFR mRNA and protein expression in 471 breast cancers compared with 10 normal tissues: a candidate biomarker to predict EGFR inhibitor effectiveness: *Int.J.Cancer*, v. 131, no. 4, p. 1009-1010.

Mineo, J. F. *et al.*, 2007, Low HER2-expressing glioblastomas are more often secondary to anaplastic transformation of low-grade glioma: *Journal of Neuro-Oncology*, v. 85, no. 3, p. 281-287.

Mineo, J. F. *et al.*, 2004, Recombinant humanised anti-HER2/neu antibody (Herceptin) induces cellular death of glioblastomas: *British Journal of Cancer*, v. 91, no. 6, p. 1195-1199.

Mineo, J. F. *et al.*, 2006, Increasing of HER2 membranar density in human glioblastoma U251MG cell line established in a new nude mice model: *Journal of Neuro-Oncology*, v. 76, no. 3, p. 249-255.

Miqueli, A. D. *et al.*, 2009, Radiosensitisation of U87MG brain tumours by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: *British Journal of Cancer*, v. 100, no. 6, p. 950-958.

Mittendorf, E. A. *et al.*, 2006, Investigating the combination of trastuzumab and HER2/neu peptide vaccines for the treatment of breast cancer: *Annals of Surgical Oncology*, v. 13, no. 8, p. 1085-1098.

Moasser, M. M., 2007, The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis: *Oncogene*, v. 26, no. 45, p. 6469-6487.

Modrek, A. S. *et al.*, 2014, Brain stem cells as the cell of origin in glioma: *World J Stem Cells*, v. 6, no. 1, p. 43-52.

Moja, L. *et al.*, 2012, Trastuzumab containing regimens for early breast cancer: *Cochrane.Database.Syst.Rev.*, v. 4, p. CD006243.

Moore, S. F. *et al.*, 2011, mTORC2 protein complex-mediated Akt (Protein Kinase B) Serine 473 Phosphorylation is not required for Akt1 activity in human platelets [corrected]: *J.Biol.Chem.*, v. 286, no. 28, p. 24553-24560.

Moreira, C., and V. Kaklamani, 2010, Lapatinib and breast cancer: current indications and outlook for the future: *Expert Rev.Anticancer Ther*, v. 10, no. 8, p. 1171-1182.

Mukherjee, B. *et al.*, 2009, EGFRvIII and DNA Double-Strand Break Repair: A Molecular Mechanism for Radioresistance in Glioblastoma: *Cancer Research*, v. 69, no. 10, p. 4252-4259.

Mullen, P., 2004, PARP cleavage as a means of assessing apoptosis: *Methods Mol.Med.*, v. 88, p. 171-181.

Murphy, G. *et al.*, 1991, Matrix Metalloproteinase Degradation of Elastin, Type-Iv Collagen and Proteoglycan - A Quantitative Comparison of the Activities of 95 Kda and 72 Kda Gelatinases, Stromelysin-1 and Stromelysin-2 and Punctuated Metalloproteinase (Pump): *Biochemical Journal*, v. 277, p. 277-279.

Nabeshima, K. *et al.*, 2002, Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration: *Pathol.Int.*, v. 52, no. 4, p. 255-264.

Nakadate, Y. *et al.*, 2014, KRAS mutation confers resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against human colorectal cancer cells: *Int.J.Cancer*, v. 134, no. 9, p. 2146-2155.

Neve, R. M. *et al.*, 2001, The role of overexpressed HER2 in transformation: *Annals of Oncology*, v. 12, p. 9-13.

Neve, R. M. *et al.*, 2000, Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells: *Oncogene*, v. 19, no. 13, p. 1647-1656.

Newby, A. C., 2006, Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates: *Cardiovascular Research*, v. 69, no. 3, p. 614-624.

Nicholson, R. I. *et al.*, 2001, EGFR and cancer prognosis: *European Journal of Cancer*, v. 37, p. S9-S15.

Nieder, C. *et al.*, 2005, Treatment of unresectable glioblastoma multiforme: *Anticancer Research*, v. 25, no. 6C, p. 4605-4610.

Noh, H. *et al.*, 2013, Role of urokinase receptor in tumor progression and development: *Theranostics.*, v. 3, no. 7, p. 487-495.

Nuciforo, P. G. *et al.*, 2003, Molecular and immunohistochemical analysis of HER2/neu oncogene in synovial sarcoma: *Human Pathology*, v. 34, no. 7, p. 639-645.

O'Halloran, T. V. *et al.*, 2013, The many spaces of uPAR: delivery of theranostic agents and nanobins to multiple tumor compartments through a single target: *Theranostics.*, v. 3, no. 7, p. 496-506.

Offersen, B. V. *et al.*, 2009, Accelerated partial breast irradiation as part of breast conserving therapy of early breast carcinoma: a systematic review: *Radiother.Oncol*, v. 90, no. 1, p. 1-13.

Ohgaki, H., 2005, Genetic pathways to glioblastomas: *Neuropathology.*, v. 25, no. 1, p. 1-7.

Ohgaki, H. *et al.*, 2004, Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study: *Cancer Research*, v. 64, no. 19, p. 6892-6899.

Ohgaki, H., and P. Kleihues, 2005, Epidemiology and etiology of gliomas: *Acta Neuropathologica*, v. 109, no. 1, p. 93-108.

Ohgaki, H., and P. Kleihues, 2007, Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma: *American Journal of Pathology*, v. 170, no. 5, p. 1445-1453.

Ohgaki, H., and P. Kleihues, 2013, The definition of primary and secondary glioblastoma: *Clin.Cancer Res.*, v. 19, no. 4, p. 764-772.

Olayioye, M. A., 2001, Update on HER-2 as a target for cancer therapy - Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members: *Breast Cancer Research*, v. 3, no. 6, p. 385-389.

Osborne, C. K. *et al.*, 1980, Epidermal Growth-Factor Stimulation of Human-Breast Cancer-Cells in Culture: *Cancer Research*, v. 40, no. 7, p. 2361-2366.

Park, J. H. *et al.*, 2010, Highly malignant soft tissue sarcoma of the extremity with a delayed diagnosis: *World J.Surg.Oncol.*, v. 8, p. 84.

Parker, J. J. *et al.*, 2013, Gefitinib selectively inhibits tumor cell migration in EGFR-amplified human glioblastoma: *Neuro-Oncology*, v. 15, no. 8, p. 1048-1057.

Parkin, D. M., 2006, The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002: *Int.J.Cancer*, v. 118, no. 12, p. 3030-3044.

Patel, A. P. *et al.*, 2014, Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma: *Science*, v. 344, no. 6190, p. 1396-1401.

Pawlik, T. M., and K. Keyomarsi, 2004, Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy: *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, v. 59, no. 4, p. 928-942.

Pestell, R. G., 2013, New Roles of Cyclin D1: *American Journal of Pathology*, v. 183, no. 1, p. 3-9.

Pinkas-Kramarski, R. *et al.*, 1996, Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions: *Embo Journal*, v. 15, no. 10, p. 2452-2467.

Poirier, M. C., 2004, Chemical-induced DNA damage and human cancer risk: *Nat.Rev.Cancer*, v. 4, no. 8, p. 630-637.

Ponten, J., and E. H. Macintyre, 1968, Long term culture of normal and neoplastic human glia: *Acta Pathol.Microbiol.Scand.*, v. 74, no. 4, p. 465-486.

Potti, A. *et al.*, 2004a, Determination of HER-2/neu overexpression and clinical predictors of survival in a cohort of 347 patients with primary malignant brain tumors: *Cancer Invest*, v. 22, no. 4, p. 537-544.

Potti, A. *et al.*, 2004b, Immunohistochemical detection of HER-2/neu, c-kit (CD117) and vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in soft tissue sarcomas: *Anticancer Research*, v. 24, no. 1, p. 333-337.

Purohit, S. *et al.*, 2011, Systemic therapy in soft tissue sarcomas: past, present and future: *Indian J.Surg.Oncol.*, v. 2, no. 4, p. 327-331.

Qiu, L. X. *et al.*, 2010, Predictive and prognostic value of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: a meta-analysis of 22 studies: *Eur.J.Cancer*, v. 46, no. 15, p. 2781-2787.

Quan, A. L. *et al.*, 2005, Epidermal growth factor receptor amplification does not have prognostic significance in patients with glioblastoma multiforme: *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, v. 63, no. 3, p. 695-703.

Raben, D. *et al.*, 2005, The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer: *Clinical Cancer Research*, v. 11, no. 2, p. 795-805.

Raghu, H. *et al.*, 2011, Specific knockdown of uPA/uPAR attenuates invasion in glioblastoma cells and xenografts by inhibition of cleavage and trafficking of Notch -1 receptor: *Mol.Cancer*, v. 10, p. 130.

- Rainov, N. G. *et al.*, 1997, Prognostic factors in malignant glioma: influence of the overexpression of oncogene and tumor-suppressor gene products on survival: *J.Neurooncol.*, v. 35, no. 1, p. 13-28.
- Ramis, G. *et al.*, 2012, EGFR Inhibition in Glioma Cells Modulates Rho Signaling to Inhibit Cell Motility and Invasion and Cooperates with Temozolomide to Reduce Cell Growth: *Plos One*, v. 7, no. 6.
- Ray-Coquard, I. *et al.*, 2008, A phase II study of gefitinib for patients with advanced HER-1 expressing synovial sarcoma refractory to doxorubicin-containing regimens: *Oncologist*, v. 13, no. 4, p. 467-473.
- Ren, W. *et al.*, 2008, Epidermal growth factor receptor blockade in combination with conventional chemotherapy inhibits soft tissue sarcoma cell growth in vitro and in vivo: *Clin.Cancer Res.*, v. 14, no. 9, p. 2785-2795.
- Reszec, J. *et al.*, 2011, c-erbB-2 protein expression in astrocytic tumors of the brain: *Med.Sci.Monit.*, v. 17, no. 8, p. BR216-BR220.
- Rexer, B. N., and C. L. Arteaga, 2012, Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications: *Crit Rev.Oncog.*, v. 17, no. 1, p. 1-16.
- Riaz, N. *et al.*, 2013, Should Cetuximab Replace Cisplatin for Definitive Chemoradiotherapy in Locally Advanced Head and Neck Cancer?: *Journal of Clinical Oncology*, v. 31, no. 2, p. 287-288.
- Riesterer, O. *et al.*, 2008, Combining molecular therapeutics with radiotherapy for head and neck cancer: *Journal of Surgical Oncology*, v. 97, no. 8, p. 708-711.
- Rink, H., 1971, Die Radiolyse des Wassers: *Chemie in unserer Zeit*, v. 5, no. 3, p. 90-95.
- Roda, J. M. *et al.*, 2007, The activation of natural killer cell effector functions by cetuximab-coated, epidermal growth factor receptor-positive tumor cells is enhanced by cytokines: *Clinical Cancer Research*, v. 13, no. 21, p. 6419-6428.
- Rose, J. S., and T. S. Bekaii-Saab, 2011, New developments in the treatment of metastatic gastric cancer: focus on trastuzumab: *Onco.Targets Ther.*, v. 4, p. 21-26.
- Roskoski, R., Jr., 2014, The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer: *Pharmacol.Res.*, v. 79, p. 34-74.
- Rowan, K., 2010, Should Cetuximab Replace Cisplatin in Head and Neck Cancer?: *Journal of the National Cancer Institute*, v. 102, no. 2, p. 74-+.
- Rowley, R., and D. B. Leeper, 1985, Cell cycle age dependence for radiation-induced G2 arrest: evidence for time-dependent repair: *Radiation Research*, v. 103, no. 3, p. 326-336.
- Rutgers, D. H. *et al.*, 1989, Relationship between cell kinetics and radiation-induced arrest of proliferating cells in G2: relevance to efficacy of radiotherapy: *Anal.Cell Pathol.*, v. 1, no. 1, p. 53-62.
- Sambade, M. J. *et al.*, 2009, Mechanism of lapatinib-mediated radiosensitization of breast cancer cells is primarily by inhibition of the Raf>MEK>ERK mitogen-activated protein kinase cascade and

radiosensitization of lapatinib-resistant cells restored by direct inhibition of MEK: *Radiother.Oncol.*, v. 93, no. 3, p. 639-644.

Sancar, A. *et al.*, 2004, Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints: *Annu.Rev.Biochem.*, v. 73, p. 39-85.

Sanchez-Osuna, M. *et al.*, 2014, Caspase-activated DNase Is Necessary and Sufficient for Oligonucleosomal DNA Breakdown, but Not for Chromatin Disassembly during Caspase-dependent Apoptosis of LN-18 Glioblastoma Cells: *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, no. 27, p. 18752-18769.

Sato, O. *et al.*, 2005, Expression of epidermal growth factor receptor, ERBB2 and KIT in adult soft tissue sarcomas: a clinicopathologic study of 281 cases: *Cancer*, v. 103, no. 9, p. 1881-1890.

Sato, T. *et al.*, 2003, Expression of HER2/neu does not correlate with survival in soft tissue sarcoma: *Onkologie*, v. 26, no. 3, p. 268-271.

Schafer, B. *et al.*, 2004, Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion: *Oncogene*, v. 23, no. 4, p. 991-999.

Schillaci, R. *et al.*, 2012, Clinical relevance of ErbB-2/HER2 nuclear expression in breast cancer: *Bmc Cancer*, v. 12, p. 74.

Schneider, M. R., and E. Wolf, 2009, The Epidermal Growth Factor Receptor Ligands at a Glance: *Journal of Cellular Physiology*, v. 218, no. 3, p. 460-466.

Scholl, S. *et al.*, 2001, Targeting HER2 in other tumor types: *Annals of Oncology*, v. 12 Suppl 1, p. S81-S87.

Schulte, A. *et al.*, 2013, Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110⁺: *Neuro-Oncology*.

Sergina, N. V. *et al.*, 2007, Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3: *Nature*, v. 445, no. 7126, p. 437-441.

Seshacharyulu, P. *et al.*, 2012, Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy: *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 16, no. 1, p. 15-31.

Seton-Rogers, S. E. *et al.*, 2004, Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, no. 5, p. 1257-1262.

Shaib, W. *et al.*, 2012, Antiepidermal growth factor receptor therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck: *J.Oncol.*, v. 2012, p. 521215.

Shen, K. R. *et al.*, 2014, Role of EGFR as a prognostic factor for survival in head and neck cancer: a meta-analysis: *Tumor Biology*, v. 35, no. 3, p. 2285-2295.

Shinojima, N. *et al.*, 2003, Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme: *Cancer Research*, v. 63, no. 20, p. 6962-6970.

Simmons, M. L. *et al.*, 2001, Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients: *Cancer Research*, v. 61, no. 3, p. 1122-1128.

- Sinha, S., and A. H. Peach, 2010, Diagnosis and management of soft tissue sarcoma: *BMJ*, v. 341, p. c7170.
- Slamon, D. J. *et al.*, 2001, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2: *N.Engl.J.Med.*, v. 344, no. 11, p. 783-792.
- Slamon, D., 2000, Herceptin-«: increasing survival in metastatic breast cancer: *European Journal of Oncology Nursing*, v. 4, Supplement A, no. 0, p. 24-29.
- Smith, H. W., and C. J. Marshall, 2010, Regulation of cell signalling by uPAR: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 11, no. 1, p. 23-36.
- Snuderl, M. *et al.*, 2011, Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma: *Cancer Cell*, v. 20, no. 6, p. 810-817.
- Solomon, B. *et al.*, 2003, EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. Epidermal growth factor receptor: *Int.J.Radiat.Oncol Biol.Phys.*, v. 55, no. 3, p. 713-723.
- Srivastava, R. M. *et al.*, 2013, Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients: *Clin.Cancer Res.*, v. 19, no. 7, p. 1858-1872.
- Steffen, A. C. *et al.*, 2008, Differences in radiosensitivity between three HER2 overexpressing cell lines: *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 35, no. 6, p. 1179-1191.
- Stommel, J. M. *et al.*, 2007, Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies: *Science*, v. 318, no. 5848, p. 287-290.
- Stummer, W. *et al.*, 2006, Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial: *Lancet Oncol.*, v. 7, no. 5, p. 392-401.
- Stummer, W. *et al.*, 2008, Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias: *Neurosurgery*, v. 62, no. 3, p. 564-576.
- Stupp, R. *et al.*, 2005, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma: *N.Engl.J.Med.*, v. 352, no. 10, p. 987-996.
- Stupp, R. *et al.*, 2010, High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up: *Annals of Oncology*, v. 21 Suppl 5, p. v190-v193.
- Suzuki, K. *et al.*, 2003, Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability: *Oncogene*, v. 22, no. 45, p. 6988-6993.
- Tao, Y. G. *et al.*, 2005, Nuclear accumulation of epidermal growth factor receptor and acceleration of G1/S stage by Epstein-Barr-encoded oncoprotein latent membrane protein 1: *Experimental Cell Research*, v. 303, no. 2, p. 240-251.
- Teillaud, J. L., 2001, *Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)*, eLS: John Wiley & Sons, Ltd.
- Thomas, D. G. *et al.*, 2005, Expression of receptor tyrosine kinases epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in synovial sarcoma: *Cancer*, v. 103, no. 4, p. 830-838.

- Torp, S. H. *et al.*, 2007, Coexpression of c-erbB 1-4 receptor proteins in human glioblastomas. An immunohistochemical study: *J.Exp.Clin.Cancer Res.*, v. 26, no. 3, p. 353-359.
- Toulany, M. *et al.*, 2007, Stimulated PI3K-AKT signaling mediated through ligand or radiation-induced EGFR depends indirectly, but not directly, on constitutive K-Ras activity: *Mol.Cancer Res.*, v. 5, no. 8, p. 863-872.
- Toulany, M., and H. P. Rodemann, 2010, Membrane receptor signaling and control of DNA repair after exposure to ionizing radiation: *Nuklearmedizin-Nuclear Medicine*, v. 49, no. 6A, p. S26-S30.
- Tsai, Y. C. *et al.*, 2015, Synergistic Blockade of EGFR and HER2 by New-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Enhances Radiation Effect in Bladder Cancer Cells: *Mol.Cancer Ther.*
- Tsitlakidis, A. *et al.*, 2010, Biopsy versus resection in the management of malignant gliomas: a systematic review and meta-analysis: *J.Neurosurg.*, v. 112, no. 5, p. 1020-1032.
- Turkeri, L. N. *et al.*, 1994, Comparative analysis of epidermal growth factor receptor gene expression and protein product in benign, premalignant, and malignant prostate tissue: *Prostate*, v. 25, no. 4, p. 199-205.
- Tzahar, E. *et al.*, 1996, A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor: *Mol.Cell Biol.*, v. 16, no. 10, p. 5276-5287.
- Ulu, N. *et al.*, 2013, Intracellular Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by alpha(1A)-Adrenoceptor Is Mediated by Phosphatidylinositol 3-Kinase Independently of Activation of Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2 and Serine-Threonine Kinases in Chinese Hamster Ovary Cells: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 347, no. 1, p. 47-56.
- Underwood, M. *et al.*, 1995, C-ErbB-2 Gene Amplification - A Molecular Marker in Recurrent Bladder-Tumors: *Cancer Research*, v. 55, no. 11, p. 2422-2430.
- Upez-Albaitero, A., and R. L. Ferris, 2007, Immune activation by epidermal growth factor receptor-specific monoclonal antibody therapy for head and neck cancer: *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, v. 133, no. 12, p. 1277-1281.
- Urbanska, K. *et al.*, 2014, Glioblastoma multiforme - an overview: *Contemp.Oncol (Pozn.)*, v. 18, no. 5, p. 307-312.
- Valastyan, S., and R. A. Weinberg, 2011, Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms: *Cell*, v. 147, no. 2, p. 275-292.
- Valdehita, A. *et al.*, 2009, Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces transactivation of EGFR and HER2 in human breast cancer cells: *Mol Cell Endocrinol.*, v. 302, no. 1, p. 41-48.
- van den Bent, M. J., 2006, Adjuvant treatment of high grade gliomas: *Annals of Oncology*, v. 17, p. X186-X190.
- Van Meir, E. *et al.*, 1990, Human Glioblastoma Cells Release Interleukin-6 In vivo and In vitro: *Cancer Research*, v. 50, no. 20, p. 6683-6688.
- Van Meir, E. G. *et al.*, 2010, Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma: *CA Cancer J.Clin.*, v. 60, no. 3, p. 166-193.

- Verhaak, R. G. *et al.*, 2010, Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1: *Cancer Cell*, v. 17, no. 1, p. 98-110.
- Vivanco, I., and C. L. Sawyers, 2002, The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer: *Nature Reviews Cancer*, v. 2, no. 7, p. 489-501.
- Voelzke, W. R. *et al.*, 2008, Targeting the epidermal growth factor receptor in high-grade astrocytomas: *Curr.Treat.Options Oncol.*, v. 9, no. 1, p. 23-31.
- Vollmann, A. *et al.*, 2006, Effective silencing of EGFR with RNAi demonstrates non-EGFR dependent proliferation of glioma cells: *International Journal of Oncology*, v. 28, no. 6, p. 1531-1542.
- Vu, T., and F. X. Claret, 2012, Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer: *Front Oncol*, v. 2, p. 62.
- Wachtel, M. *et al.*, 2006, Subtype and prognostic classification of rhabdomyosarcoma by immunohistochemistry: *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, no. 5, p. 816-822.
- Wang, L. *et al.*, 2006, Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration: *J.Neurosci.*, v. 26, no. 22, p. 5996-6003.
- Wang, S. C., and M. C. Hung, 2009, Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors: *Clin.Cancer Res*, v. 15, no. 21, p. 6484-6489.
- Wang, Y. D. *et al.*, 2002, Cooperation between heparin-binding EGF-like growth factor and interleukin-6 in promoting the growth of human myeloma cells: *Oncogene*, v. 21, no. 16, p. 2584-2592.
- Wang, Y. N. *et al.*, 2010, Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins: *Oncogene*, v. 29, no. 28, p. 3997-4006.
- Watanabe, K. *et al.*, 1996, Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas: *Brain Pathol.*, v. 6, no. 3, p. 217-223.
- Waterman, H., and Y. Yarden, 2001, Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases: *FEBS Lett.*, v. 490, no. 3, p. 142-152.
- Widmann, C. *et al.*, 1998, Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals: *J.Biol.Chem.*, v. 273, no. 12, p. 7141-7147.
- Wieduwilt, M. J., and M. M. Moasser, 2008, The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics: *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, no. 10, p. 1566-1584.
- Wiley, H. S., 2003, Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling: *Exp.Cell Res*, v. 284, no. 1, p. 78-88.
- Williard, W. C. *et al.*, 1992, The Changing-Role of Amputation for Soft-Tissue Sarcoma of the Extremity in Adults: *Surgery Gynecology & Obstetrics*, v. 175, no. 5, p. 389-396.

- Wilson, T. A. *et al.*, 2014, Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics: *Surg.Neurol.Int.*, v. 5, p. 64.
- Wolbers, J. G., 2014, Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies: *Chin J.Cancer*, v. 33, no. 1, p. 8-15.
- Wolf-Yadlin, A. *et al.*, 2006, Effects of HER2 overexpression on cell signaling networks governing proliferation and migration: *Molecular Systems Biology*, v. 2.
- Wong, A. J. *et al.*, 1987, Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 84, no. 19, p. 6899-6903.
- Wrensch, M. *et al.*, 1993, Environmental risk factors for primary malignant brain tumors: a review: *J.Neurooncol.*, v. 17, no. 1, p. 47-64.
- Wrensch, M. *et al.*, 2006, Serum IgE, tumor epidermal growth factor receptor expression, and inherited polymorphisms associated with glioma survival: *Cancer Research*, v. 66, no. 8, p. 4531-4541.
- Xia, S. *et al.*, 2010, Activated PI3K/Akt/COX-2 pathway induces resistance to radiation in human cervical cancer HeLa cells: *Cancer Biother.Radiopharm.*, v. 25, no. 3, p. 317-323.
- Xia, W. *et al.*, 2009, Nuclear Expression of Epidermal Growth Factor Receptor is a Novel Prognostic Value in Patients With Ovarian Cancer: *Molecular carcinogenesis*, v. 48, no. 7, p. 610-617.
- Xia, W. *et al.*, 2011, Truncated ErbB2 expressed in tumor cell nuclei contributes to acquired therapeutic resistance to ErbB2 kinase inhibitors: *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 10, no. 8, p. 10.
- Xu, G. F., and W. F. Xie, 2013, Effect of ERBB2 expression on invasiveness of glioma TJ905 cells: *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 6, no. 12, p. 964-967.
- Xu, X. *et al.*, 2005, Matrix metalloproteinase-2 contributes to cancer cell migration on collagen: *Cancer Research*, v. 65, no. 1, p. 130-136.
- Yagi, H. *et al.*, 2005, Clinical significance of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in peritoneal fluid of ovarian cancer: *British Journal of Cancer*, v. 92, no. 9, p. 1737-1745.
- Yakes, F. M. *et al.*, 2002, Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action: *Cancer Research*, v. 62, no. 14, p. 4132-4141.
- Yamaguchi, H., and J. Condeelis, 2007, Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1773, no. 5, p. 642-652.
- Yamauchi, J. *et al.*, 2008, ErbB2 directly activates the exchange factor Dock7 to promote Schwann cell migration: *Journal of Cell Biology*, v. 181, no. 2, p. 351-365.
- Yan, Y. *et al.*, 2014, A novel function of HER2/Neu in the activation of G2/M checkpoint in response to gamma-irradiation: *Oncogene*, v. 0.

- Yang, C. F. *et al.*, 2006a, Essential role for Rac in heregulin beta 1 mitogenic signaling: a mechanism that involves epidermal growth factor receptor and is independent of ErbB4: *Molecular and Cellular Biology*, v. 26, no. 3, p. 831-842.
- Yang, G. *et al.*, 2004, Inhibition of breast and ovarian tumor growth through multiple signaling pathways by using retrovirus-mediated small interfering RNA against Her-2/neu gene expression: *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, no. 6, p. 4339-4345.
- Yang, J. L. *et al.*, 2006b, Expression of HER1/EGFR protein in human soft tissue sarcomas: *Eur.J.Surg.Oncol.*, v. 32, no. 4, p. 466-468.
- Yang, Y. R. *et al.*, 2012, Diverse cellular and physiological roles of phospholipase C-gamma1: *Adv.Biol.Regul.*, v. 52, no. 1, p. 138-151.
- Yarden, Y., 2001, The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities: *European Journal of Cancer*, v. 37, p. S3-S8.
- Yarden, Y., and G. Pines, 2012, The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology: *Nat.Rev.Cancer*, v. 12, no. 8, p. 553-563.
- Yarden, Y., and M. X. Sliwkowski, 2001, Untangling the ErbB signalling network: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, no. 2, p. 127-137.
- Yatabe, Y. *et al.*, 2008, Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer: *Cancer Research*, v. 68, no. 7, p. 2106-2111.
- Yewale, C. *et al.*, 2013, Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies: *Biomaterials*, v. 34, no. 34, p. 8690-8707.
- Yoshida, T. *et al.*, 2008, Matuzumab and cetuximab activate the epidermal growth factor receptor but fail to trigger downstream signaling by Akt or Erk: *Int.J.Cancer*, v. 122, no. 7, p. 1530-1538.
- Zaczek, A. *et al.*, 2005, The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches: *Histology and Histopathology*, v. 20, no. 3, p. 1005-1015.
- Zafrakas, M. *et al.*, 2009, ERBB2 (HER2) protein expression in uterine sarcomas: *European Journal of Gynaecological Oncology*, v. 30, no. 3, p. 292-294.
- Zahm, S. H., and J. F. Fraumeni, Jr., 1997, The epidemiology of soft tissue sarcoma: *Semin.Oncol.*, v. 24, no. 5, p. 504-514.
- Zaoui, K. *et al.*, 2010, ErbB2 receptor controls microtubule capture by recruiting ACF7 to the plasma membrane of migrating cells: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, no. 43, p. 18517-18522.
- Zhang, J. J. *et al.*, 2014, Yin Yang-1 suppresses invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma by downregulating MMP10 in a MUC4/ErbB2/p38/MEF2C-dependent mechanism: *Mol.Cancer*, v. 13, p. 130.
- zum Buschenfelde, C. M. *et al.*, 2002, Antihuman epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody trastuzumab enhances cytolytic activity of class I-restricted HER2-specific T

lymphocytes against HER2-overexpressing tumor cells: *Cancer Research*, v. 62, no. 8, p. 2244-2247.

7.2 Internetquellen

Interpreting Diagnostic Tests. Thomas G. Tape, MD. (University of Nebraska Medical Center);
<http://gim.unmc.edu/dxtests/ROC3.htm> [06.07.2015]

Leitlinien für Gliome der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen
Fachgesellschaften e. V. (AWMF), März 2014; http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome_2015-06.pdf [06.07.2015]

Weichteilsarkom Leitlinie, DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische
Onkologie e. V., Stand: März 2011;
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/weichteilsarkome/@@view/html/index.html> [06.07.2015]

Human DNA Repair Genes;
http://sciencepark.mdanderson.org/labs/wood/DNA_Repair_Genes.html [06.07.2015]

Übersicht der Mutationen der Zelllinie LN-229; <https://www.cansar.icr.ac.uk/cansar/cell-lines/LN-229/mutations/> [06.07.2015]

Übersicht der Mutationen der Zelllinie U251MG; <https://cansar.icr.ac.uk/cansar/cell-lines/U251/mutations/> [06.07.2015]

NCBI Datenbank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore> [06.07.2015]

8 Anhang

Tabelle 8-1: Korrelation zwischen histopathologischen und klinischen Parametern und dem *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalt im Tumorgewebe von Glioblastompatienten.

Parameter	n	<i>EGFR</i> mRNA		<i>HER2</i> mRNA	
		≤ Median (n=17)	> Median (n=17)	≤ Median (n=17)	> Median (n=17)
Geschlecht		p=0,30		p=0,08	
männlich	16	6	10	11	5
weiblich	18	11	7	6	12
Karnofsky Index		p=1,00		p=1,00	
<70	14	7	7	7	7
≥70	14	6	8	7	7
unbekannt	6				
Tumorlokalisierung		p=0,32		p=0,80	
frontal	7	3	4	3	4
parietal	5	3	2	2	3
temporal	13	5	8	6	7
okzipital	3	0	3	2	1
andere	2	2	0	2	0
unbekannt	4				
Alter		p=0,259		p=0,708	
<60	10	3	7	6	4
≥60	24	14	10	11	13

Patientenzahl gesamt: *EGFR* mRNA: n=34; *HER2* mRNA: n=34. Unterteilung der Patienten in zwei Gruppen entsprechend des medianen *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts. Die Normalisierung des *EGFR* bzw. *HER2* mRNA-Gehalts erfolgte zum *POLR2A* mRNA-Gehalt. n=Anzahl der Patienten.

Tabelle 8-2: Korrelation zwischen histopathologischen und klinischen Parametern und dem mRNA- bzw. Proteingehalt von EGFR im Tumorgewebe von Weichteilsarkompatienten.

Parameter	n	EGFR mRNA		n	EGFR Protein	
		≤ Median (n=62)	> Median (n=62)		≤ Median (n=27)	> Median (n=28)
Geschlecht		p=1,00		p=0,79		
männlich	56	28	28	25	13	12
weiblich	68	34	34	30	14	16
Histologischer Subtyp		p=0,86		p=0,20		
Liposarkom	27	12	15	0	0	0
MFH/Fibrosarkom	38	18	20	18	7	11
NS	15	9	6	7	6	1
RMS/LMS	29	16	13	20	10	10
andere WTS	15	7	8	10	4	6
Tumorstadium		p=0,35		p=0,17		
I	15	7	8	1	0	1
II	57	31	26	24	12	12
III	40	16	24	21	8	13
IV	12	8	4	9	7	2
Tumorlokalisation		p<0,001**		p=0,024*		
Extremitäten	79	30	49	35	17	18
Thorax	12	11	1	4	4	0
Kopf	4	3	1	2	2	0
Abdomen	27	18	9	14	4	10
multiple Lokalisationen	2	0	2	0	0	0
Rezidiv		p=1,00		p=0,054		
Ja	55	28	27	22	7	15
Nein	69	34	35	33	20	13
Fernmetastasen		p=0,32		p=0,25		
M0	114	55	59	48	22	26
M1	10	7	3	7	5	2
Lymphknoten Status		p=0,21		p=0,051		
N0	118	57	61	51	23	28
N1	6	5	1	4	4	0

Patientenzahl gesamt: EGFR mRNA: n=124; EGFR Protein: n=55. Unterteilung der Patienten in zwei Gruppen entsprechend des medianen mRNA- bzw. Proteingehalts von EGFR. Die Normalisierung des EGFR mRNA-Gehalts erfolgte zum *HPRT1* mRNA-Gehalt. Die Normalisierung des EGFR Proteingehalts erfolgte zum Totalproteingehalt. MFH: Malignes fibröses Histiozytom; NS: Neurogenes Sarkom; RMS: Rhabdomyosarkom; LMS: Leiomyosarkom; M0: keine Fernmetastasen; M1: Fernmetastasen vorhanden; N0: keine Metastasen in den regionalen Lymphknoten; N1: Metastasen in hilären oder peribronchialen oder intrapulmonale Lymphknoten. * p≤0,05 und ** p≤0,001 vs. Referenzgruppe. n=Anzahl der Patienten.

Tabelle 8-3: Korrelation zwischen histopathologischen und klinischen Parametern und dem mRNA- bzw. Proteingehalt von HER2 im Tumorgewebe von Weichteilsarkompatienten.

Parameter	n	HER2 mRNA		n	HER2 Protein	
		≤ Median (n=62)	> Median (n=62)		≤ Median (n=26)	> Median (n=27)
Geschlecht		p=0,37			p=0,59	
männlich	56	31	25	24	13	11
weiblich	68	31	37	29	13	16
Histologischer Subtyp		p=0,025*			p=1,00	
Liposarkom	27	12	15	0	0	0
MFH/Fibrosarkom	38	20	18	17	12	5
NS	15	5	10	7	4	3
RMS/LMS	29	18	11	19	7	12
andere WTS	15	7	8	10	3	7
Tumorstadium		p=0,13			p=1,00	
I	15	5	10	1	1	0
II	57	30	27	24	10	14
III	40	21	19	19	10	9
IV	12	6	6	9	5	4
Tumorlokalisation		p=1,00			p=1,00	
Extremitäten	79	33	46	34	16	18
Thorax	12	10	2	4	3	1
Kopf	4	3	1	1	1	0
Abdomen	27	15	12	14	6	8
multiple Lokalisationen	2	1	1	0	0	0
Rezidiv		p=1,00			p=0,40	
Ja	55	28	27	20	8	12
Nein	69	34	35	33	18	15
Fernmetastasen		p=0,74			p=0,70	
M0	114	56	58	46	22	24
M1	10	6	4	7	4	3
Lymphknoten Status		p=0,68			p=0,61	
N0	118	60	58	50	24	26
N1	6	2	4	3	2	1

Patientenzahl gesamt: HER2 mRNA: n=124; HER2 Protein: n=53. Unterteilung der Patienten in zwei Gruppen entsprechend des medianen mRNA- bzw. Proteingehalts von HER2. Die Normalisierung des HER2 mRNA-Gehalts erfolgte zum *HPRT1* mRNA-Gehalt. Die Normalisierung des HER2 Proteingehalts erfolgte zum Totalproteingehalt. MFH: Malignes fibröses Histiozytom; NS: Neurogenes Sarkom; RMS: Rhabdomyosarkom; LMS: Leiomyosarkom; M0: keine Fernmetastasen; M1: Fernmetastasen vorhanden; N0: keine Metastasen in den regionalen Lymphknoten; N1: Metastasen in hilären oder peribronchialen oder intrapulmonale Lymphknoten. * p≤0,05 vs. Referenzgruppe. n=Anzahl der Patienten.

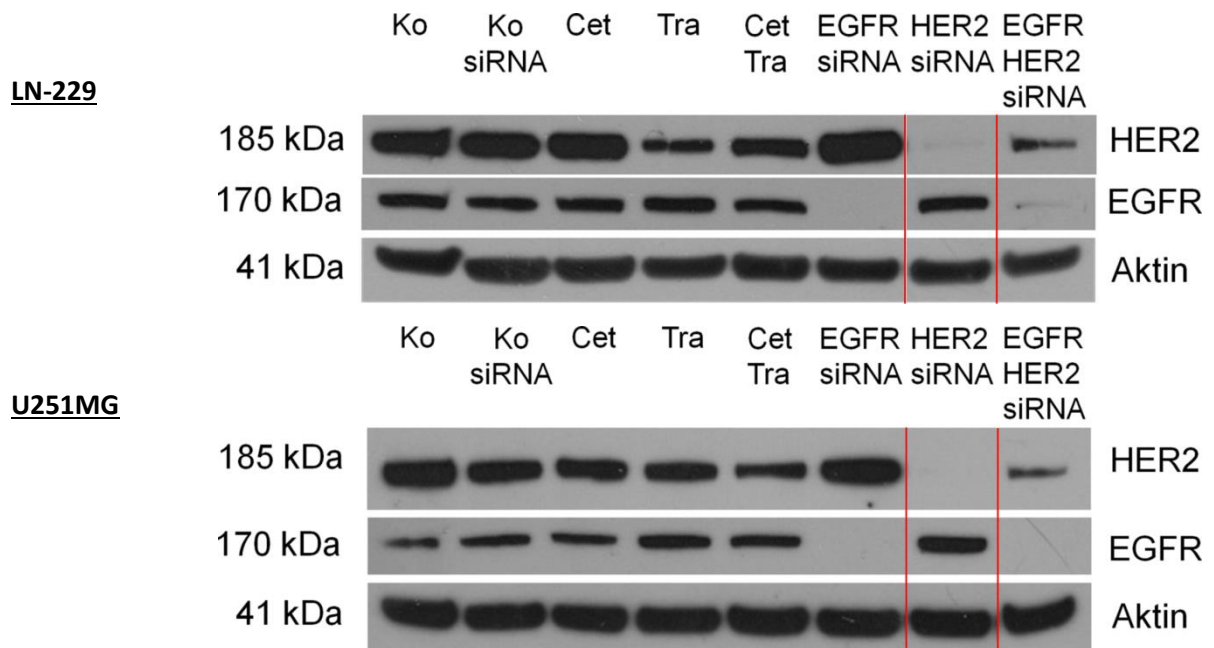


Abb. 8-1: Einfluss der Cetuximab, Trastuzumab, EGFR-siRNA bzw. HER2-siRNA Exposition auf den EGFR bzw. HER2 Proteingehalt von LN-229 und U251MG Zellen.

Western Blot Analyse des EGFR und HER2 Proteingehalts. 48 h nach Behandlung. Aktin diene als Ladekontrolle. Rote Markierung: Der Western Blot wurde mit Hilfe des Grafikprogramms Photoshop CS6 geschnitten und die entsprechenden Einzelbanden mit Hilfe des Programms Microsoft PowerPoint verbunden. (Ko: unbehandelte Kontrolle; Ko siRNA: siRNA Kontrolle; Cet: Cetuximab; Tra: Trastuzumab; EGFR-siRNA: EGFR spezifische siRNA; HER2-siRNA: HER2 spezifische siRNA).

Tabelle 8-4: Zusammenfassung zellphysiologischer und zellbiologischer Effekte in den Glioblastomzelllinien LN-229 und U251MG nach Verringerung der EGFR- bzw. HER2-Genexpression.

Parameter		LN-229			U251MG			
		EGFR siRNA	HER2 siRNA	EGFR & HER2 siRNA	EGFR siRNA	HER2 siRNA	EGFR & HER2 siRNA	
Genexpression	mRNA-Gehalt	<i>EGFR</i>	↓↓	→	↓↓	↓↓	↑	↓↓
		<i>HER2</i>	↑	↓↓	→	→	↓↓	↓
		<i>HER3</i>	↑	→	↑	→	→	→
		<i>EGF</i>	↑	→	↑	↑	→	↑
		<i>HB-EGF</i>	↑	↓	↑	→	→	→
		<i>TGFα</i>	→	→	→	↑	→	→
		<i>CCND1</i>	↓	↓	↓	→	↑	→
		<i>MMP2</i>	↑	↓	→	↑(↑)	↓	↑
		<i>MMP10</i>	↑↑	→	↑↑	→	→	↑↑
	Protein-Gehalt	<i>EGFR</i>	↓↓	→	↓↓	↓↓	↑	↓↓
		<i>HER2</i>	↑	↓↓	↓	→	↓↓	↓
		<i>uPA</i>	→	→	→	↑↑	→	↑
		<i>uPAR</i>	↑	→	↑	↑	↑↑	↑
		<i>PAI-1</i>	↑	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑
	zellphysiologische Effekte	Zellzyklusphasen	Proliferation	↓	↓	↓	↓	↓
G0G1			↑	↑	↑	↑	→	↑
S			↓	↓	↓	↓	↓	↓
G2M			(↓)	(↓)	(↓)	→	↑	→
Migration		→	↓	↓	→	↓	↓	
Klonogenes Zellüberleben		→	↓	↓	→	↓	→	
Radiosensitivierung		→	→	→	→	↑	→	
Apoptoserate		→	→	n. u.	→	↑	n. u.	
Vitalität		→	→	n. u.	→	(↓)	n. u.	
Caspase 3/7 Aktivität		↑	↑	n. u.	→	↑	n. u.	
Spaltung von PARP		↑↑	↑↑	n. u.	→	↑	n. u.	

→: nicht verändert; ↑: erhöht; ↑↑: stark erhöht; ↓: vermindert; ↓↓: stark vermindert im Vergleich zur Kontrolle; n. u.: nicht untersucht.

Danksagung

Ich danke Dr. rer. nat. Matthias Bache sowie Prof. Dr. med. Dirk Vordermark für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die wissenschaftliche Unterstützung sowie für die Möglichkeit meine Dissertation in der AG Molekulare Strahlenbiologie anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Matthias Kappler für die praktische Betreuung der Arbeit, für seine ständige Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen bei Problemen sowie seinen unermüdlichen Einsatz für den Fortgang meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerald Moritz möchte ich für die Bereitschaft und seine Unterstützung, meine Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät verteidigen zu können, danken.

Prof. Dr. Dr. Alexander W. Eckert möchte ich dafür danken, dass er mir ermöglicht hat meine Promotion bei den zahlreichen Anstellungen in die Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie fortzuführen.

Ich danke Prof. Dr. med. habil. Peter Würfl, Prof. Dr. rer. nat. Helge Taubert sowie PD Dr.med. Ariane Söling für die Bereitstellung der Tumorproben und der zugehörigen Datenbanken.

Ich danke Prof. Dr. Wolfgang Ch. Marsch und seinen Mitarbeiterinnen für die sehr unkomplizierte Möglichkeit meine durchflusszytometrischen Analysen in der Klinik für Dermatologie und Venerologie durchführen zu können.

Dr. rer. nat. Matthias Kotsch und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der ELISA-Messungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Gabriele Thomas und Kathrin Spröte bedanken für ihre gewissenhafte Unterstützung während meiner Promotion sowie für ihren unermüdlichen Einsatz, der einen geregelten Laboralltag erst ermöglicht hat!

Ich danke den Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie sowie der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie im besonderen Antje Güttler, Swetlana Rot, Jacqueline Kessler und Katharina Theuerkorn für ihre Unterstützung und die sehr angenehme Laboratmosphäre der vergangenen Jahre.

Ein besonderer Dank geht an Grit und Ulrike für euren Beistand gerade in der letzten Phase meiner Doktorarbeit sowie für viele sehr schöne Wanderungen in Mitteldeutschland.

Meiner Familie danke ich, dass sie mir in den letzten Jahren immer zur Seite standen. Vielen Dank für eure Geduld, Unterstützung und eure vielen aufmunternden Worte!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht. Darüber hinaus habe ich mich selbst noch um keinen Doktorgrad beworben.

Henri Wichmann

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Henri Wichmann
Adresse Landrain 50, 06118, Halle (S)
Geburtsdatum/ -ort 11.04.1981, Osterburg
Familienstand Ledig, keine Kinder

Akademische und schulische Ausbildung

seit 10/2008 Promotion zum Dr. rer. nat.
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Klinik für Strahlentherapie
Thema: Bedeutung von EGFR und HER2 in Glioblastomen und Weichteilsarkomen-Tumorbiologische und prognostische Untersuchungen

06/2007-04/2008 Anfertigung der Diplomarbeit
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Pathologie und Klinik für Strahlentherapie
Thema: Untersuchung von Osteopontin als potentielles therapeutisches Target in Weichteilsarkomen

10/2001-06/2008 Studium der Biologie
Martin-Luther-Universität Halle–Wittenberg
Hauptfach:
- Mikrobiologie
Nebenfächer :
- Genetik
- Immunologie
- Biotechnologie

06/2000 Abitur
Winckelmann-Gymnasium Stendal

Wehrdienst

07/2000-04/2001 Grundwehrdienst im Sanitätsbereich
Itzehoe, Havelberg

Stipendien und Auszeichnungen

02/2013 Nachwuchsstipendium (22. Symposium: Experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie in Dresden)

10/2008-09/2010 Stipendium der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt

06/2005-02/2006 Leonardo Da Vinci-Stipendium

Publikationen

Bache M, Kappler M, **Wichmann H**, Rot S, Hahnel A, Greither T, Said HM, Kotzsch M, Wurl P, Taubert H, Vordermark D (2010) Elevated tumor and serum levels of the hypoxia-associated protein osteopontin are associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients. *Bmc Cancer* 10

Bache M, Bernhardt S, Passin S, **Wichmann H**, Hein A, Zschornak M, Kappler M, Taubert H, Paschke R, Vordermark D (2014) Betulinic Acid Derivatives NVX-207 and B10 for Treatment of Glioblastoma-An in Vitro Study of Cytotoxicity and Radiosensitization. *Int J Mol Sci* 15 (11): 19777-19790

Bache M, Zschornak MP, Passin S, Kessler J, **Wichmann H**, Kappler M, Paschke R, Kaluderovic GN, Kommera H, Taubert H, Vordermark D (2011) Increased betulinic acid induced cytotoxicity and radiosensitivity in glioma cells under hypoxic conditions. *Radiation Oncology* 6

Bache M, Rot S, Kessler J, Güttler A, **Wichmann H**, Greither T, Wach S, Taubert H, Soling A, Bilkenroth U, Kappler M, Vordermark D (2015) mRNA expression levels of hypoxia-induced and stem cell-associated genes in human glioblastoma. *Oncol Rep* 33 (6): 3155-3161

Güttler A, Giebler M, Cuno P, **Wichmann H**, Kessler J, Ostheimer C, Soling A, Strauss C, Illert J, Kappler M, Vordermark D, Bache M (2013) Osteopontin and splice variant expression level in human malignant glioma: Radiobiologic effects and prognosis after radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 108 (3): 535-540

Hahnel A, **Wichmann H**, Kappler M, Kotzsch M, Vordermark D, Taubert H, Bache M (2010) Effects of osteopontin inhibition on radiosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Radiation Oncology* 5

Hahnel A, **Wichmann H**, Greither T, Kappler M, Wurl P, Kotzsch M, Taubert H, Vordermark D, Bache M (2012) Prognostic impact of mRNA levels of osteopontin splice variants in soft tissue sarcoma patients. *Bmc Cancer* 12

Kessler J, Hahnel A, **Wichmann H**, Rot S, Kappler M, Bache M, Vordermark D (2010) HIF-1 alpha inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. *Bmc Cancer* 10

Kessler J, Guttler A, **Wichmann H**, Rot S, Kappler M, Bache M, Vordermark D (2015) IDH1 mutation causes a less aggressive phenotype and radiosensitizes human malignant glioma cells independent of the oxygenation status. *Radiother Oncol*

Wichmann H, Güttler A, Bache M, Taubert H, Vetter M, Wurl P, Holzhausen HJ, Eckert AW, Kappler M, Vordermark D (2014) Inverse prognostic impact of ErbB2 mRNA and protein expression level in tumors of soft tissue sarcoma patients. *Strahlenther Onkol*

Wichmann H, Güttler A, Bache M, Taubert H, Rot S, Kessler J, Eckert AW, Kappler M, Vordermark D (2014) Targeting of EGFR and HER2 with therapeutic antibodies and siRNA : A comparative study in glioblastoma cells. *Strahlenther Onkol*