

**Untersuchungen zum Einsatz von *small interfering RNAs*  
gegen *epidermal growth factor receptor*  
in humanen Gliomzellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
– Biologie und Vorklinische Medizin –  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Arabel Vollmann  
aus Tübingen  
Regensburg, 2004

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.07.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2004

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Ulrich Bogdahn

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. Ralph Witzgall (Vorsitzender)

Prof. Dr. Charalampos Aslanidis (1. Prüfer, Erstgutachten)

Prof. Dr. Ulrich Bogdahn (2. Prüfer, Zweitgutachten)

Prof. Dr. Stephan Schneuwly (3. Prüfer)

# Inhalt

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Humane Gliome.....	1
1.2 <i>Epidermal growth factor receptor</i> (EGFR).....	3
1.2.1 Funktion.....	3
1.2.2 Signaltransduktion.....	4
1.2.3 Bedeutung des EGFR in humanen Tumoren.....	7
1.2.4 EGFR-basierte Therapieansätze.....	10
1.3 RNA-Interferenz (RNAi).....	12
1.4 RNAi in Gliomen.....	15
1.5 Zielsetzung.....	16
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1 Material.....	17
2.1.1 Bezugsquellen von Substanzen.....	17
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	18
2.1.2.1 RNA-Isolierung.....	18
2.1.2.2 Agarosegele.....	18
2.1.2.3 Durchflusszytometrie.....	18
2.1.2.4 Immunzytochemie.....	18
2.1.2.5 Proteinisolierung.....	19
2.1.2.6 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
2.1.2.7 Western Blot.....	20
2.1.3 Antikörper.....	21
2.1.3.1 primäre Antikörper.....	21
2.1.3.2 sekundäre Antikörper.....	21
2.1.4 Oligonukleotide.....	22
2.1.4.1 siRNAs.....	22
2.1.4.2 Antisense-Oligonukleotide.....	22

2.1.5 Zelllinien.....	23
2.1.5.1 Humane Gliomzelllinien.....	23
2.1.5.2 Andere humane Tumorzelllinien.....	23
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	23
2.2.1.1 Kulturmedien.....	23
2.2.1.1.1 Vollmedium.....	23
2.2.1.1.2 Selektionsmedium.....	24
2.2.1.1.3 Transfektionsmedium.....	24
2.2.1.1.4 Einfriermedium.....	24
2.2.1.2 Auftauen.....	24
2.2.1.3 Passage.....	24
2.2.1.4 Kryokonservierung.....	25
2.2.1.5 Mykoplasmenbehandlung.....	25
2.2.1.6 Messung der Zellproliferation.....	25
2.2.1.6.1 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer.....	25
2.2.1.6.2 Bestimmung der Zellmasse im Kristallviolett-Assay.....	26
2.2.1.7 Zellzyklusanalyse.....	27
2.2.1.8 Kolonienbildung im Soft Agar.....	27
2.2.1.9 Adhäsion an verschiedene Matrixproteine ( <i>Attachment-Assay</i> ).....	28
2.2.1.10 Invasion und Migration ( <i>Boyden-Chamber-Assay</i> ).....	28
2.2.1.11 Transiente Transfektion mit Oligonukleotiden.....	29
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	29
2.2.2.1 Präparation von Proteinen.....	29
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	30
2.2.2.3 Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE).....	30
2.2.2.4 Western Blot.....	31
2.2.2.5 Färbung von Proteinen.....	32
2.2.2.5.1 Färbung im Polyacrylamidgel.....	32
2.2.2.5.2 Färbung auf Nitrozellulose-Membranen.....	32
2.2.2.6 Spezifischer Nachweis von Proteinen.....	32
2.2.2.6.1 Immunologischer Nachweis auf Nitrozellulose- Membranen.....	32
2.2.2.6.2 Immunologischer Nachweis in der Durchflusszytometrie.....	33

2.2.2.6.3 Immunfärbung von adhärennten Monolayern.....	34
2.2.2.6.4 Fluorimetrischer Nachweis.....	35
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.3.1 Präparation von Nukleinsäuren.....	35
2.2.3.1.1 Isolierung von RNA.....	35
2.2.3.1.2 Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel.....	35
2.2.3.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	36
2.2.3.3 Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	36
2.2.3.4 Expressionsanalyse mit Mikroarrays.....	38
2.2.3.4.1 Prinzip.....	38
2.2.3.4.2 Behandlung der Zellen und RNA-Isolierung.....	38
2.2.3.4.3 Datenanalyse.....	39
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
3.1 Anwendung von siRNAs in humanen Gliomzellen.....	42
3.1.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen.....	42
3.1.1.1 Regulation von <i>enhanced green fluorescent protein</i> in U373eGFP-Gliomzellen.....	42
3.1.1.1.1 Zelluläre Aufnahme von eGFP-siRNAs ohne Transfektion.....	42
3.1.1.1.2 Transfektion von eGFP-siRNAs.....	43
3.1.1.2 Regulation von $\beta$ -Aktin in verschiedenen Gliomzelllinien.....	46
3.1.2 Standardbedingungen für die Transfektion von siRNAs in Gliomzellen.....	47
3.2 Regulation des <i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR) durch siRNAs.....	48
3.2.1 <i>Screening</i> nach funktioneller EGFR-siRNA.....	49
3.2.2 Regulation des EGFR auf Proteinebene.....	50
3.2.2.1 Nachweis im Western Blot.....	50
3.2.2.2 Nachweis in der Durchflusszytometrie.....	53
3.2.2.3 Immunzytochemischer Nachweis.....	54
3.2.3 Regulation des EGFR auf mRNA-Ebene.....	56
3.2.4 Vergleich von siRNAs und Phosphorothioat-Antisense-Oligonukleotiden (AS-PTOs) in der EGFR-Regulation.....	58
3.2.4.1 Proteinexpression.....	58
3.2.4.2 mRNA-Expression.....	59
3.3 Auswirkung der EGFR-Regulation durch siRNAs in Gliomzelllinien.....	61

3.3.1 Zellproliferation.....	62
3.3.1.1 Proliferation nach Standardtransfektion von siRNA EGR10.....	63
3.3.1.2 Proliferation nach erhöhten Konzentrationen von siRNA EGR10.	65
3.3.1.3 Proliferation nach kombinierter Transfektion von siRNA EGR10 und siRNA EGR11.....	66
3.3.1.4 Proliferation bei Kombination von siRNA EGR10 und AG1478...	68
3.3.2 Zellzyklusanalyse.....	69
3.3.3 Kolonienbildung im Soft Agar.....	70
3.3.4 Adhäsion an unterschiedliche Proteine der extrazellulären Matrix.....	72
3.3.5 Invasion und Migration von U373 MG-Zellen.....	74
3.3.6 Einfluss auf EGFR-abhängige Signalwege.....	75
3.3.6.1 Regulation der Proteinkinase B.....	75
3.3.6.2 Regulation der MAP-Kinasen Erk1/2.....	77
3.4 Genexpressionsanalyse durch Mikroarrays.....	79
3.5 Bestätigung der Mikroarray-Daten durch quantitative <i>real-time</i> PCR (QRT-PCR)....	83
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>86</b>
4.1 Applikation von siRNAs in humanen Gliomzelllinien.....	86
4.2 Regulation des EGFR durch siRNAs.....	87
4.2.1 Identifizierung einer funktionellen EGFR-spezifischen siRNA.....	88
4.2.2 Regulation der EGFR-Expression durch spezifische siRNA EGR10.....	89
4.2.3 Vergleich von siRNA EGR10 mit EGFR-spezifischem Antisense- Oligonukleotid.....	89
4.3 Einfluss der EGFR-Regulation auf humane Gliomzellen.....	91
4.3.1 Zellproliferation.....	92
4.3.2 Motilität, Invasion und Migration.....	95
4.3.3 EGFR-abhängige Signaltransduktion.....	97
4.4 Analyse der Genexpression von Gliomzellen nach Transfektion mit EGFR spezifischer siRNA.....	104
4.4.1 Regulation von EGFR-spezifischen Transkripten.....	105
4.4.2 Reprimierte Gene.....	108
4.4.3 Induzierte Gene.....	111
4.4.4 Validierung der Mikroarrays durch quantitative <i>real-time</i> PCR.....	114

---

4.5 Ausblick.....	115
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>117</b>
<b>6. Abkürzungen.....</b>	<b>119</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>122</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>143</b>

## **I. Einleitung**

### **1.1 Humane Gliome**

Maligne Gliome stellen die häufigste Form primärer Hirntumoren im Erwachsenen dar. Ihre anatomische Lokalisation, ihr stark infiltratives Wachstum in das umgebende gesunde Hirngewebe und die Unterdrückung einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort tragen zu ihrem hochmalignen Phänotyp bei. Bei der aggressivsten Form, dem Glioblastoma multiforme (GBM) beträgt die mediane Überlebenszeit nach Diagnose nur circa 18 Monate (Castro et al., 2003).

Gliome sind Tumore glialen Ursprungs, die durch die unterschiedliche Differenzierung ihrer Zellen in astrozytäre, oligodendrogliale oder ependymale Tumoren unterteilt werden. In Abhängigkeit von ihrer Malignität werden sie in Grad I-IV des von der World Health Organization (WHO) festgelegten Klassifizierungsschemas nach Kleihues und Cavaneer eingestuft (WHO classification of tumours of the nervous system, IARC/WHO, Lyon 2000). Bei den astrozytären Gliomen lassen sich pilozytisches Astrozytom (Grad I), Astrozytom (Grad II), anaplastisches Astrozytom (Grad III) und Glioblastom (Grad IV, GBM) unterscheiden. Die Glioblastome selbst sind in zwei Kategorien unterteilbar, die primären und sekundären GBM (Kleihues und Sobin, 2000). Während primäre oder *de novo* GBM meist in älteren Patienten bereits als hochmaligne Tumore ohne vorherige Krankheitsgeschichte auftreten, entwickelt sich das sekundäre GBM im Verlauf von fünf bis zehn Jahren aus einem niedriggradigen Astrozytom. Die klinische Symptomatik ist jedoch unabhängig von der Entstehungsgeschichte in beiden Untertypen ähnlich. Histopathologisch sind sie durch die rasche Proliferation von wenig differenzierten Zellen mit erhöhter Nekrose und verstärkter Mikrogefäß-Bildung gekennzeichnet. Auf molekularer Ebene führen genetische Veränderungen zu Störungen in den gleichen Signalwegen, auch wenn die Häufigkeit mit der eine bestimmte Mutation auftritt, in primären und sekundären GBM unterschiedlich sein kann. Primäre Glioblastome sind vor allem durch die EGFR-Amplifikation, sekundäre GBM häufig durch Mutationen von p53 gekennzeichnet. Die häufigsten genetischen Marker der verschiedenen Gliome sind in Abbildung 1 zusammengefasst (Louis et al., 2002; Schlegel et al., 2001).



			<b>Primäres Glioblastom (Grad IV)</b>
			Amplifikation/Überexpression/Mutation von EGFR
			Mutation von Rb
			Amplifikation/Überexpression von MDM2
			Verlust des INK4a/ARF-Genlocus
			Verlust von PTEN
<b>Astrozytom (Grad II)</b>	□	<b>anaplastisches Astrozytom (Grad III)</b>	□
Mutation von p53		Mutation von p53	Mutation von p53
Überexpression von PDGF/PDGFR		Überexpression von PDGF/PDGFR	Überexpression von PDGF/PDGFR
		Mutation von Rb	Mutation von Rb
		Verlust von Chromosom 19q	Verlust von Chromosom 19q
			Verlust/Mutation von PTEN
			Verlust des INK4a/ARF-Genlocus
			Amplifikation von CDK4
			<b>sekundäres Glioblastom (Grad IV)</b>

#### Abb. 1: Häufigste genetische Veränderungen in Gliomen mit unterschiedlicher Malignität

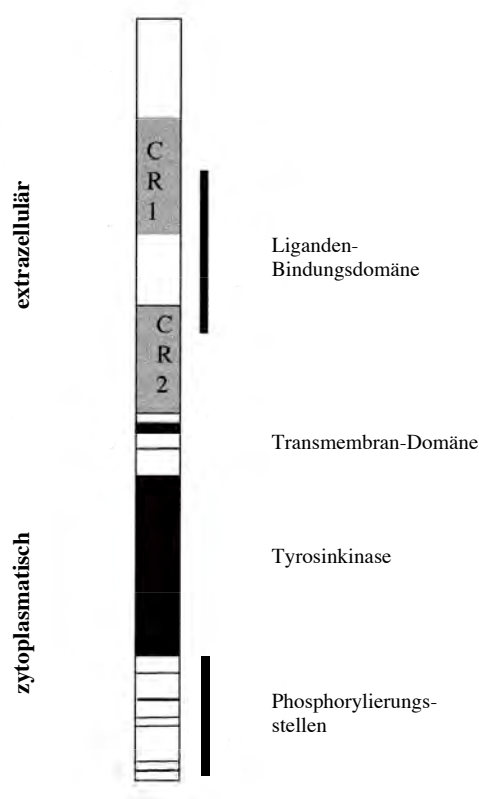
Während das primäre Glioblastom spontan entsteht, entwickelt sich das sekundäre GBM im Laufe weniger Jahre aus einem Astrozytom mit geringerer Malignität. Die unterschiedlichen Tumore sind durch distinkte Mutationen gekennzeichnet (CDK4: cyclin-abhängige Kinase 4; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; INK4a/ARF: *inhibitor of kinase 4/alternate reading frame*; MDM2: *mouse double minute 2*; PDGF/PDGFR: *platelet derived growth factor/-receptor*; PTEN: *phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome10*; Rb: Retinoblastoma-Gen).

Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR, ErbB1, HER1) ist das in Gliomen am häufigsten amplifizierte Gen, wobei die Veränderung ca. 40-50 % der hochgradig malignen Tumore mit Grad IV und nur wenige mit Grad III betrifft (Bigner et al., 1990; Ekstrand et al., 1991; Libermann et al., 1985; Wong et al., 1987). Die Häufigkeit der Amplifikation des EGFR in GBM im Vergleich zu der nur selten auftretenden Veränderung im anaplastischen Astrozytom lässt vermuten, dass durch EGFR möglicherweise die kritischen Signale für Neovaskularisation, Proliferation und Apoptoseresistenz vermittelt werden, die letztendlich die Progression zum hochgradigen GBM bewirken (Maher et al., 2001).

## 1.2 Der epidermal growth factor receptor

### 1.2.1 Funktion

Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR/HER1/ErbB1; Cohen et al., 1980) stellt den Prototyp der Transmembran-Rezeptorfamilie mit Protein-Tyrosinkinase-Aktivität (Rezeptortyrosinkinasen, RTKs) dar. Die Unterfamilie der ErbB-Rezeptoren gehört zur Klasse I der RTKs und besteht neben dem EGFR noch aus drei weiteren homologen Mitgliedern, ErbB2 (HER2/neu; Coussens et al., 1985), ErbB3 (HER3; Kraus et al., 1989) und ErbB4 (HER4; Plowman et al., 1993). Der EGFR selbst ist ein 170 kD großes Protein, bestehend aus einer stark glykosylierten extrazellulären Domäne mit der Liganden-Bindungsstelle und einer einfachen Transmembran-Domäne. Auf der zytoplasmatischen Seite befinden sich die Tyrosinkinase-Einheit sowie ein C-terminaler Abschnitt mit Bindestellen für Signalproteine (vgl. Abb. 2; Wells, 1999).



**Abb. 2: Struktur und regulatorische Einheiten des EGFR**

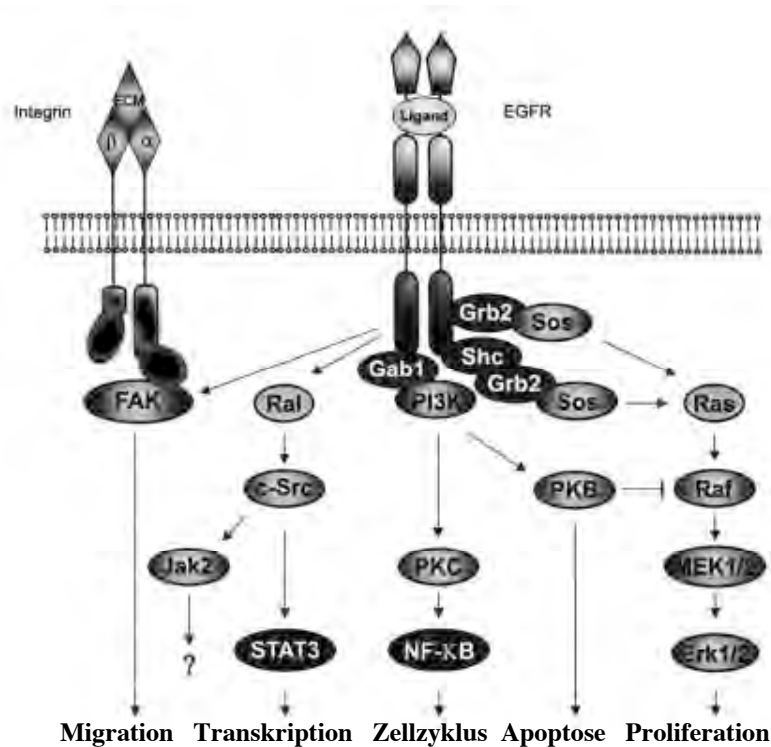
Dargestellt ist das reife, 170 kD große Protein mit seinen unterschiedlichen Domänen. Der C-terminale Abschnitt enthält Phosphorylierungsmotive, die Bindestellen für Signalproteine bilden. Außerdem liegen dort strukturelle Bereiche für Internalisierung und Transphosphorylierung des Rezeptors (CR1/2: cysteinreiche Abschnitte; verändert aus Wells, 1999).

ErbB-Rezeptoren werden in einer Reihe von Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs exprimiert. Ihre normale Funktion und die ihrer Liganden besteht vor allem in der Vermittlung von Signalen während der Embryonalentwicklung. Dies konnte durch *Knockout*-Experimente nachgewiesen werden, bei denen sich die Null-Mutation eines jeden der vier ErbB-Rezeptoren als embryonal oder perinatal letal herausstellte. Der Verlust des EGFR/ErbB1 bewirkte eine abnorme Organentwicklung in Haut, Lunge und gastrointestinalem Trakt. Im Hirn der Tiere fand man kortikale Fehlbildungen und eine verringerte Anzahl an Astrozyten (Erickson et al., 1997; Gassmann et al., 1995; Miettinen et al., 1995; Riethmacher et al., 1997; Sibilial et al., 1998; Sibilial und Wagner, 1995; Threadgill et al., 1995). Die retroviral vermittelte Überexpression des EGFR in der subventrikulären Zone führte zur vermehrten Proliferation von Stammzellen und einer verfrühten Astrozyten-Differenzierung (Burrows et al., 1997). Bei Transplantation von neuralen Stammzellen in das adulte Rattenhirn kam es bei gleichzeitiger zerebroventrikulärer Applikation von EGF nicht wie erwartet zu einer Differenzierung der Vorläuferzellen in Astrozyten, sondern zur Proliferation und ihrem Verbleib im undifferenzierten Zustand (Fricker-Gates et al., 2000). Daraus lässt sich auf eine Rolle des EGFR für Proliferation und Differenzierung glialer Zellen während der Neurogenese schließen (Burrows et al., 1997; Maher et al., 2001; Sibilial et al., 1998). Außerdem sind der EGFR und seine Liganden an der korrekten Ausbildung von Brustdrüsen und Milchgängen im Säugetier beteiligt (Fowler et al., 1995; Troyer und Lee, 2001; Xie et al., 1998) und es wurde postuliert, dass der EGFR eine Rolle bei der Regeneration von Organen (z. B. Leber) spielen könnte (Wells, 1999). Letztendlich ist aber die genaue Funktion des EGFR im adulten Vertebraten bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt.

### **1.2.2 Signaltransduktion**

Die Aktivierung der rezeptorvermittelten Signaltransduktion beginnt normalerweise mit der Bindung der jeweiligen spezifischen Liganden. Die Familie der ErbB-Liganden besteht aus *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Amphiregulin (alle Bindungspartner nur für EGFR), *heparin-binding EGF* (HB-EGF), Epiregulin,  $\beta$ -Cellulin, Epigen (jeweils mit Bindung an EGFR oder ErbB4) und den verschiedenen Neuregulinen (NRG1-4), welche mit unterschiedlichen Spezifitäten ausschließlich an

ErbB3 und ErbB4 binden. Für ErbB2/Neu konnte kein direkter Ligand nachgewiesen werden (Yarden und Sliwkowski, 2001). In Abhängigkeit von den gebundenen Liganden bilden sich Homo- oder Heterodimere zwischen den verschiedenen Rezeptoren aus, wobei der bevorzugte Bindungspartner für alle Rezeptoren ErbB2 ist (Graus-Porta et al., 1997; Tzahar et al., 1996). Die Rezeptordimerisierung kann zum einen eine Signalverstärkung bewirken, z. B. durch erhöhte Ligandenaffinität und damit verbundene verlängerte Signaldauer bei Dimerbildung mit ErbB2 (Beerli et al., 1995; Graus-Porta et al., 1995). Zum anderen kann auch die Anzahl betroffener Signalwege erhöht werden, da Unterschiede in der C-terminalen Region der Rezeptoren in der Rekrutierung verschiedener Signalmoleküle resultieren. Welche dieser Proteine mit der intrazellulären Domäne des Rezeptors interagieren, hängt davon ab, welche Phosphorylierungs-Stellen aktiviert wurden. Diese Aktivierung wird wiederum bestimmt durch den gebundenen Ligand (Autophosphorylierung) bzw. den Dimerisierungspartner (Transphosphorylierung; Olayioye et al., 1998). Es entstehen auf diese Weise Bindestellen für Proteine mit *Src-homology 2* (SH2) oder phosphotyrosin-bindenden Domänen. Diese Proteine sind entweder Adapterproteine wie Shc und Grb2 oder Enzyme wie die Tyrosinkinase Src und Abl, Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) oder Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI(3)K). Unabhängig von der Identität des gebundenen ErbB-Liganden wird bevorzugt der *mitogen activated protein kinase* (MAPK) Signalweg angeschaltet, der zur Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (Erks) Erk1/2 (p44/p42) führt. Auch der PI(3)K-abhängige Proteinkinase B (PKB)-Signalweg ist den meisten aktivierten Rezeptordimeren nachgeschaltet. Weitere, auch parallel zueinander aktivierbare Signalkaskaden sind die der Stress-aktivierten Proteinkinasen JNK (*Jun amino-terminal kinase*), der Proteinkinase C (PKC), und die Src-abhängige Aktivierung der STAT-Transkriptionsfaktoren (*signal transducers and activators of transcription*). Die Aktivierung dieser unterschiedlichen Boten-Moleküle bestimmt letztendlich die differentielle Transkription diverser Zielgene und das Auslösen zellulärer Antworten wie Proliferation, Adhäsion, Migration, Differenzierung und Apoptose (Hackel et al., 1999; Jorissen et al., 2003; Prenzel et al., 2001). Eine vereinfachte Übersicht über die verschiedenen EGFR-induzierten Signalwege zeigt Abbildung 3.



**Abb. 3: EGFR-Signaltransduktion**

Nach Aktivierung durch die Bindung spezifischer Liganden erfolgt die Dimerisierung der Rezeptoren und durch Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste der intrazellulären Domäne werden Bindestellen für unterschiedliche Effektorproteine geschaffen. Ligandenunabhängig werden Signale von Proteinen der extrazellulären Matrix integriert (Transaktivierung). Das nachgeschaltete Netzwerk von Signalen vermittelt eine Vielzahl zellulärer Antworten von Änderungen im Migrationsverhalten, in der Transkription sowie im Zellzyklus, über die Erhöhung der Überlebensraten bis hin zu verstärkter Proliferation der Zellen (c-src: *v-src sarcoma viral oncogene homolog (avian)*, ECM: extrazelluläre Matrix, Erk1/2: extrazellulär regulierte Kinasen 1/2, FAK: *focal adhesion kinase*, Gab1: *Grb2-associated binding protein 1*, Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*, Jak2: Janus Kinase 2, MEK1/2: mitogen activated protein kinase kinase 1/2, PI(3)K: Phosphatidylinositol(3)-Kinase, PKB: Proteinkinase B, PKC: Proteinkinase C, Ral: *v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)*, Raf: *v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*, Shc: *Src homology 2 domain containing transforming protein 1*; verändert aus Prenzel et al., 2001).

Neben der Verarbeitung und Weiterleitung der ligandenabhängigen Signale können auch unphysiologische Stimuli wie UV-,  $\alpha$ -Strahlung und oxidativer Stress zur EGFR-Phosphorylierung führen. Außerdem können durch das EGFR-Netzwerk Signale von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), Zytokinrezeptoren, Adhäsionsmolekülen, Ionenkanälen, Hormonen und Stressfaktoren integriert werden, was als EGFR-Transaktivierung bezeichnet wird (Carpenter, 1999; Fischer et al., 2003; Schäfer et al., 2004). Diese Transaktivierung wurde am eingehendsten an den GPCRs untersucht, deren

Aktivierung des MAPK-Signalwegs nach Bindung der jeweiligen Liganden (Lysophosphatidsäure, Thrombin oder Endothelin-1) essenziell von der Kinaseaktivität des EGFR abhängt (Daub et al., 1996). Weitere GPCR-abhängige und durch EGFR vermittelte Zellantworten beinhalten die Regulierung von Ionenkanälen, die Ausbildung von Stressfasern und die Transkription von Chemokinen (Gohla et al., 1998; Keely et al., 1998; Prenzel et al., 2001; Tsai et al., 1997; Vaingankar und Martins-Green, 1998).

Nachdem die Signalübermittlung durch EGFR-Aktivierung induziert wurde, muss sie durch spezifische Regulationsmechanismen wieder beendet werden. Die Abschaltung der ligandenabhängigen EGFR-Signalgebung beginnt mit der Ansammlung von aktivierten EGF-Rezeptoren an Membranregionen, die mit dem Oberflächenmolekül Clathrin beladen sind (*clathrin-coated pits*). Dort stülpt sich die Membran ein und bildet endozytotische Vesikel. Diese frühen Endosomen reifen zu späten Endosomen, wobei sich ihr pH-Wert ins saure Milieu verschiebt. Das führt zur Dissoziation der EGFR-gebundenen Liganden, anschließend kann es zu einem Recycling des Rezeptors zur Zelloberfläche kommen. Bleibt der Komplex bestehen, wird eine Ubiquitin-Ligase (c-Cbl) rekrutiert und die ErbB-Dimere für den Abbau in den reifen Lysosomen markiert (Sorkin, 1998). Einen Einfluss auf die Sortierung des EGFR in rückführende oder degradierende Kompartimente ist zudem vom gebundenen Dimerisierungspartner abhängig – so werden EGFR-Homodimere bevorzugt abgebaut, während Heterodimerisierung mit ErbB2 die Recyclingrate des Partner-Rezeptors erhöht. Es sollte noch hinzugefügt werden, dass bis auf EGFR alle anderen Mitglieder der ErbB-Familie nach Ligandenbindung nicht internalisiert werden (Baulida et al., 1996), so dass auch nur der EGFR eine ligandenabhängige Degradation erfährt (Wiley, 2003).

### **1.2.3 Die Bedeutung des EGFR in humanen Tumoren**

Bereits 1980, kurz nach seiner Identifizierung (Cohen et al., 1980), wurde der EGFR als möglicher Angriffspunkt für die Tumorthherapie in Betracht gezogen. Zum einen hatte man auf Tumorzellen die autokrine Stimulation von EGFR durch seinen Liganden TGF- $\alpha$  festgestellt (Sporn und Todaro, 1980). Zum anderen wurde EGFR als das humane Homolog zum viralen Onkogen v-erbB identifiziert (Downward et al., 1984). Seitdem konnte vielfach gezeigt werden, dass der EGFR in verschiedenen humanen Tumoren überexprimiert wird (unter anderem in Mamma-, Zervix-, Prostata-, Lungen-,

Kolonkarzinom, in Kopf-Hals-Tumoren und Glioblastomen). Zumeist handelt es sich hierbei um eine transkriptionelle Überexpression mit erhöhter Proteinsynthese, eine Genamplifikation ist vor allem in Glioblastomen häufig (ca. 50%; Wong et al., 1987; Wong et al., 1992). Die EGFR-Überexpression kann mit der gleichzeitigen Erhöhung der Ligandenproduktion einhergehen, was zur Entstehung autokriner Rückkopplungseffekte (positive *feedback-loops*) führen kann (Ekstrand et al., 1991). Zudem wird der EGFR-Expressionsstatus mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie in Verbindung gebracht (Chen et al., 2000; Newby et al., 1997; Sartor, 2000). Neben der Überexpression sind auch in einer Reihe von humanen Tumoren Mutationen im EGFR-Locus zu finden (Moscatello et al., 1995). Die häufigste führt durch eine Deletion in der extrazellulären Domäne zu einem trunkierten Rezeptor, der unabhängig von Liganden konstitutiv aktiv ist (EGFRvIII). EGFRvIII-exprimierende Zellen zeigen eine erhöhte Malignität *in vivo* (Nagane et al., 1996; Nishikawa et al., 1994). Nicht zuletzt wird ein therapeutischer Angriff auf den EGFR dadurch ermöglicht, dass er offensichtlich keine physiologisch essenzielle Rolle im gesunden adulten Organismus spielt (siehe auch 1.2.1). Durch die Vielzahl der von EGFR induzierten zellulären Antworten kann eine fehlregulierte EGFR-Signalgebung Tumorzellen durch Aktivierung oder Blockade unterschiedlicher Funktionen auf verschiedene Arten einen Vorteil verschaffen, die durch einen potentiellen Inhibitor antagonisiert werden könnten:

**A. Inhibition von Proliferation und Zellzyklus:** Sowohl der MAPK- als auch der PI(3)K-Signalweg über Proteinkinase B (PKB) können die Zellproliferation über die Expression von Zellzyklus-regulierenden Genen stimulieren. So kann z. B. PKB den *cyclin-dependent kinase 2* (CDK2)-Inhibitor p27<sup>KIP1</sup> hemmen (Medema et al., 2000), oder Mitglieder der Erk-Familie die Transkription von Cyclin D1 stimulieren (Conejo et al., 2002; Perry et al., 1998). Blockade des EGFR durch unterschiedliche Inhibitoren führt daher zum G<sub>1</sub>-Arrest in unterschiedlichen Tumorzelllinien (Busse et al., 2000; Moyer et al., 1997; Peng et al., 1996; Wu et al., 1996).

**B. Verstärkung der Apoptose:** Rückschlüsse auf eine Rolle des EGFR bei der Apoptose (programmierter Zelltod) ließen sich zunächst aus Experimenten mit einer Kolonkarzinom-Zelllinie ziehen, die in Kultur von EGF/TGF $\beta$  abhängig ist (Wu et al., 1995). Bei Inhibierung des EGFR mit blockierenden Antikörpern stieg hier die Apoptoserate nach

dem G<sub>1</sub>-Arrest an. Außerdem erhöhten sich Menge und Aktivität der pro-apoptotischen Proteine Bax und Caspase 8 (Liu et al., 2000; Mandal et al., 1998). Ähnliche Untersuchungen an weiteren Tumorzelllinien zeigten außerdem eine Inaktivierung bzw. Herunterregulierung des anti-apoptotischen Bcl-2 (Huang et al., 1999; Tortora et al., 1999). Vor allem der PI(3)K-Signalweg wird für anti-apoptotische Effekte in Tumorzellen verantwortlich gemacht, da mehrere Substrate der nachgeschalteten Proteinkinase B (PKB) direkt apoptotische Prozesse steuern. Beispielsweise werden durch PKB-abhängige Phosphorylierung die pro-apoptotischen Moleküle Bad (Gilmore et al., 2002) und Caspase-9 (Cardone et al., 1998) inhibiert.

**C. Inhibierung der Angiogenese:** Die Ausbildung eines neuen Gefäßsystems einschließlich der Rekrutierung bereits vorhandener Gefäße stellt einen wesentlichen Bestandteil der Tumorentwicklung dar (Fox et al., 1996; Hanahan und Folkman, 1996) und ist besonders in Glioblastomen ein Marker für den hohen Malignitätsgrad dieser Tumore (Jensen, 1998). Die ErbB-Familie und speziell der EGFR sind sowohl auf seiten der Endothelzellen (EZ), als auch auf Tumorseite an der die Neoangiogenese fördernden Modulation der Tumorumgebung beteiligt. Einerseits wird die EGFR-Expression auf den EZ durch Produktion der Liganden EGF und TGF $\beta$  durch die Tumorzellen induziert (Baker et al., 2002), andererseits ist die Expression von Angiogenese-Faktoren wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF; Potgens et al., 1995), Interleukin 8 (IL-8; Perrotte et al., 1999) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF; Goldman et al., 1993) in den Tumorzellen selbst aufreguliert. Die EGFR-Aktivierung bewirkt in Glioblastomzellen eine verstärkte Expression der VEGF-mRNA über den PI(3)K-Signalweg *in vitro* (Maity et al., 2000). Bei Inhibierung der EGFR-Signaltransduktion durch blockierende Antikörper kommt es *in vitro* und in verschiedenen Xenograft-Modellen zur deutlichen Verminderung der Gefäßdichte und einer Herabregulation pro-angiogenetischer Faktoren (Bruns et al., 2000b; Perrotte et al., 1999; Petit et al., 1997). Versuche mit EGFR-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren (siehe auch 1.2.4) führten zu einer reduzierten VEGF-Expression und einer stark verminderten Fähigkeit der EZ zur Migration in Richtung der Tumorzellen *in vitro* (Hirata et al., 2002), zum anderen konnte die Apoptose der tumorassozierten EZ *in vivo* nachgewiesen werden (Bruns et al., 2000a).

**D. Inhibition von Zellmotilität, Migration und Invasion:** Eine verschlechterte Prognose für Patienten mit EGFR-Überexpression wird unter anderem auf einen invasiveren und



stärker metastasierenden Phänotyp der Tumorzellen zurückgeführt (Salomon et al., 1995). Verschiedene EGFR-Liganden können durch autokrine Stimulation oder bei Zugabe in Zellkultur Beweglichkeit, Adhäsions- und Invasionsvermögen unterschiedlicher Tumorzellen fördern (El-Obeid et al., 1997; Price et al., 1996; Rosen und Goldberg, 1989; Shibata et al., 1996; Spencer et al., 2000). Dafür wird die Aktivität der EGFR-Kinase und deren Autophosphorylierung benötigt, trotzdem sind Zellmotilität und Zellproliferation getrennt voneinander regulierbar (Chen et al., 1994). Eine Modulation der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion durch den EGFR kann zum einen stattfinden durch die Regulation der Interaktion von epitheliale Cadherin (E-Cad) mit dem Aktingerüst der Zelle (Hazan und Norton, 1998). Zum anderen kann EGFR mit Membranrezeptoren wie den Integrinen interagieren (Miyamoto et al., 1996; Sieg et al., 2000). Für die Migration und Invasion der Tumorzellen ist außerdem die Aktivität von Proteasen unerlässlich, um die umgebende extrazelluläre Matrix abzubauen und die Basalmembranen durchdringen zu können. Von EGF und verwandten Liganden wurde gezeigt, dass sie eine verstärkte Expression der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP 9, O-Charoenrat et al., 2000; O-Charoenrat et al., 1999), der Collagenasen Typ I und IV, sowie des uPA/uPAR-Systems (Watabe et al., 1998) induzieren. Die Inhibition des EGFR mit blockierendem Antikörper bewirkte eine Herunterregulierung von MMP 9 und eine verminderte Invasionsfähigkeit der untersuchten Tumorzellen (Shao et al., 1998).

#### **1.2.4 EGFR-basierte Therapieansätze**

Die Strategien zur Inhibition des EGFR sind vielfältig. Auf der extrazellulären Seite können monoklonale Antikörper die Ligandenbindungs-Domäne blockieren und so eine Aktivierung des Rezeptors verhindern. Bispezifisch wirkende Antikörper binden an den EGFR und an Epitope auf Effektorzellen des Immunsystems, um eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu induzieren. Durch die Fusion von Toxinen an EGFR-spezifische Antikörper soll die gezielte Applikation von Zellgiften vermittelt werden.

Intrazellulär besetzen sogenannte "*small molecule*" EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (EGFR-TKIs) die ATP-Bindungsdomäne des Rezeptors entweder reversibel oder irreversibel und unterbinden dadurch die Phosphorylierung von Zielproteinen und die Signaltransduktion. Der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden verhindert die Expression

des EGFR durch Blockade seiner Transkription oder Translation (Übersicht in Arteaga, 2001; Mendelsohn, 2001; Noonberg und Benz, 2000; Woodburn, 1999).

Am weitesten in der Entwicklung fortgeschritten sind einerseits die monoklonalen Antikörper mit Erbitux ("Cetuximab", IMC-C225; Imclone Systems) und andererseits die EGFR-TKIs mit Gefitinib ("Iressa", ZD1839; AstraZeneca Pharmaceuticals) und Erlotinib ("Tarceva", OSI-774; OSI Pharmaceuticals). Alle drei Wirkstoffe befinden sich in Phase III der klinischen Studien oder haben sie bereits abgeschlossen (Blackledge und Averbuch, 2004; Janmaat und Giaccone, 2003). Gefitinib wurde im Jahr 2003 als erstes gegen den EGFR gerichtetes Therapeutikum für die Behandlung beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom zugelassen, Anfang 2004 erfolgte die Zulassung für Erbitux (Cetuximab, IMC-C225) im metastasierenden Kolonkarzinom. Die beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren befinden sich außerdem in derzeit laufenden Phase I/II-Studien zur Behandlung von Glioblastomen.

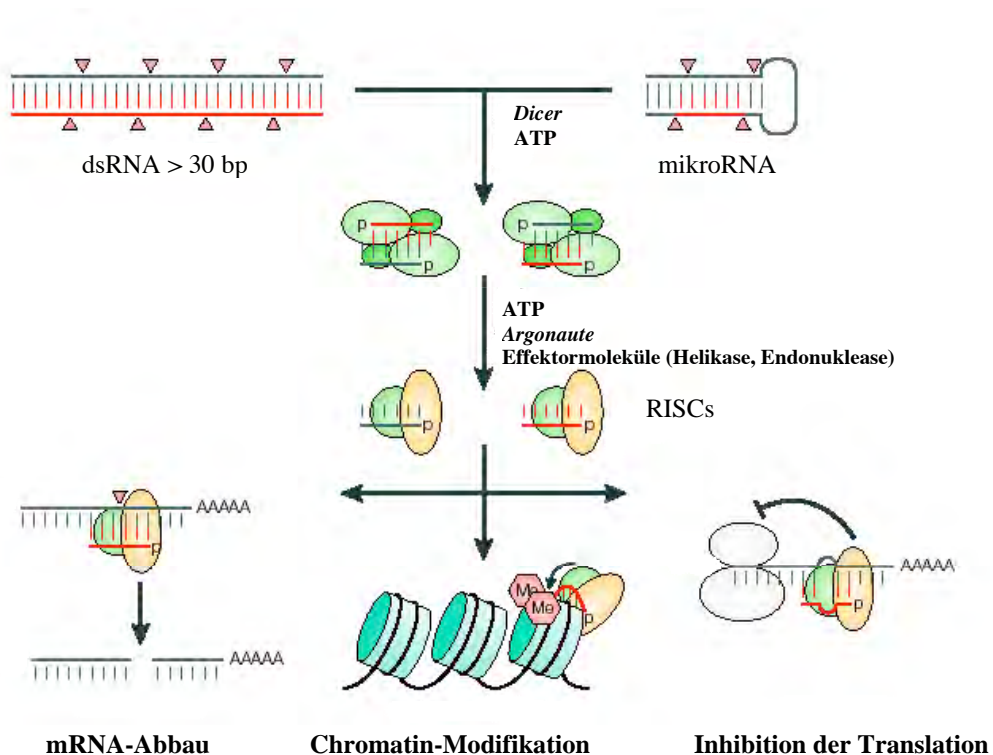
Neben der monotherapeutischen Applikation der verschiedenartigen EGFR-Inhibitoren hat sich vor allem ihre Kombination mit anderen Therapieansätzen als vielversprechend erwiesen. Der Arbeit von Aboud-Pirak et al., die gezeigt hatte, dass ein EGFR-blockierender Antikörper die zytotoxische Wirkung von Cisplatin in Zellkultur und *in vivo* verstärken konnte (Aboud-Pirak et al., 1988), folgte eine Vielzahl von Untersuchungen, in denen spezifisch gegen den EGFR gerichtete Antikörper in unterschiedlichen Tumorzelllinien und Xenograft-Modellen mit verschiedenen Chemotherapeutika (neben Cisplatin auch Doxorubicin, Taxol und Topotecan) kombiniert wurden (Baselga et al., 1993; Ciardiello et al., 1999; Fan et al., 1993; Mendelsohn und Fan, 1997). Später wurden für die *small molecule* Tyrosinkinase-Inhibitoren vergleichbare Effekte nachgewiesen (Ciardiello et al., 2000; Sirotnak et al., 2000). Sowohl Antikörper als auch kleine inhibierende Moleküle werden zudem in Kombination mit der Strahlentherapie eingesetzt und führen zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen *in vitro* und *in vivo* (Bianco et al., 2002; Bonner et al., 1994; Milas et al., 2000; Raben et al., 2002).

### **1.3 RNA-Interferenz (RNAi)**

Der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) wurde 1998 durch Fire und Mello bei Arbeiten an *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Fire et al., 1998). Dort konnte gezeigt werden, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA mit Sequenzhomologie zur mRNA eines spezifischen Gens überraschend einen sehr viel stärkeren inhibitorischen Effekt auf dessen Expression ausübte als die einzeln injizierten RNA-Stränge. Es folgten Untersuchungen mit dem Ziel, die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären, wobei die Existenz eines sequenzspezifischen Vermittlers der Inhibition postuliert wurde (Grishok et al., 2000). Einen potentiellen Kandidaten für diese Vermittlerrolle stellten kurze doppelsträngige RNA-Stücke dar, deren Existenz 1999 in einem der RNAi verwandten Mechanismus in Pflanzen (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) nachgewiesen worden war (Hamilton und Baulcombe, 1999). Die 21-25 Basenpaare (bp) langen RNA-Oligonukleotide waren aus einem langen doppelsträngigen (ds) Vorläufermolekül gebildet worden. Dieser Abbau von langer dsRNA zu kurzen Sequenzen wurde daraufhin in Zellen und Zellextrakten von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen und ihre Beteiligung an der RNAi in *Drosophila* und *C. elegans* gezeigt (Bernstein et al., 2001; Hammond et al., 2000; Parrish et al., 2000; Yang et al., 2000; Zamore et al., 2000). Es folgte der Nachweis, dass diese kurzen RNAs die Sequenzspezifität der RNA-Interferenz vermittelten und ihr Vorhandensein außerdem ausreichend war, um den mRNA-Abbau zu bewirken (Elbashir et al., 2001a; Yang et al., 2000; Zamore et al., 2000). Seither werden sie als *small* (seltener auch *short*) *interfering RNAs* (siRNAs) bezeichnet (Elbashir et al., 2001a).

Der Aufbau der siRNAs erwies sich als sehr spezifisch mit einem 19 nt bzw. 21 nt langem Duplex und 2 nt-Überhängen an den 3'-Enden beider Stränge (Elbashir et al., 2001b). Diese Struktur deutete auf einen Spaltungsvorgang der langen dsRNA zu siRNAs durch Nukleasen der RNase III-Familie hin. Ein solches Enzym wurde dann erstmalig in *Drosophila* identifiziert und *Dicer* genannt (Bernstein et al., 2001). Weitere *in vitro* Studien mit *Drosophila*-Zellen zeigten, dass nach der *Dicer*-vermittelten Generierung der siRNAs diese nach ihrer Aufwindung durch eine Helikase in einen aus mehreren Komponenten bestehenden Komplex eingebaut werden, den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC; Hammond et al., 2000). Diesem dient der *antisense*-Strang der

siRNA (Martinez et al., 2002) durch die in ihm enthaltene Sequenzinformation als "Wegweiser" für die Identifizierung und anschließende Degradierung der homologen mRNA im Zentrum der aus siRNA und mRNA bestehenden Duplexstruktur (Elbashir et al., 2001b; Nykanen et al., 2001; Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000). Obwohl einige der Proteinkomponenten von RISC identifiziert worden sind (z. B. Homologe zum *Argonaute*-Protein aus *Arabidopsis thaliana*; Hammond et al., 2001), ist deren Funktion im Komplex und dessen genaue Zusammensetzung bis heute nicht geklärt. So konnte auch die Endonuklease, die für das Schneiden der RNA verantwortlich ist, noch nicht identifiziert werden (Carmell et al., 2002; Schwarz et al., 2004). Abb. 4 zeigt ein Schema des Mechanismus der RNA-Interferenz soweit er bis heute aufgeklärt wurde.



**Abb. 4: Mechanismus der RNA-Interferenz**

In der Zelle vorliegende lange doppelsträngige (ds) RNA oder kleine haarnadelförmige mikroRNAs werden durch *Dicer* zu *small interfering RNAs* (siRNAs) prozessiert, die mit verschiedenen Effektorproteinen zu dem sog. *RNA-induced silencing complex* (RISC) assoziieren. Durch den *antisense*-Strang der siRNA wird der Komplex zu der homologen Sequenz in der Ziel-mRNA dirigiert. Das Ausmaß der Sequenzhomologie zwischen siRNA-Strang und mRNA bestimmt die vermittelte Funktion. Bei hoher Übereinstimmung findet ein Abbau der mRNA statt, bei mehreren Fehlpaarungen kommt es zu einer Blockade der Translation. Der Mechanismus der siRNA-vermittelten DNA-Methylierung ist bisher ungeklärt und in Säugerzellen noch nicht nachgewiesen worden (verändert aus: Dorsett und Tuschl, 2004).

Das Vorhandensein von verschiedenen Komponenten der RNAi wie z. B. *Dicer* in einer Vielzahl von unterschiedlichen Eukaryonten, von Pflanzen über Nematoden und Insekten bis hin zu Wirbeltieren, ließ auf einen konservierten Mechanismus schließen, von dem angenommen wird, dass er einen zellulären Abwehrmechanismus gegen mobile genetische Elemente wie Viren oder Transposons darstellt (Übersicht in Baulcombe, 2002; Hannon, 2002; Tijsterman et al., 2002; Waterhouse et al., 2001). Diese Funktion konnte in Pflanzen und Nematoden, jedoch bislang nicht in Säugerzellen nachgewiesen werden. Neben der Beteiligung an zellulären Abwehrmechanismen wurde mittlerweile deutlich, dass die an der RNA-Interferenz beteiligten Komponenten eine zentrale Rolle bei verschiedenen genregulatorischen Vorgängen spielen. Ein endogenes 21-22 Nukleotide (nt) langes, nicht-kodierendes RNA-Molekül mit regulatorischen Eigenschaften auf entwicklungsrelevante Gene wurde erstmals bei *C. elegans* beschrieben (Lee et al., 1993). Die Entdeckung eines weiteren solchen Moleküls (Reinhart et al., 2000) und die Erkenntnis, dass dieses in einer ganzen Reihe von untersuchten Tieren konserviert vorhanden ist (Pasquinelli et al., 2000), ließ den Schluss zu, dass noch mehr dieser regulatorisch wirksamen RNAs existieren könnten. Mittlerweile sind ca. 300, heute mikro-RNAs (miRNAs) genannten Moleküle in verschiedenen Organismen identifiziert worden (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee und Ambros, 2001; Mourelatos et al., 2002). miRNAs werden ebenfalls durch *Dicer* aus einem 70 nt langen Vorläufer mit Haarnadel-Struktur geschnitten und assoziieren wie siRNAs mit *Argonaute*-Proteinen zu einem Ribonukleoprotein-Komplex (miRNP) den sie zur homologen Sequenz der Ziel-mRNA dirigieren (vgl. Abb. 4). Allerdings folgt nach der Bindung an die mRNA nicht deren Abbau, sondern die Hemmung ihrer Translation (Nelson et al., 2003). Während anfangs davon ausgegangen wurde, dass siRNAs (aus aberranter dsRNA prozessiert) und endogene miRNAs (zelleigene Regulatoren) getrennte Funktionen übernehmen, weiß man heute, dass nur das Ausmaß ihrer Basenkomplementarität mit der Zielsequenz über Degradation (bei hoher Homologie) bzw. Translationsblockade (bei mehreren Fehlpaarungen) entscheidet. Eine siRNA kann also als miRNA agieren und umgekehrt (Doench et al., 2003; Hutvagner und Zamore, 2002). Neben der Regulation von mRNAs wurde außerdem eine Beteiligung von siRNAs bei der transkriptionellen Regulation durch Methylierung der DNA in Spaltheifen (Reinhart et al., 2002; Volpe et al., 2002) und Pflanzen (Zilberman et al., 2003) nachgewiesen.

Vor der Entdeckung der siRNAs wurde lange Doppelstrang-RNA (dsRNA) zum Auslösen der RNA-Interferenz verwendet. Während dies in Nematoden und in *Drosophila* zu einem spezifischen "silencing" der homologen mRNA führte, schien die RNAi in Säugerzellen zunächst nicht anwendbar zu sein. Hier führte dsRNA mit einer Länge von mehr als 30 Basenpaaren zu einer Aktivierung von Interferon sowie den Interferon-induzierten Proteinen PKR (dsRNA-abhängige Proteinkinase R) und Oligoadenylatsynthetase, deren Produkte RNase L aktivieren. Dadurch kam es zu einer unspezifischen Hemmung der Translation in der betroffenen Zelle und zum apoptotischen Zelltod (Übersicht in Gil und Esteban, 2000; Williams, 1999). Erst durch die Einführung von kurzen synthetischen siRNAs von etwa 21 nt Länge konnte die RNAi in verschiedenen Säugerezelllinien nachgewiesen werden (Elbashir et al., 2001a).

#### **1.4 RNAi in humanen Gliomen**

Derzeit existiert für hochgradige Gliome keine kurative Therapie. Die Behandlung besteht aus einer Kombination von Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. Trotz technischer Fortschritte in diesen Bereichen hat sich die Prognose für betroffene Patienten in den letzten Jahrzehnten kaum verbessert (Castro et al., 2003). Durch die in den letzten Jahren gewonnenen molekular- und zellbiologischen Erkenntnisse und durch die Untersuchung krankheitsbedingter Veränderungen auf genomischer Ebene durch Array-Technologien ist jedoch das Wissen um die molekularen Grundlagen der Tumorentstehung enorm gewachsen. Die Inhibition der Neoangiogenese, die Induktion der Apoptose in den Tumorzellen und die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems stellen neuartige Strategien dar, um die Behandlung von malignen Gliomen zu verbessern. Gentherapeutische Ansätze beinhalten beispielsweise die Verwendung verschiedener viraler und nicht-viraler Vektoren zur funktionellen Wiederherstellung von Tumorsuppressorgenen, zur Abschaltung von Onkogenen oder zum Einbringen sogenannter "Selbstmordgene" in die Zellen (Übersicht in Alemany et al., 1999; Fueyo et al., 1999; Shir und Levitzki, 2001). Der Einsatz von spezifischen Antisense-Oligonukleotiden zur Blockade der Expression relevanter Gene in Gliomen wird derzeit in einer klinischen Phase II-Studie der Neurologischen Klinik des Bezirksklinikums

Regensburg am Beispiel des immunsuppressiven *transforming growth factor*  $\square$  II (TGF $\square$  II) untersucht (Bogdahn et al., 2004).

Trotz dieser Neuentwicklungen liegt bei den malignen Gliomen die 5-Jahres-Überlebensrate bis heute unverändert bei unter 5 %. Deswegen besteht die dringende Notwendigkeit, neue Substanzen und Therapieformen gegen diese Tumoren zu entwickeln. *Small interfering RNAs* stellen neben Antisense-Oligonukleotiden und Ribozymen eine neue Substanzklasse von Molekülen auf Nukleinsäurebasis dar. Ihre hohe Spezifität und Effizienz machen sie jedoch für die gezielte therapeutische Anwendung besonders interessant und lassen daher ihre Etablierung als weiteres Werkzeug in der Behandlung primärer ZNS-Tumoren lohnenswert erscheinen.

## **1.5 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die zu Beginn noch völlig neuartige Methode des Einsatzes von *small interfering RNAs* in Säugerzellen zur Vermittlung der RNA-Interferenz auf ihre mögliche Anwendung in humanen Glioblastomzellen zu untersuchen und diese zu optimieren.

Im nächsten Schritt sollte eine gegen den in malignen Gliomen häufig überexprimierten oder mutierten *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gerichtete siRNA-Sequenz identifiziert werden, die spezifisch die Boten-RNA des Rezeptors abbauen und somit die Expression des Proteins herunterregulieren sollte.

Die Auswirkungen dieser negativen Regulation eines in Glioblastomen potentiell relevanten Gens auf das Wachstumsverhalten der Zellen, sowie auf weitere Parameter die den malignen Phänotyp dieser Tumore bestimmen, sollte zunächst in der Zellkultur untersucht werden. Bei erfolgversprechenden Resultaten sollte dann die Wirksamkeit der EGFR-siRNA im Tiermodell überprüft werden.

Die durch die spezifische Regulation des EGF-Rezeptors ausgelösten Veränderungen in der Genexpression der untersuchten Gliomzellen wurden mit Hilfe von Mikroarray-Analysen untersucht.

## **II. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Bezugsquellen von Substanzen**

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Bio-Rad, München
AG 1478	Calbiochem, Bad Soden
Agar Noble	Difco/Becton Dickinson, Heidelberg
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
APS	Bio-Rad, München
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
BME-Vitamine	Biochrom, Berlin
Brilliant Blue G (Coomassie)	Sigma, Steinheim
BSA	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
DAPI	Roche, Mannheim
DEPC	Sigma, Steinheim
DL-Norleucin	Sigma, Steinheim
EDTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure (99,7 %)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Geneticin®	Invitrogen, Karlsruhe
Glutardialdehyd	Sigma, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Steinheim
Poly-L-Lysin	Sigma, Steinheim
SDS	Boehringer, Mannheim
TEMED	Bio-Rad, München
Tris	USB, Cleveland USA
TritonX-100	Sigma, Steinheim
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Linz, Österreich

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p. a. – Qualität bezogen.



## 2.1.2 Puffer und Lösungen

### 2.1.2.1 RNA-Isolierung

DEPC-H <sub>2</sub> O	DEPC	0,1 % (v/v)
-----------------------	------	-------------

DEPC wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> unter Rühren 2 h bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei RT.

### 2.1.2.2 Agarosegele

TBE-Puffer	Tris	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA pH 8,0	20 mM
Gelauftragspuffer (10x)	Glycerin	50 % (v/v)
	EDTA pH 8,0	10 mM
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Xylencyanol	0,2 % (w/v)

### 2.1.2.3 Durchflusszytometrie

PBS-Puffer (10x)	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	43 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,7 mM

### 2.1.2.4 Immunzytochemie

TBS-Puffer	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt und der Puffer bei 4°C gelagert.

TBS-T	TritonX-100	0,1 % (v/v)
-------	-------------	-------------

TritonX wurde in TBS-Puffer aufgenommen.

Fischhaut-Gelatine-Puffer (FGB)	BSA	1 % (w/v)
	Fischhaut-Gelatine	0,2 % (w/v)
	Triton X-100	0,1 % (v/v)

Die Zusätze wurden in TBS-Puffer gelöst.

#### 2.1.2.5 Protein-Isolierung

Denaturierender Lysepuffer	SDS	1 % (w/v)
	Tris-Cl pH 7,4	50 mM
	EDTA	5 mM
	Protease-Inhibitor-Cocktail	1 mM

Der Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und jedes Mal frisch zugegeben.

#### 2.1.2.6 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngelpuffer	Tris pH 8,8	1,875 M
----------------	-------------	---------

Einstellung des pH-Werts auf 8,8 und Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

Sammelgelpuffer	Tris pH 6,8	1,25 M
-----------------	-------------	--------

Einstellung des pH-Werts auf 6,8 und Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

Laufpuffer (5x) (Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer nach Lämmli)	Tris-Base	25 mM
	Glycin	250 mM
	SDS	0,5 % (v/v)

Einstellung des pH-Werts auf 8,3 und Lagerung bei RT.

Probenauftragspuffer (5x)	Tris pH 6,8	60 mM
	Glycerol	25 % (v/v)
	SDS	4 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	715 mM
	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)

Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

### 2.1.2.7 Western Blot

Kathodenpuffer	1 M Tris pH 9,4	2,5 % (v/v)
	DL-Norleucin	40 mM

Anodenpuffer A	1 M Tris pH 10,4	2,5 % (v/v)
	Methanol	20 % (v/v)

Anodenpuffer B	1M Tris pH 10,4	30 % (v/v)
	Methanol	20 % (v/v)

Alle Puffer wurden bei 4°C gelagert.

T-PBS	Tween-20	0,01 % (v/v)
	PBS	

Blockierungspuffer	Magermilch	5 % (w/v)
	T-PBS	

Ponceau S – Lösung	Ponceau S	0,15 % (w/v)
	Essigsäure	6 % (v/v)

Coomassie-Lösung	Brilliant Blue G (Coomassie)	2,5 % (w/v)
	Methanol	45 % (v/v)
	Eisessig	10 % (v/v)

Die Lösung wurde filtriert und bei RT aufbewahrt.

Entfärbelösung für Coomassie-Färbung	Methanol	30 % (v/v)
	Eisessig	10 % (v/v)

### 2.1.3 Antikörper

#### 2.1.3.1 Primäre Antikörper

gt □ EGFR (WB)	1 µg/ml	R&D Systems, Minneapolis, USA
ms □ EGFR (Biotin-Konjugat; FC)	1:50	Cymbus Biotechnology, Hants, UK
rbt □ EGFR (IC)	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
rbt □ phospho-EGFR (WB, IC)	250 ng/ml	BD Transduction Laboratories, San Diego, USA
ms □ □-Aktin	1:5000	Sigma, Steinheim
ms □ GFP	1:1000	Chemicon, Hofheim
rbt □ p44/p42 MAPK (Erk1/2)	1:1000	New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Frankfurt/M
rbt □ phospho-p44/p42 MAPK (Erk1/2)	1:1000	New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Frankfurt/M
rbt □ PKB	1:1000	New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Frankfurt/M
rbt □ phospho-PKB	1:1000	New England Biolabs, Cell Signaling Technology, Frankfurt/M

**Tab. 1: Primäre Antikörper**

Zusammenstellung der verschiedenen primären Antikörper und eingesetzten Konzentrationen (EGFR: *epidermal growth factor receptor*; Erk1/2: extrazellulär regulierte Kinase 1/2; FC: Durchflusszytometrie; GFP: *glial fibrillary acidic protein*; gt: Ziege; IC: Immunzytochemie; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; ms: Maus; PKB: Proteinkinase B; rbt: Kaninchen; WB: Western Blot).

#### 2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

gt □ mouse - HRP	1:5000	Chemicon, Hofheim
rbt □ gt - HRP	1:5000	Chemicon, Hofheim
dky □ rbt - RhoX	1:500	Jackson Immuno Research, West Grove, USA
dky □ ms - FITC	1:100	Jackson Immuno Research, West Grove, USA

**Tab. 2: Sekundäre Antikörper**

Verwendete sekundäre Antikörper mit Angabe der Verdünnung (dky: Esel; HRP: Meerrettichperoxidase; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; RhoX: Rhodamin X).

Die IgG-Isotyp-Kontrollen stammten von den Herstellern des jeweiligen primären Antikörpers. Das Streptavidin-Cy5-Konjugat als Nachweis-Reagenz für den biotinylierten Antikörper in der Durchflusszytometrie stammte von Jackson Immuno Research (West Grove, USA) und wurde in der Verdünnung 1:50 verwendet.

## 2.1.4 Oligonukleotide

### 2.1.4.1 siRNAs

EGR10	5'-GUUAAAAUCCCGUCGCUAUC-3' 3'-UUCAAUUUUAAGGGCAGCGAUAG-5'
EGR11	5'-CAGCAUGUCAAGAUCACAGAU-3' 3'-GCGUCGUACAGUUCUAGUGUCUA-5'
EGR12	5'-GUUmAAAmUCCmGUCmCUAUC-3' 3'-UUCAAUUUUAAGGGCAGCGAUAG-5'
□-Aktin (Harborth et al., 2001)	5'-CCUCCCUGGAGAAGAGCUAdTdT-3' 3'-dTdTGGAGGGACCUCUUCUCGAU-5'

**Tab. 3: Verwendete siRNAs**

EGR10, EGR11: spezifisch gegen den *epidermal growth factor receptor* gerichtete Sequenzen (Accession: NM\_005228; EGR10: Position 2458-2478; EGR11: Position 2791-2811); EGR12: Kontroll-siRNA mit vier Fehlpaarungen (*mismatches*, m) zur Sequenz von EGR10.

### 2.1.4.2 Antisense-Oligonukleotide

AS02 (Li et al., 2002)	5'-CCCCAGCAGCTCCCATTGGG-3'
AS-K	5'-GGCCCATTTGGCCACCCGGAT-3'

**Tab. 4: Verwendete Antisense-Oligonukleotide**

AS02: spezifisch gegen den *epidermal growth factor receptor* gerichtete Sequenz; AS-K: Kontrollsequenz mit gleicher Basenzusammensetzung wie AS02, aber veränderter Abfolge (*scrambled*).

Alle Antisense-Oligonukleotide waren durchgehend phosphorthioat-modifiziert (AS-PTOs). Die Sequenz des AS-K-Oligos wurde als *scrambled control* mit der gleichen Basenzusammensetzung wie das spezifische Oligo AS02 entworfen und durch eine BLAST-Suchabfrage als nicht homolog zu bekannten Sequenzen bestätigt.

### **2.1.5. Zelllinien**

#### **2.1.5.1 Humane Gliomzelllinien**

Die stabil *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) exprimierenden U373-Zellen (U373eGFP) wurden von Dr. Susanne A. Kuhn (Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) mit einem pEGFP-N1-Vektor (Clontech, Palo Alto, USA) transfiziert und uns freundlicherweise von Dr. Roland Goldbrunner (Institut für Neurochirurgie, LMU München) zur Verfügung gestellt. Die U373 MG-Zellen stammten aus den Zellkulturbeständen der Neurologischen Klinik der Universität Regensburg. Die Linie LN 18 wurde bei der American Type Culture Collection (ATCC) kommerziell erworben (ATCC-Nr. CRL-2610).

#### **2.1.5.2. Andere humane Tumorzelllinien**

Die Zelllinie A431 (epidermales Karzinom) wurden bei der American Type Culture Collection kommerziell erworben (ATCC-Nr. CRL-1555).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Kulturmedien**

##### **2.2.1.1.1 Vollmedium**

Alle Gliomzelllinien sowie die epidermale Karzinomzelllinie A431 wurden in DMEM mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 5 % (v/v) nicht-essenziellen Aminosäuren (NEA) und 5 % (v/v) Vitaminlösung (alle Biochrom AG, Berlin) ohne Zugabe von Antibiotika kultiviert.

#### 2.2.1.1.2 Selektionsmedium

Um sicherzustellen, dass die stabil transfizierten U373-eGFP-Zellen den eGFP-Expressionsvektor mit Neomycin-Resistenzgen in Kultur nicht verlieren, wurde dem DMEM-Medium 1,2 mg/ml G-418 Sulfat (Geneticin®, Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt.

#### 2.2.1.1.3 Transfektionsmedium

Für die Transfektion der Zellen wurde serumreduziertes Optimem®-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

#### 2.2.1.1.4 Einfriermedium

Für die Kryokonservierung wurde Vollmedium mit 10 % (v/v) DMSO versetzt und sterilfiltriert. Das Einfriermedium wurde frisch hergestellt und sofort verwendet.

#### 2.2.1.2 Auftauen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 3 ml Vollmedium aufgenommen und resuspendiert. Zur Entfernung des DMSO-haltigen Einfriermediums wurden die Zellen 5 min bei 800 rpm abzentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Zellen wurden in Vollmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Nach einer Inkubation von 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Alle Zellen wurden standardmäßig bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 2.2.1.3 Passage

Um eine kontinuierliche Proliferation der Zellen zu gewährleisten, wurden adhärente Zellen bei Erreichen von 95-100 % Konfluenz in der Kulturflasche passagiert. Dazu wurden die Zellen nach vollständigem Absaugen des Mediums einmal mit DPBS-Puffer (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) gewaschen. Danach erfolgte das Ablösen der Zellen durch Zugabe von 2-5 ml Trypsin/EDTA und 5-10 min Inkubation bei 37°C. Nach Kontrolle des Ablösevorgangs im Mikroskop wurden die Zellen in 10-20 ml Vollmedium aufgenommen und bei 800 rpm für 5 min in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Corning, Costar,

Bodenheim) abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen durch Zugabe von 1-10 ml Vollmedium und mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in Einzelzellsuspension gebracht und anschließend in der gewünschten Verdünnung in ein neues Kulturgefäß mit vorgelegtem Medium überführt.

#### 2.2.1.4 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung der Zellen wurde zunächst wie unter 2.2.1.3 beschrieben verfahren. Nach der Zentrifugation wurde Einfriermedium zu dem Zellpellet gegeben und eine Einzelzellsuspension hergestellt, die rasch auf 2 ml-Kryoröhrchen (Corning, Costar, Bodenheim) verteilt wurde. Pro Röhrchen wurden ca.  $2 \times 10^5$  Zellen aliquotiert. Das anschließende Einfrieren der Zellen erfolgte zunächst für 24 h in einem Kryobehälter (Nalgene, Hereford, Großbritannien) mit einer Abkühlrate von ca.  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  bei  $-80^\circ\text{C}$ . Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.1.5 Mykoplasmen-Behandlung

Alle in Kultur gehaltenen Zellen wurden regelmäßig auf Kontamination mit Mykoplasmen-Bakterien mit Hilfe eines PCR-Verfahrens (VenorGem®; Minerva Biolabs, Berlin) untersucht. Befallene Kulturen wurden entweder entsorgt oder isoliert und mit einer Antibiotika-Kombination nach Angaben des Herstellers (BM-Cyclin, Roche Diagnostics, Mannheim) behandelt.

#### 2.2.1.6 Messung der Zellproliferation

##### 2.2.1.6.1 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Kultur wurden die Zellen zunächst wie unter 2.2.1.3 beschrieben in Einzelzellsuspension gebracht. Ein Aliquot wurde mit vier Teilen einer 0,5 %igen Trypanblau-Lösung versetzt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm x 0,0025 mm pro Kleinstquadrat) durch Auszählen von mindestens vier Großquadraten bestimmt. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl nach folgender Formel berechnet:



$$\text{Anzahl der Zellen/Quadrat} \times 5 \text{ (Verdünnung)} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Da ausschließlich tote Zellen durch Trypanblau angefärbt werden, ließ sich der Prozentsatz an lebendigen Zellen in der Kultur bestimmen:

$$\text{ungefärbte Zellen}/(\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen}) \times 100 = \% \text{ lebende Zellen}$$

#### 2.2.1.6.2 Bestimmung der Zellmasse im Kristallviolett-Assay

Die Bestimmung der Zellmasse als Maß für die Proliferation und Viabilität der untersuchten Zellen erfolgte mit Hilfe des Kristallviolett Assays (Bernhardt et al.,1992). Hierfür wurde am Versuchsende das Medium aus den 96-*well*-Zellkulturplatten abgenommen und die Zellen durch Zugabe von 100 µl einer frisch hergestellten, 1,25 %igen Glutardialdehydlösung für 15 bis 20 min bei RT fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgenommen und durch 180 µl PBS ersetzt. Die Platten konnten nun bei 4°C gelagert oder sofort gefärbt werden. Dazu wurde das PBS gegen 100 µl einer 0,02 %igen Kristallviolettlösung ausgetauscht. Nach genau 30 min wurde die Farblösung abgeschüttet, es folgten mehrere Waschschriffe mit entionisiertem Wasser zur Entfernung überschüssigen Farbstoffs. Nach dem letzten Waschschriff wurde das Wasser mind. 10 min auf den Zellen belassen, anschließend wurden die Platten auf Zellstoff kräftig trocken geklopft. Um bei der nachfolgenden photometrischen Messung Streulichteffekte zu vermeiden, wurde das v. a. an Nukleoproteine bindende Kristallviolett durch Zugabe von 180 µl 70 %igen Ethanol und anschließendes Schütteln für 2-3 h auf einem Titramax 1000-Schüttler (Heidolph, Schwabach) wieder in Lösung gebracht. Danach erfolgte die Messung der Absorption in einem Plattenlesegerät (Emax precision microplate reader, Molecular Devices, München) bei 578 nm und die Auswertung durch das SOFTmax<sup>®</sup>-Programm (Molecular Devices).

### 2.2.1.7 Zellzyklus-Analyse

Für die einparametrische Zellzyklusanalyse im Durchflusszytometer durch DNA-Färbung mit Propidiumiodid (PI) wurden die Zellen abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und anschließend in 70 % Methanol (MetOH) für mindestens 1 h fixiert (es war auch eine tagelange Aufbewahrung der Zellen in MetOH möglich). Die Zelldichte sollte bei  $10^6$  Zellen/ml liegen. Für die DNA-Färbung wurden die Zellen dann zweimal mit PBS gewaschen und dann in PBS aufgenommen, wobei die Dichte von  $10^6$  Zellen/ml beibehalten wurde. Da PI in jede doppelsträngige Nukleinsäure interkaliert, erfolgte anschließend ein Verdau der RNA (0,1 mg/ml RNase f. c.) für 20 min bei 37°C. Zuletzt wurde das Propidiumiodid in einer Endkonzentration von 50 µg/ml dazugegeben, der Ansatz für wenige Minuten inkubiert und am FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) vermessen, wobei mindestens  $5 \times 10^4$  Zellen in die Bestimmung gingen. Die Datenerfassung erfolgte durch CellQuest Software (BD Biosciences), die anschließende Auswertung durch das Programm MultiCycle für Windows (Phoenix Flow Systems, San Diego, USA).

### 2.2.1.8 Kolonienbildung im Soft Agar

Um die Fähigkeit der Gliomzellen zu untersuchen, Kolonien in halbfesten Medien zu bilden, wurden die Vertiefungen einer 6-well-Platte mit 1 ml DMEM + 1 % FCS + 1 % Low Melting Agar (Agar Noble, Difco, Heidelberg) beschichtet und die Flüssigkeit ün verfestigt. Am nächsten Tag wurden je  $10^4$  Zellen in 2 ml DMEM + 1 % FCS + 0,5 % Agar suspendiert, in die vorbereiteten wells pipettiert und nach Festwerden des Mediums mit 1 ml DMEM + 1 % FCS und gegebenenfalls den Zusätzen überschichtet. Einmal pro Woche wurde das Medium im Überstand gewechselt, ohne jedoch erneut Zusätze hinzuzufügen. Nach fünfwöchiger Inkubation bei 37°C wurde die Zellproliferation durch Auszählen der gebildeten Kolonien bestimmt. Hierfür wurden je Kulturgefäß (einzelne Vertiefung einer 6-well-Platte) 12 Kleinquadrate mit 0,5 cm Seitenlänge bei 25-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Fluovert, Leica, Bensheim) ausgezählt. Die fotografische Dokumentation der Kolonien erfolgte durch das angeschlossene Videokamerasystem (CCD-Iris, Sony, Köln) und die NIH Image Software (U.S. National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

### 2.2.1.9 Adhäsion an verschiedene Matrixproteine (*Attachment-Assay*)

Für die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens wurde von einer subkonfluenten Zellkultur das Medium abgenommen, die Zellen wurden einmal mit 10 ml DPBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber (Costar, Corning, USA) vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Für den anschließenden Assay wurde eine Zellzahl von  $2 \times 10^4$  Zellen/ml in DMEM + 5 % FCS eingestellt. Es wurde der CytoMatrix Screen Kit (Chemicon, Hofheim) verwendet, bei dem 96-*well*-Platten mit fünf verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet worden waren. 100 µl der Zellsuspension wurden in jede Vertiefung eingebracht, und die Platten 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand mit den nicht adhären Zellen abgenommen und in eine normale 96-*well*-Zellkulturplatte überführt. Die nach Ablauf der Inkubationszeit am Boden haftenden Zellen wurden nach Angaben des Herstellers gewaschen, mit Kristallviolett gefärbt und anschließend gezählt. Die Zellen in der zweiten Platte wurden bis zu ihrer Anheftung am Boden weiter inkubiert und im Anschluss analog zu den anderen Zellen behandelt, so dass der Vergleich der jeweiligen Zellmassen als Kontrolle herangezogen werden konnte.

### 2.2.1.10 Invasion und Migration (*Boyden-Chamber-Assay*)

Die zu untersuchenden Zellen wurden abtrypsinisiert, in serumfreiem Medium gewaschen und auf die gewünschte Zellzahl von  $2 \times 10^5$ /ml eingestellt.

105 µl konditioniertes Fibroblastenmedium wurden in das untere Kompartiment der Kammer (Blind *Well* Chamber, Costar, Corning, USA) vorgelegt, ein unbeschichteter Filter (Nuclepore Track Etch Membrane; Durchmesser 13 mm, Porengröße 8 µm; Whatman, Clifton, USA) wurde luftblasenfrei aufgelegt und der Aufsatz aufgeschraubt. Danach wurde das Matrigel® (Matrigel® Membrane Matrix, Becton Dickinson, Bedford, USA) 1:3 mit eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt und sofort auf Eis gestellt. 26 µl verdünntes Matrigel wurden möglichst rasch luftblasenfrei auf den Filter pipettiert, es folgte eine Inkubation der Kammer für 30 min bei 37°C. Im Anschluss wurden 200 µl der Zellsuspension in die Kammer eingefüllt und 24 h bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Suspension abgekippt, die abgenommenen Filter wurden auf der Oberseite, auf der sich die nicht gewanderten Zellen befanden, vorsichtig abgewischt und mit der Unterseite nach oben in einen befeuchteten

Färberahmen gelegt. Danach erfolgte die Färbung der Zellen durch die Hemacolor®-Schnellfärbung, wobei der Färberahmen jeweils 1 min in Fixierlösung, rote Färbelösung und blaue Färbelösung (Hemacolor®, Merck, Darmstadt) getaucht wurde. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in Leitungswasser. Die Filter wurden aus dem Rahmen entnommen, kurz in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  getaucht und mit der Oberseite nach unten auf einen Objektträger aufgelegt.

Das Auszählen der Zellen erfolgte an einem Leica-Mikroskop (Leitz DM IL, Leica, Solms) bei 125-facher Vergrößerung, wobei 5 Felder pro Filter ausgezählt wurden. Jede Bestimmung wurde dreifach durchgeführt.

#### 2.2.1.11 Transiente Transfektion von Oligonukleotiden

Die zu transfizierenden Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturgefäß in unterschiedlicher Dichte ausgesät. Die *small interfering RNAs* (siRNAs) oder Phosphorthioat-Oligonukleotide (PTOs) wurden in Transfektionsmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt, mit unterschiedlichen Transfektionsmitteln, auf Lipofektion oder Kopräzipitation basierend, nach Angaben der jeweiligen Hersteller inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 6-stündiger Inkubation wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch frisches Vollmedium (DMEM + 10 % FCS) ersetzt.

### **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

#### 2.2.2.1 Präparation von Proteinen

Für die Isolierung des Gesamtproteins aus der Zellkultur wurde das Kulturgefäß auf Eis gestellt, das Medium abgenommen und die Zellen wurden einmal mit eiskaltem DPBS gewaschen. In Abhängigkeit von der Größe des Gefäßes und der Zelldichte wurde anschließend eiskalter denaturierender Lysepuffer (vgl. 2.1.2.5) direkt auf die Zellen gegeben und für ca. 1 min dort belassen. Bei Volumina von mehr als 500  $\mu\text{l}$  wurde das Lysat zur Scherung der DNA zwei-dreimal durch eine sterile Injektionskanüle (BD

Microlance 20 ga., Becton Dickinson, Bedford, USA) auf- und abpipettiert. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde bestimmt durch einen kolorimetrischen Test basierend auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  durch die Peptidbindungen von Proteinen und die anschließende Chelatbildung mit Bichinonsäure, bei der ein wasserlöslicher purpurfarbener Komplex entsteht. Es wurde ein mit den in dem Lysepuffer enthaltenen Detergenzien kompatibler Assay mit 96-*well*-Mikrotiterplatten nach Angaben des Herstellers verwendet (BC Assay, Uptima/Interchim, Montlucon Cedex, Frankreich), wobei die aufgetragene Probenmenge von 25  $\mu\text{l}$  auf 5  $\mu\text{l}$  reduziert wurde. Die Messung der Farbreaktion erfolgte in einem ELISA-Plattenlesegerät (Emax precision microplate reader, Molecular Devices, München) bei 590 nm, die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe des SOFTmax<sup>®</sup>-Programms (Molecular Devices).

#### 2.2.2.3 Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

Die Auftrennung denaturierter Proteine erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurde die Porengröße des Trenngels durch Veränderung der Polyacrylamid (PAA)-Konzentration zwischen 8 % und 12 % variiert. Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte in einer Protean II Elektrophorese-Kammer (Mini Protean II Cell, Bio-Rad, Hercules, USA) mit Glasplatten von 7,3 cm x 10,2 cm (innere Glasplatte) bzw. 8,3 cm x 10,2 cm (äußere Glasplatte) Größe und 0,75 mm Abstandshaltern. Die Lysatproben wurden mit Auftragspuffer (vgl. 2.1.2.6) versetzt und für 6 min im Wasserbad aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 115 V bei maximaler Stromstärke, nach Einwandern der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 140 V erhöht. Der Lauf wurde beendet, wenn der mitgeführte Proteinstandard (Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards, Bio-Rad, München) eine ausreichende Auftrennung anzeigte. Das Gel konnte anschließend gefärbt oder direkt für den Proteintransfer auf Membranen verwendet werden.

	Trenngel 8 % Vol. (ml)	10 % Vol. (ml)	12 % Vol. (ml)	Sammelgel 5 % Vol. (ml)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	4,6	4,0	3,3	3,4
Acrylamid/Bisacrylamid	2,7	3,3	4,0	0,83
Trenngelpuffer	2,5	2,5	2,5	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	0,63
10 % SDS	0,1	0,1	0,1	0,05
10 % APS	0,1	0,1	0,1	0,05
TEMED	0,006	0,004	0,004	0,005

**Tab. 5: Zusammensetzung der verschiedenen Gelkomponenten der SDS-PAGE**

#### 2.2.2.4 Western Blot

Um Proteine von einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose (NC)-Membran zu transferieren, wurde die "*semi-dry*"-blotting Methode angewendet. Zwischen die zwei Graphitplatten der Immunoblot-Transferapparatur (Renner GmbH, Darmstadt) wurden zunächst auf die untere Platte (Kathode) sechs in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere (Quickdraw® medium thickness, Sigma, Steinheim) gelegt, darauf das der SDS-PAGE entnommene Gel, wobei das Sammelgel vorher abgetrennt wurde. Auf das Gel folgte die NC-Membran (Protran BA85, Schleicher & Schuell, Dassel), dann weitere drei Filterpapiere, die ebenso wie die Membran in Anodenpuffer A getränkt wurden. Abschließend wurden sechs mit Anodenpuffer B befeuchtete Filterpapiere aufgelegt. Sowohl die Filterpapiere als auch die NC-Membran waren vorher auf die Größe des Gels zugeschnitten worden. Auf die letzte Lage Filterpapier wurde die obere Graphitplatte (Anode) gelegt und der Transfer bei konstant  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche durchgeführt.

#### 2.2.2.5 Färbung von Proteinen

##### 2.2.2.5.1 Färbung im Polyacrylamid-Gel

Um den vollständigen Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran zu überprüfen, wurde im Anschluss an den Immunoblot das Gel in Coomassie-Lösung gelegt und unter

Schwenken auf einem Universalschüttler (WS-10, Edmund Bühler, Hechingen) für ca. 30 min gefärbt. Danach erfolgte ein Waschschrift in Entfärbungslösung für 2-3 h.

#### 2.2.2.5.2 Färbung auf Nitrozellulose-Membranen

Einen Hinweis auf den gleichmäßigen Auftrag an Proteinmenge lieferte die Färbung der transferierten Proteine auf der Nitrozellulose (NC)-Membran. Hierfür wurde die Membran ca. 10 min in Ponceau S-Lösung (vgl. 2.1.2.7) geschwenkt und der Hintergrund anschließend sofort durch Waschen mit  $H_2O_{\text{bidest}}$  entfärbt. Der Transfererfolg konnte so bei Bedarf auch dokumentiert werden. Durch die folgende Inkubation in Blockierungspuffer wurde die Membran wieder vollständig entfärbt.

#### 2.2.2.6 Spezifischer Nachweis von Proteinen

##### 2.2.2.6.1 Immunologischer Nachweis auf Nitrozellulose-Membranen

Nach dem Transfer der Proteine auf die NC-Membran wurde diese für mind. 1 h in Blockierungspuffer auf einem Universalschüttler (WS-10, Edmund Bühler, Hechingen) sanft geschwenkt um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation für mind. 2 h oder  $\infty$  mit dem primären Antikörper in Blockierungspuffer. Nach dreimaligem Waschen der Membran in T-PBS für 10 min wurde sie für 1 h bei RT mit sekundärem Antikörper inkubiert und wiederum dreimal mit T-PBS gewaschen. Danach wurde die Membran für wenige Minuten im Dunkeln mit Aktivierungslösung (LumiGlo<sup>®</sup>, KPL, Gaithersburg, USA) bedeckt, die Lösung wieder abgenommen, ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) aufgelegt und dieser entwickelt. Alternativ konnte die NC-Membran nach ihrer Aktivierung direkt im PhosphorImager (STORM 860, Molecular Dynamics, Freiburg) eingelesen werden, wobei das durch die Chemilumineszenz emittierte Licht gemessen wurde und Aufschluss über die Bandenintensität gab.

Im Anschluss konnte die Membran kurz in T-PBS gewaschen und danach für ca. 10 min wieder von gebundenen Antikörpern befreit werden (Re-Blot Plus, Chemicon, Hofheim). Nach einem Blockierungsschritt von mind. 2 h wurde dadurch eine zweite Immunfärbung

gegen ein weiteres Antigen möglich, beispielsweise um die Expression eines Haushaltgens als Vergleichs-Standard zu bestimmen.

Die Expressionsstärke eines Proteins wurde durch die Bestimmung der Bandenintensität relativ zu einem Haushaltgen (z.B.  $\beta$ -Aktin) quantifiziert. Dies konnte entweder nach Entwicklung des Films durch Einlesen am Computer und anschließende Auswertung durch die NIH Image-Software (U.S. National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ni-image>) geschehen, oder es wurde das im PhosphorImager erzeugte Bild mit Hilfe der ImageQuant Software (Molecular Dynamics, Freiburg) bearbeitet oder auch hier mit NIH Image ausgewertet.

#### 2.2.2.6.2 Immunologischer Nachweis in der Durchflusszytometrie

Die zu untersuchenden Zellen wurden entweder durch Trypsin-Verdau oder mit einem Zellschaber (Costar, Corning, USA) abgelöst. Vergleichende Untersuchungen hatten gezeigt, dass zwischen den beiden Methoden hinsichtlich des späteren Nachweises des membranständigen Rezeptors EGFR kein Unterschied bestand. Ein teilweiser Verdau des EGFR durch Trypsin konnte dadurch ausgeschlossen werden. Im Anschluss an den Ablösevorgang wurden die Zellen zentrifugiert, 1x mit DPBS gewaschen und anschließend in 5 ml Polystyrol-Röhrchen (BD Labware, Meylan Cedex, Frankreich) überführt. Die Markierung mit in PBS verdünntem primärem Antikörper erfolgte in einem Volumen von 50  $\mu$ l für 1 h bei 4°C. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde für 1 h bei 4°C mit sekundärem Antikörper (in 50  $\mu$ l PBS) im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde erneut mit PBS gewaschen, die Zellen abzentrifugiert und je nach Zellzahl in 250-500  $\mu$ l PBS resuspendiert.

Das Expressionsniveau des Antigens wurde am FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) ermittelt, zur Auswertung wurde die CellQuest Software (BD Biosciences) verwendet.

#### 2.2.2.6.3 Immunfärbung von adhärenenten Monolayern

Für die Immunfärbung adhärenter Monolayer wurden die Zellen in 12-well-Platten auf Deckgläschen (Marienfeld, Lauda) kultiviert.



Um die Oberfläche der Deckgläser etwas aufzurauben, erfolgte zunächst eine Vorbehandlung durch Lagerung  $\bar{u}N$  in 1 M HCl bei 65°C. Nach Abkühlung wurden sie zur Sterilisierung in 70 % Ethanol (EtOH) aufbewahrt und 24 h vor Aussaat der Zellen in die 12-*well*-Platten eingebracht. Nach Absaugen des überschüssigen EtOH und kurze Trocknung bei 37°C wurden die Deckgläser mit 1 ml poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet und bis zur Verwendung am nächsten Tag bei 37°C im Brutschrank belassen. Vor Verwendung wurde das Lysin abgesaugt, die Deckgläser wurden dann bei 37°C getrocknet.

Für die eigentliche Färbung erfolgte zunächst eine Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd für 30 min. Anschließend wurde dreimal mit 1 ml TBS für 5 min gewaschen und dann für mindestens 1 h in 1 ml Fischhaut-Gelatine-Puffer (FGB) bei RT blockiert.

Der primäre Antikörper wurde in FGB verdünnt, 500  $\mu$ l der Lösung pro *well* pipettiert und  $\bar{u}N$  bei 4°C inkubiert. Im Folgenden wurde dreimal mit FGB gewaschen (jeweils 10 min). Die Inkubation mit sekundärem Antikörper erfolgte in einem Volumen von 100  $\mu$ l, wobei die verdünnte Antikörper-Lösung auf Parafilm® (Brand, Wertheim) pipettiert und das Deckglas mit der Zellschicht nach unten daraufgelegt wurde. Die Inkubationsdauer betrug 2 h, anschließend folgte zunächst ein Waschschrift in FGB mit DAPI (250 ng/ml) für 15 min, dann in FGB für 10 min und schließlich in TBS für 10 min. Zuletzt wurden die Präparate auf Objektträgern (Menzel Gläser, Braunschweig) in Fluoromount (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA) eingedeckelt.

Abbildungen der Präparate wurden an einem Olympus BX51-Mikroskop (Olympus Biosystems, Planegg) mit angeschlossener Kamera (ColorView, Soft Imaging System, Münster) und unter Verwendung der analySIS-Software (Soft Imaging System, Münster) angefertigt.

#### 2.2.2.6.4 Fluorimetrischer Nachweis

Die Menge an vorhandenem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) einer Probe konnte fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von 486 nm und einer Emission von 537 nm nachgewiesen werden (Fluoroskan II, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim).

Die exakte Emissionswellenlänge von eGFP war zuvor im Fluoreszenzspektroskop ermittelt worden und betrug 515 nm.

### **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### 2.2.3.1 Präparation von Nukleinsäuren

##### 2.2.3.1.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturmaterial wurde eine Säulenreinigung nach Angaben des Herstellers (Nucleospin RNAII, Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür entweder nach Abnehmen des Mediums und einmaligem Waschen mit Dulbecco's PBS (DPBS) direkt in der Zellkulturplatte lysiert, oder trypsiniert, mit DPBS gewaschen und anschließend lysiert (75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen). Die RNA-Konzentration wurde durch Vermessen in einem Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia, Pfizer, Karlsruhe) bestimmt.

Im Agarosegel wurde die Qualität der isolierten RNA anhand des Vorhandenseins von 18S/28S-Banden ohne Degradierungsprodukte überprüft.

##### 2.2.3.1.2 Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA oder RNA wurden horizontale Agarosegele verwendet. Je nach Größe der zu untersuchenden Nukleinsäure wurden ein bzw. zwei Prozent (w/v) Agarose in TBE-Puffer (vgl. 2.1.2.2) gelöst. Die Proben wurden mit 20 % (vol/vol) Auftragspuffer (vgl. 2.1.2.2) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte in TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 100 Volt, die anschließende Sichtbarmachung der Banden auf dem UV-Schirm erfolgte durch Zugabe von 0.5 µg/ml Ethidiumbromid ins Gel. Bei Untersuchungen an RNA wurden alle Puffer mit DEPC-H<sub>2</sub>O (vgl. 2.1.2.1) angesetzt.

### 2.2.3.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Die reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des SuperScript™ First-Strand Synthesis Systems nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe). Es wurden mindestens 800 pg RNA je Reaktion eingesetzt. Der RNA-Primer-Mix setzte sich wie in Tab. 6 gezeigt zusammen, wobei bei eingesetzten RNA-Mengen von mehr als 1000 ng die Endkonzentration für die Zufalls-Hexamere (*random hexamers*) 2,5  $\mu\text{M}$ , darunter 0,25  $\mu\text{M}$  betrug.

	Volumen/Reaktion ( $\mu\text{l}$ )
0,16-400 ng/ $\mu\text{l}$ gesamt-RNA	5
dNTP-Mix 10 mM	1
<i>random hexamers</i> 25 $\mu\text{M}$	0,2-2
DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 10

**Tab. 6: RNA/Primer-Zusammensetzung für die reverse Transkription**

Die RNA-Primer-Mischung wurde für 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe der weiteren Komponenten und die nächsten Inkubationsschritte abhängig vom gewählten Primer nach Angaben des Herstellers. Das Endvolumen betrug 20  $\mu\text{l}$ .

### 2.2.3.3. Quantitative *real-time* PCR (QRT-PCR)

Die in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zunehmende Menge an Amplifikationsprodukt wurde bei dieser Methode durch Messung der während der Reaktion freiwerdenden Fluoreszenz quantifiziert und konnte dadurch bei laufender PCR „in Echtzeit“ verfolgt werden (*real-time*). Bei dem hier verwendeten 5'-Nuclease-Assay mit TaqMan<sup>®</sup>-Sonden (Applied Biosystems, Foster City, USA) war eine für das zu untersuchende Gen spezifische Sonde an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter, am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden „Löschler“ oder *Quencher* gekoppelt. Durch FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) gab der Reporter mit hohem Energiegehalt einen Teil seiner Energie an den *Quencher* ab, solange sich beide in unmittelbarer Nähe zueinander befanden und fluoreszierte deswegen nicht. Die Sonde band nun an einer Stelle an die cDNA, die zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer lag.

Traf die DNA-Polymerase auf die gebundene Sonde, wurde der Reporter-Farbstoff durch die 5'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms abgespalten, dadurch entfernte er sich räumlich von dem *Quencher* und der Energietransfer hörte auf. Fluoreszenz wurde freigesetzt und detektiert. Die Zunahme an Reportersignal war der Menge an produziertem Amplikon proportional.

Für die Quantifizierung wurden zunächst Standardgeraden erstellt, in denen definierte Mengen (400 / 100 / 20 / 4 / 0,8 / 0,16 ng/µl) einer aus unbehandelten Gliomzellen stammenden Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben wurden (vgl. 2.2.3.2). Von dieser cDNA wurden dann 4 µl in die QRT-PCR eingesetzt. Die eingesetzte Menge an RNA einer zu analysierenden Probe war abhängig von der Ausbeute bei der vorausgegangenen RNA-Isolierung und betrug mindestens 10 ng für die cDNA-Synthese, für die QRT-PCR wurden dann 3 µl dieser cDNA verwendet.

Für die PCR-Analyse in Echtzeit wurden *Assays-on-Demand Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, USA) benutzt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist in Tabelle 7 dargestellt. Die Durchführung der Reaktion erfolgte entweder an einem Rotor-Gene Gerät (RG-2000, Corbett Research, Sydney, Australien), oder an einem ABI Prism 7000 sequence detection system mit angeschlossener ABI Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems).

	Volumen/Reaktion (µl)
TaqMan Universal PCR Master Mix	10
20x Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix für interessierendes Gen	1
CDNA	3-4
H <sub>2</sub> O	ad 20

**Tab. 7: Reaktionsansatz für die quantitative *real-time* PCR (QRT-PCR)**

Bei jeder *real-time*-Analyse wurden zwei Eichgeraden erstellt, so dass einerseits die Expression eines Haushaltsgens (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, GAPDH) in der Probe quantifiziert und in der zweiten Kurve die Expression des zu analysierenden Gens ermittelt werden konnte. Diese Werte der unterschiedlichen Proben (z. B. siRNA EGR10 vs. siRNA EGR12) wurden dann auf die Expression von GAPDH normalisiert und anschließend miteinander verglichen.

#### 2.2.3.4 Expressionsanalyse mit Mikroarrays

##### 2.2.3.4.1 Prinzip

Die unterschiedlichen Genexpressionsmuster der behandelten Gliomzellen wurden durch Expressionsanalysen mit Mikroarrays untersucht. Die Analysen wurden als Auftragsarbeit an das der Universität Regensburg angeschlossene Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik vergeben und dort von Dr. rer. nat. Thomas Stempfl durchgeführt. Verwendet wurden GeneChip<sup>®</sup> Arrays (HG-U133 A) der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA), die Sonden für ca. 14500 Gene enthielten. Die Prozessierung der aus dem Probenmaterial isolierten RNA (vgl. 2.2.3.1.1) erfolgte nach dem von Affymetrix vorgegebenen Protokoll und unter Verwendung der empfohlenen Kits (vgl. GeneChip<sup>®</sup> Expression Analysis Manual, rev3, section 2). Hierbei wurde die zelluläre RNA zunächst durch reverse Transkription in einzelsträngige, dann in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese diente anschließend als Vorlage für eine *in vitro*-Transkription zur Synthese biotinmarkierter cRNA. Die cRNA wurde fragmentiert und hybridisierte auf dem Chip sequenzspezifisch mit den dort aufgebrachtten DNA-Oligonukleotiden. Die Detektion erfolgte im Anschluss durch die Bindung eines Phycoerythrin-gekoppelten Streptavidin/Streptavidin-Antikörper-Komplexes, dessen Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanners gemessen wurde. Die Menge an emittiertem Licht war der Menge an gebundenen cRNA-Fragmenten proportional.

##### 2.2.3.4.2 Behandlung der Zellen und RNA-Isolierung

$2 \times 10^5$  Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät und 24 h später mit siRNA EGR10 bzw. EGR12 transfiziert (vgl. 2.2.1.11). 6 h später wurde das Transfektionsmedium durch DMEM +10 % FCS ersetzt. Nach 72 h erfolgte ein Wechsel zu serumfreien Bedingungen. Weitere 24 h danach wurde EGF in einer Konzentration von 20 ng/ml zugegeben und für 6 h auf den Zellen belassen. Dann wurde die Gesamt-RNA wie unter 2.2.3.1.1 beschrieben isoliert, ihre Qualität überprüft (vgl. 2.2.3.1.2) und eine Konzentration von mind. 2 µg/µl eingestellt. Pro Hybridisierungsansatz wurden mindestens 15 µg RNA isoliert.

#### 2.2.3.4.3 Datenanalyse

Es wurden zwei verschiedene Programme zur Array-Datenanalyse verwendet. Zunächst erfolgte die Auswertung über die von der Herstellerfirma der Arrays vertriebene Affymetrix<sup>®</sup> Microarray Suite 5.0 Software (MAS; Affymetrix 2001, Microarray Suite User Guide, Version 5; <http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>), wobei verschiedene Parameter zur Qualitätssicherung in die Auswertung eingingen: Das Hintergrundsignal durch Autofluoreszenz der Arrayoberfläche (*“Background“*), das *“Rauschen“* bedingt durch Unterschiede in der Digitalisierung der Signale durch den Scanner (*“Noise“*), die mittlere Signalintensität und das Verhältnis der Signalintensitäten von 3'- und 5'- gelegenen Sonden verschiedener Kontrollgene (Aktin und GAPDH), das als Maß für eine gelungene cRNA-Synthese gewertet wurde. Es wurde die globale Normalisierung angewendet, bei der die Fluoreszenzintensitäten über die gesamten Arrays als Vergleichsgrundlage herangezogen wurden.

Im Affymetrix-System wurde der MAS 5.0-Algorithmus verwendet. Dabei war jedes Gen bzw. jede Transkriptvariante durch mindestens 11-20 sog. *Probe Pairs* repräsentiert. Jedes *Probe Pair* bestand aus einem *perfect match*-Oligonukleotid (PM: 25-mer mit 100 %iger Übereinstimmung mit dem zu testenden Transkript) und einem *mismatch*-Oligonukleotid (MM: 25-mer mit einem Basenaustausch an der zentralen Position 13). Für die Berechnung der Signalintensität eines *Probe Sets* (=Summe aller 11-20 *Probe Pairs*) wurden die Differenzwerte PM-MM ermittelt und diese anschließend miteinander verrechnet. Auf diese Weise sollte der Beitrag unspezifischer Wechselwirkungen erkannt und der Signalwert entsprechend korrigiert werden. (vgl. Affymetrix, GeneChip Expression Analysis, Data Analysis Fundamentals; [http://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data\\_analysis\\_fundamentals\\_manual.pdf](http://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf)).

Daneben wurde ein zweiter komplementärer Ansatz zur Datenanalyse angewandt (RMAExpress, <http://www.stat.berkeley.edu/bolstad/RMAExpress.html>). Der diesem Ansatz zugrunde liegende Algorithmus unterschied sich vom MAS-Algorithmus dadurch, dass er auf die Verwendung der MM-Werte komplett verzichtete. Außerdem wurde eine alternative Art der Normalisierung durchgeführt (sog. Quantilen-Normalisierung). RMA ist MAS 5.0 vor allem bei der Analyse von schwach exprimierten Genen überlegen (Irizarry et al., 2003) und soll deshalb in Zukunft auch in die Affymetrix-Software implementiert werden („PLIER“ Algorithmus; [http://www.affymetrix.com/corporate/events/webtalk\\_](http://www.affymetrix.com/corporate/events/webtalk_)

archive\_2004.affx). Die mit Hilfe von RMA gewonnenen Daten wurden abschließend noch auf das Vorhandensein von intensitätsabhängigen systematischen Abweichungen untersucht und zur Korrektur einer Lowess- (**L**ocally **W**eighted **S**catterplot **S**moother) Normalisierung unterzogen (SNOMAD; <http://pevsnerlab.kennedykrieger.org/snomad.html>).

Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, jeweils mit RNA aus siRNA EGR10 (EGFR-spezifisch) und siRNA EGR12 (Kontrolle) behandelten U373 MG-Gliomzellen. Die Daten wurden nach folgenden Kriterien ausgewertet: *Probe sets*, die vom MAS 5.0-Algorithmus auf allen 6 Arrays als nicht detektierbar (*absent*, A) oder durchgehend als unverändert (*not changed*, NC) gewertet wurden, wurden herausgefiltert. Für die verbleibenden 4887 *Probe Sets* wurde unter Einbeziehung verschiedener Parameter ein Index entwickelt, anhand dessen eine Einstufung der *Probe Sets* durchgeführt werden konnte (vgl. Tab. 8). 103 *Probe Sets* (95 Gene) erreichten eine Gesamtpunktzahl von mindestens 8. Diese sind in Tabelle 11 (vgl. 3.4) aufgelistet.

t-test MAS-Daten $< 0,1^*$	2
t-test RMA-Daten $< 0,1^*$	2
Anzahl der MAS-„change calls“ (Probe wird als aufreguliert (Increase, I) oder herunterreguliert (Decrease, D) gewertet);	je 1
mittlere Änderung der logarithmischen Signalintensität MAS-Daten $\leq -0.4$ oder $\geq 0.4$	2
mittlere Änderung der logarithmischen Signalintensität RMA-Daten $\leq -0.4$ oder $\geq 0.4$	2
maximale Gesamtpunktzahl	11

**Tabelle 8: Darstellung des für die Gewichtung der im Mikroarray erhaltenen Daten erstellten Punktesystems**

Für jedes Kriterium, das von einem *Probe Set* erfüllt war, wurde ihm der entsprechende Wert zuerkannt. Je höher die Punktzahl, desto höher wurde die Relevanz des regulierten Gens eingestuft. Die sogenannten *change calls* wurden durch den MAS 5.0 Algorithmus auf der Ebene der *Probe Pairs* ermittelt und stellen zusätzlich zu den t-tests ein unabhängiges Merkmal für die Signifikanz einer Regulation dar. Für jeden der drei paarweisen Vergleiche (siRNA-EGR10 vs siRNA-Kontrolle) ging dieser Wert einzeln in das Punktesystem ein, maximal wurden daher drei Punkte für die *change calls* vergeben. \* Für die Berechnung der (paired) t-tests wurden logarithmierte Signalwerte verwendet, um die Bedingung einer Normalverteilung der Messwerte zu erfüllen.

Die beschriebene, insgesamt vergleichsweise aufwendige, Auswertung wurde durch die nur sehr geringen Unterschiede in der Expression zwischen den EGFR-regulierten und Kontroll-behandelten Zellen nötig. Deshalb wäre es nicht zielführend gewesen, ein

einzelnes, sehr stringentes Kriterium (z.B. > 3fache Regulation) anzulegen. Statt dessen mussten mehrere weniger stringente Kriterien in Kombination verwendet werden und außerdem die Frage der Reproduzierbarkeit kleiner Unterschiede in den Mittelpunkt gerückt werden.



## **III. Ergebnisse**

### **3.1 Anwendung von *small interfering RNAs* in humanen Gliomzellen**

#### **3.1.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen**

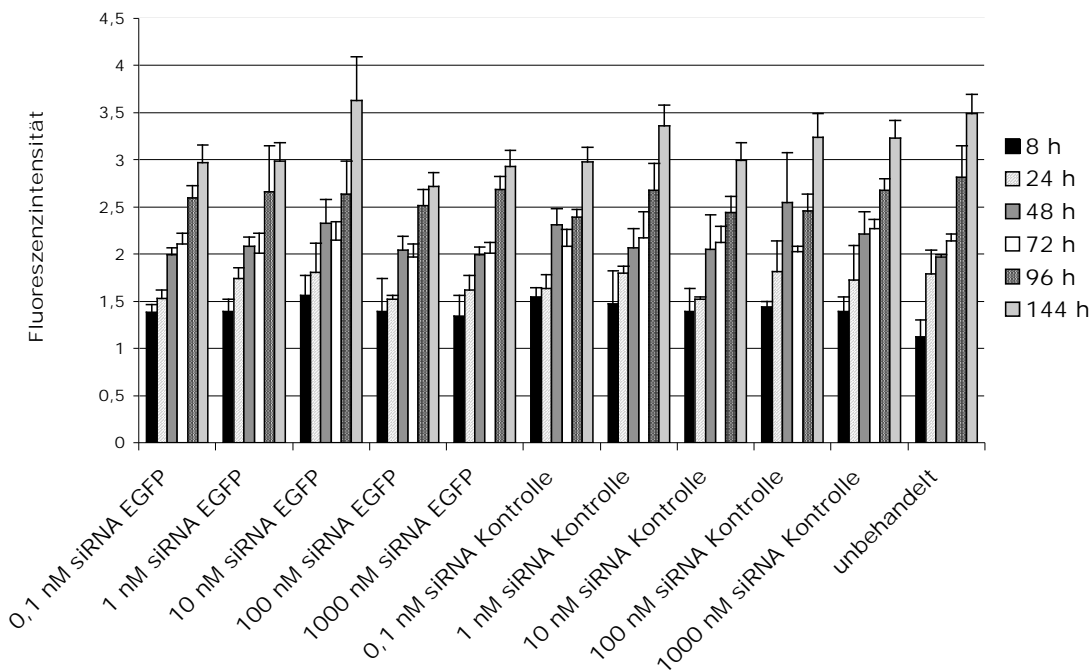
Da zu Beginn dieser Arbeit die RNA-Interferenz (RNAi) durch kleine inhibierende RNA-Moleküle (*small interfering RNAs*, siRNAs) erst in wenigen humanen Zelllinien nachgewiesen worden war (Elbashir et al., 2001a), musste zunächst eine prinzipielle Wirksamkeit des Mechanismus in Gliomzellen gezeigt und die optimalen Bedingungen zu seiner Anwendung ermittelt werden. Dies erfolgte primär über die Herunterregulierung von *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) durch spezifische siRNAs in stabil mit eGFP transfizierten U373-Gliomzellen (U373eGFP). Parallel wurde die Regulation von  $\beta$ -Aktin mit einer bereits veröffentlichten siRNA-Sequenz (Harborth et al., 2001) untersucht. In beiden Versuchsansätzen mussten für die verschiedenen verwendeten Zelllinien zunächst die optimale Zellzahl zum Zeitpunkt der Transfektion, sowie die Art und Menge des verwendeten Transfektionsreagenz ermittelt werden.

##### **3.1.1.1 Regulation von *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) in U373eGFP-Gliomzellen**

###### **3.1.1.1.1 Zelluläre Aufnahme von eGFP-siRNAs ohne Transfektion**

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Möglichkeit einer Aufnahme der kurzen Doppelstrang-RNAs ohne die Zuhilfenahme von Transfektionsmitteln durch adsorptive oder rezeptorvermittelte Endozytose bestand. Diese wurde zumindest in geringem Umfang bei Antisense-Oligonukleotiden nachgewiesen (Akhtar et al., 2000). Dazu wurde eGFP-spezifische siRNA eGFP in einer Endkonzentration von 0,1 nM – 1  $\mu$ M zu den Zellen gegeben und die Änderung der Fluoreszenzintensität (Emission bei 515 nm) im Fluoroskan gemessen (vgl. 2.2.2.6.4). Es fand keine Änderung der Fluoreszenzintensität über den beobachteten Zeitraum statt. Demnach konnte eine spontane Aufnahme von siRNAs in die Gliomzellen nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 5). Bei einem alternativen Ansatz mit

einer Cyan-5-gekoppelten siRNA konnte ebenfalls kein Fluoreszenzsignal innerhalb der Zellen detektiert werden (nicht gezeigt).



**Abb. 5: Änderung der eGFP-Fluoreszenz in U373eGFP-Zellen nach Zugabe von siRNA gegen eGFP bzw. Kontroll-siRNA ohne Transfektionsmittel**

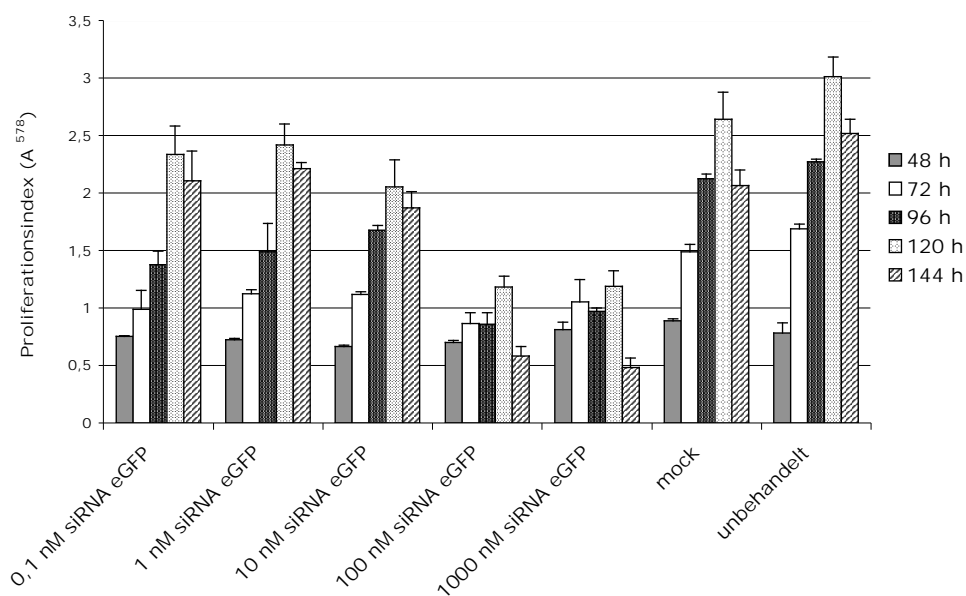
Spezifisch gegen eGFP gerichtete siRNA bzw. eine *mismatch*-Kontroll-siRNA wurden 24 h nach Aussaat der Zellen in Konzentrationen von 0,1–1000 nM in das Medium gegeben und die Fluoreszenz (Emission bei 515 nm) zu den angegebenen Zeitpunkten im Fluoroskan vermessen; n=3.

### 3.1.1.1.2 Transfektion von eGFP-siRNAs

Da eine spontane Aufnahme der siRNAs nicht stattfand, musste diese durch Transfektion vermittelt werden. Dazu wurde die Methode der Lipofektion gewählt, mit der bereits erfolgreich siRNAs transfiziert worden waren (Elbashir et al., 2001a). Bei Vergleich verschiedener Lipofektions-Reagentien (Oligofectamine<sup>®</sup>, Lipofectin<sup>®</sup> (beide Invitrogen, Karlsruhe), Metafectene (Biontex, München), TransIT<sup>®</sup>-TKO (Mirus, Madison, USA), TransMessenger (Qiagen, Hilden)) erwies sich Oligofectamine für die Gliomzellen als am wenigsten toxisch, so dass alle weiteren Untersuchungen damit durchgeführt wurden. In Abbildung 6 ist erkennbar, dass Zellen, die Oligofectamine ins Kulturmedium erhielten

(„mock“) im Vergleich zu völlig unbehandelten Zellen („unbehandelt“) kein vermindertes Wachstum zeigten. Um dennoch mögliche inhibitorische Effekte auszuschließen, wurde in allen Experimenten die mock-Behandlung als Kontrollwert herangezogen.

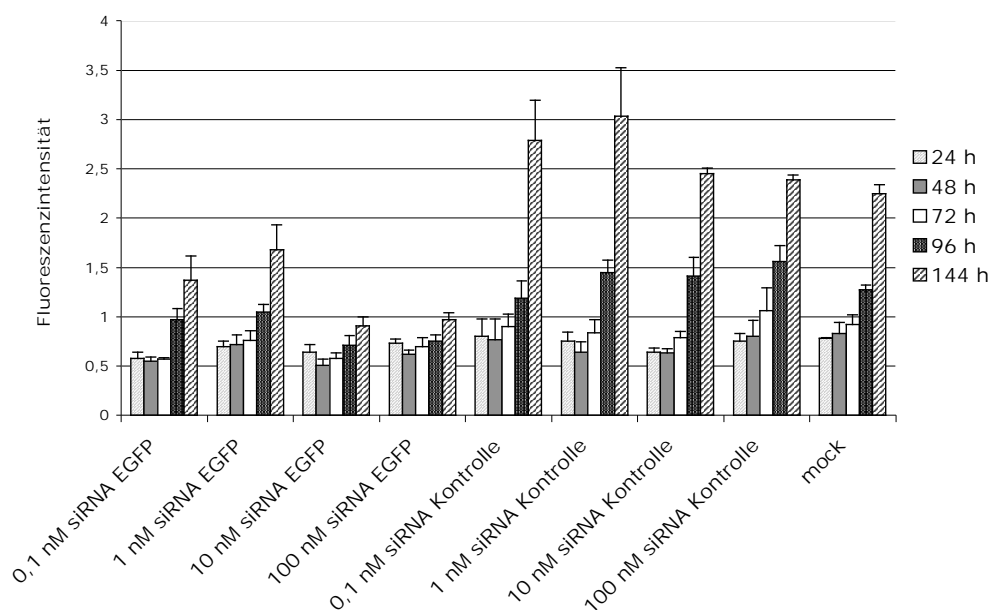
Um eine optimale Dosierung der siRNAs zu bestimmen, sollte zunächst festgestellt werden, ob die Transfektion der siRNAs möglicherweise einen unspezifischen Einfluss auf die Zellproliferation bzw. Zellviabilität ausübte. Dazu wurden U373eGFP-Zellen 24 h nach dem Aussäen mit eGFP-spezifischer siRNA transfiziert. Die Regulation dieses Reportergens sollte keinen inhibierenden Effekt auf die Zellen haben. Die siRNA wurde in Konzentrationen von 0,1 nM–1  $\mu$ M eingesetzt und die Proliferation im Kristallviolett-Assay (Absorption bei 578 nm; vgl. 2.2.2.1.6.2) bestimmt. Bei Konzentrationen von 100 nM und mehr trat eine unspezifische Toxizität auf (vgl. Abb. 6). Dieser Effekt war, wenngleich in abgeschwächter Form, auch in Experimenten mit der unspezifischen Kontroll-siRNA zu beobachten.



**Abb. 6: Proliferation von U373eGFP-Zellen nach Transfektion mit eGFP-siRNA**

U373eGFP-Zellen wurden mit siRNA-Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 1000 nM transfiziert. Anschließend wurde die Proliferation zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Kristallviolett-Assay (Absorption bei 578 nm) bestimmt; mock: nur Transfektionsmittel; n=3.

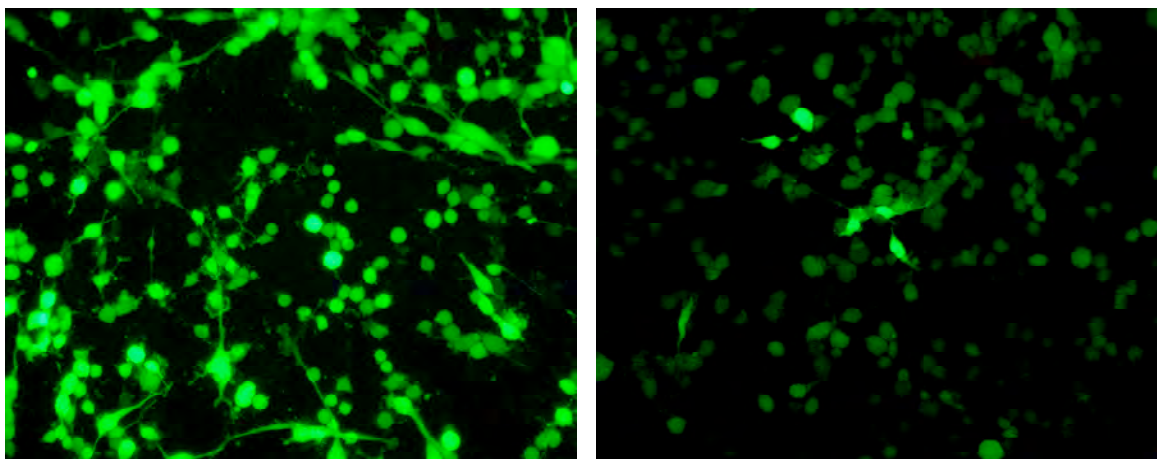
Als nächstes sollte die Abhängigkeit des regulatorischen Effekts von der eingesetzten Dosis an siRNAs untersucht werden. Dazu wurde eGFP-siRNA bzw. Kontroll-siRNA in Konzentrationen von 0,1–100 nM transfiziert und die Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von sechs Tagen bestimmt. Um eventuelle Fehler durch Unterschiede in der Zelldichte zu korrigieren, wurde nach jeder Messung die Zellmasse durch Färbung mit Kristallviolett bestimmt, anschließend wurden die Fluoreszenzwerte darauf normalisiert. Es war zu beobachten, dass bereits bei siRNA-Konzentrationen von 1 nM und darunter eine Inhibition der eGFP-Expression stattfand und dass diese 96 h nach Transfektion zum erstmals deutlich zu erkennen war (vgl. Abb. 7). Es konnte maximal eine Reduktion der Fluoreszenzintensität um ca. 60 % erreicht werden. Da bei Konzentrationen von mehr als 10 nM keine weitere Verstärkung des regulatorischen Effekts mehr beobachtet wurde und zudem bei Konzentrationen ab 100 nM eine unspezifische Toxizität auftrat (vgl. Abb. 6), wurde für alle weiteren Experimente zunächst eine Ausgangskonzentration von 10 nM siRNA gewählt.



**Abb. 7: Quantifizierung der eGFP-Fluoreszenz in U373eGFP-Zellen nach Transfektion von siRNA eGFP bzw. Kontrolle**

eGFP-spezifische siRNA bzw. unspezifische Kontroll-siRNA wurden in Konzentrationen von 0,1-100 nM mit Oligofectamine transfiziert und die Fluoreszenzintensität im Fluoroskan bestimmt. mock: nur Transfektionsmittel; n=4.

In Abbildung 8 ist die Regulation der eGFP-Expression durch siRNAs fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Hier wurde deutlich, dass es sich bei dem durch die RNA-Interferenz vermittelten Effekt eher um einen *Knockdown* als einen *Knockout* handelt, da eine schwache Expression in allen Zellen noch immer nachweisbar war. Andererseits ist erkennbar, dass eine hohe Transfektionseffizienz von ca. 90 % in U373eGFP-Gliomzellen erreicht werden konnte.



Kontroll-siRNA

eGFP-spezifische siRNA

**Abb. 8: Regulation der eGFP-Fluoreszenz in Gliomzellen nach Transfektion mit eGFP-siRNA**

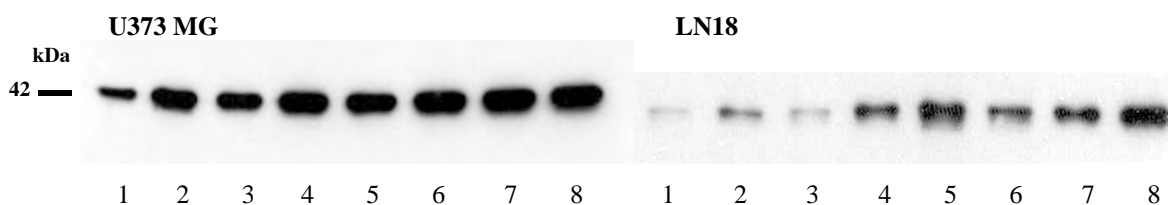
U373eGFP-Zellen wurden mit 10 nM (f. c.) eGFP-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und die Änderung der eGFP-Expression 96 h später im inversen Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Vergrößerung 200x).

### 3.1.1.2 Regulation von $\beta$ -Aktin in verschiedenen Gliomzelllinien

Parallel zu den Versuchen mit *enhanced green fluorescent protein* in U373eGFP-Gliomzellen wurden verschiedene Tumorzelllinien mit siRNA gegen  $\beta$ -Aktin transfiziert, um einerseits die Regulation der Expression an einem endogenen Gen zu überprüfen, und andererseits weitere (Gliom-) Zelllinien zur Transfektionsoptimierung zu untersuchen.

Hierbei konnte eine starke Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Zelldichte festgestellt werden. Die Transfektionsexperimente wurden zunächst, ausgehend von Erfahrungswerten unserer Arbeitsgruppe bei der Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden und der Koftransfektion von Plasmiden mit siRNA, bei einer relativ hohen Zelldichte durchgeführt (ca. 60 - 80 % Konfluenz; P. Jachimczak, pers. Mitt.;

S. Limmer, pers. Mitt.). Es stellte sich jedoch heraus, dass die Transfektionseffizienz mit zunehmender Konfluenz rasch abnahm und eine Regulation der Aktinexpression nicht mehr nachzuweisen war. Bei niedrigen Zellzahlen fand jedoch eine deutliche Herunterregulierung statt, die in ihrer Stärke derjenigen der Originalpublikation (Harborth et al., 2001) entsprach. In Abbildung 9 ist dies exemplarisch an zwei Gliomzelllinien gezeigt. Außerdem konnte hier eine Abnahme der Proteinmenge schon ab 72 h beobachtet werden, im Gegensatz zu den mit eGFP durchgeführten Versuchen. Dies war wahrscheinlich auf Unterschiede in der Halbwertszeit der beiden Proteine zurückzuführen. Im Folgenden wurden alle Transfektionsexperimente bei ca. 20–30 %iger Konfluenz der Zellen durchgeführt.



**Abb. 9: Regulation der  $\square$ -Aktin-Expression in Abhängigkeit von der Zelldichte**

U373 MG- bzw. LN18-Gliomzellen wurden mit siRNA gegen  $\square$ -Aktin (10 nM f. c.) bei unterschiedlichen Zelldichten transfiziert, 72 h später wurde die Expression im Immunoblot untersucht. Zum Vergleich wurden die Zellysate aufgetragen, die bei gleicher Konfluenz nur mit Transfektionsmittel behandelt worden waren (mock; ungerade Zahlen: mit  $\square$ -Aktin-siRNA transfiziert, gerade Zahlen: jeweilige mock-Kontrolle; **1/2**:  $2,5 \times 10^4$  Zellen, **3/4**:  $5 \times 10^4$  Zellen, **5/6**:  $10^5$  Zellen, **7/8**:  $2 \times 10^5$  Zellen; als Kontrolle für gleichmäßige Beladung des Gels mit Protein wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt (nicht gezeigt)).

### **3.1.2 Standardbedingungen für die Transfektion von siRNAs in Gliomzellen**

Aus den Optimierungsversuchen mit siRNAs gegen eGFP und  $\square$ -Aktin ergaben sich die folgenden Standardbedingungen, die in allen weiteren Experimenten angewendet wurden: Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in der angegebenen Dichte ausgesät (vgl. Tab. 9). Das Transfektionsmittel Oligofectamine wurde in serumreduziertem Optimem-Medium für 10 min inkubiert und dann mit den vorverdünnten siRNAs gemischt, wie in Tabelle 10 zusammengefasst. Der Ansatz wurde zu den Zellen gegeben und 6 h dort belassen. Anschließend folgte ein Medienwechsel zurück zu Vollmedium (DMEM + 10 % FCS).

<b>Transfektion von siRNAs (f. c. 10 nM)</b>	<i>96-well</i>	<i>24-well</i>	<i>6-well</i>	75cm <sup>2</sup> -Flasche
Zellzahl U373eGFP / U373 MG LN18	2,5 x 10 <sup>3</sup> 5 x 10 <sup>3</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup> 5 x 10 <sup>4</sup>	7,5 x 10 <sup>4</sup> 1,5 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>5</sup> -
Oligofectamine (µl) + Optimem (µl)	0,5 2	3 12	6 24	24 176
siRNA (µl) + Optimem (µl)	0,5 97	1 84	2 168	12 788
vorgelegtes Medium (µl)	-	400	800	5000
Transfektionsvolumen gesamt (µl)	100	500	1000	6000

**Tab. 9: Standardbedingungen für die Transfektion von U373- und LN18-Gliomzellen mit siRNAs**

Dargestellt sind die eingesetzten Zellzahlen und die Mischungsverhältnisse der einzelnen Komponenten für die Transfektion von siRNAs in Gliomzellen bei einer siRNA-Endkonzentration von 10 nM. Bei anderen Konzentrationen änderte sich nur das Volumen in dem die RNA-Oligomere verdünnt wurden.

### **3.2. Regulation des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) durch *small interfering RNAs* (siRNAs)**

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Parameter zur Synthese funktioneller siRNAs bekannt. Die optimale Länge der RNA-Duplexe lag zwischen 21 und 25 Basen mit Überhängen von zwei Nukleotiden Länge an jedem der beiden Stränge (Elbashir et al., 2001b; Parrish et al., 2000; Zamore et al., 2000). Es existierten jedoch Hinweise, dass eine erhöhte Effektivität der siRNAs durch strukturelle Modifikationen besonders im Bereich der Überhänge erreicht werden konnte (S. Limmer, pers. Mitt.). Schon früh war bekannt, dass siRNAs gegen Intronsequenzen in der RNA keine regulatorischen Effekte hervorriefen, so dass die RNA-Interferenz als rein posttranskriptioneller Mechanismus erkannt wurde. Allerdings schienen die siRNAs bei ihrer spezifischen Bindung an die mRNA nur geringfügig durch möglicherweise vorhandene Sekundärstrukturen blockiert zu werden (Elbashir et al., 2002). So ging man anfangs davon aus, dass jede Zielsequenz ähnlich gut für einen RNAi-initiierten Abbau geeignet sei, solange sie nicht in der untranslatierten Region oder in der Nähe des Startcodons auf der mRNA gelegen war, da hier vermehrt eine Blockade durch gebundene Translations-Proteine gegeben sein könnte. Mittlerweile ist bekannt, dass unterschiedliche siRNAs auch eine unterschiedliche RNAi-

Aktivität induzieren (Hohjoh, 2002; Holen et al., 2002). Bis heute bestehen jedoch kaum Möglichkeiten, die Effizienz, mit der ein bestimmtes Oligonukleotid an seine Zielsequenz bindet (was die Voraussetzung für den sequenzspezifischen Abbau darstellt), vorhersagen zu können. Obwohl verschiedene Computerprogramme existieren, die Voraussagen über Sekundär- oder Tertiärstrukturen in einer RNA treffen können und eine dadurch bedingte mögliche sterische Blockade der Bindung, ist letztendlich die Funktionalität eines Oligos nur experimentell bestimmbar.

### **3.2.1 Screening nach funktioneller siRNA gegen EGFR**

Durch unseren Kooperationspartner (Ribopharma AG, heute Alnylam Europe AG, Kulmbach) wurde eine Serie von siRNAs synthetisiert, die gegen verschiedene Regionen des EGFR gerichtet waren (intra- und extrazelluläre Domänen) und eine Reihe von strukturellen Unterschieden besaßen (s. Tab. 10). In einer ersten Phase wurden die siRNAs 1 bis 15 synthetisiert, für die jedoch kein Effekt auf die EGFR-Expression nachgewiesen werden konnte. Daraufhin wurden in einer zweiten Synthese im Jahr 2002 die Oligos EGR10, EGR11 und eine Kontroll-siRNA mit drei *mismatch*-Punktmutationen (EGR12) zu EGR10 generiert.

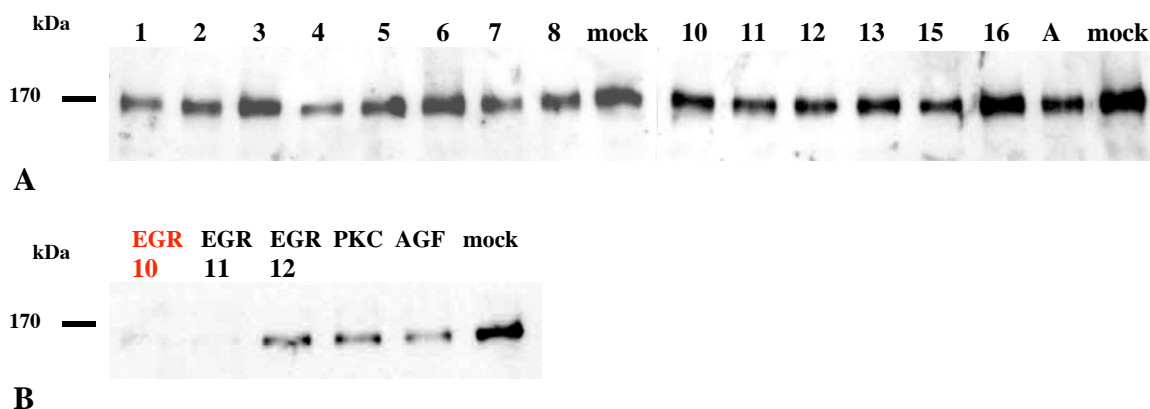
EGFR extrazelluläre Sequenzen	
1-3; AGF ( <i>scrambled</i> Kontrolle)	22-mer, <i>blunt end</i>
4-6	22-mer + 2nt-Überhänge am 3'-Ende beider Stränge
7, 8	22-mer + 2nt-Überhang am 3'-Ende <i>antisense</i> -Strang
10-12; 16 ( <i>scrambled</i> Kontrolle)	22-mer + 2nt-Überhang am 3'-Ende <i>sense</i> -Strang
EGFR intrazelluläre Sequenzen	
13, 15; PKC ( <i>scrambled</i> Kontrolle)	19-mer + 2nt-Überhänge am 3'-Ende beider Stränge
EGR10, 11, 12 (3- <i>mismatch</i> Kontrolle zu EGR10)	21-mer + 2nt-Überhang am 3'-Ende <i>antisense</i> -Strang

**Tab. 10: Struktur verschiedener siRNA-Oligos gegen EGFR**

Nach der Transfektion unter Standardbedingungen bei einer verwendeten siRNA-Endkonzentration von 10 nM konnte sowohl durch EGR10 als auch durch EGR11 eine



deutliche Herunterregulierung des Rezeptors in U373 MG-Gliomzellen erreicht werden. In Abbildung 10 ist der Effekt der Transfektion mit den unterschiedlichen siRNAs auf die EGFR-Proteinmenge im Western Blot dargestellt.



**Abb. 10: EGFR-Expression in U373 MG-Zellen nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs der ersten (A) und zweiten Generation (B)**

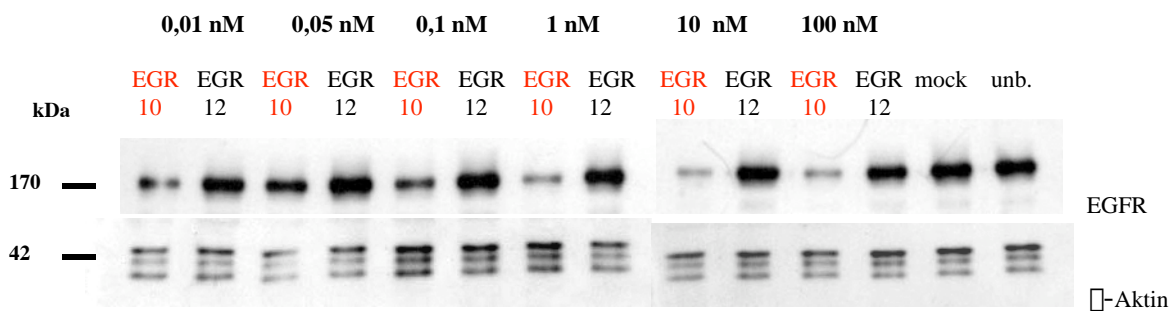
U373 MG-Zellen wurden mit jeweils 10 nM (f. c.) der unterschiedlichen Oligos transfiziert, das Gesamtprotein nach 72 h isoliert und die EGFR-Proteinmenge im Western Blot verglichen; mock: nur Transfektionsmittel; Serie A (bis 6/2002), Serie B (ab 6/2002).

Da sich sowohl auf Proteinebene im Western Blot und Durchflusszytometer (vgl. 3.2.2.2, Abb. 13) als auch in der quantitativen *real-time* PCR (nicht gezeigt) Hinweise auf eine leichte Überlegenheit in der EGFR-Regulation von EGR10 gegenüber EGR11 ergaben, wurden alle weiterführenden Experimente mit siRNA EGR10 durchgeführt.

## **3.2.2 Regulation des EGFR auf Proteinebene**

### **3.2.2.1 Nachweis im Western Blot**

Um eine maximale Reduktion der EGFR-Suppression in den Gliomzellen zu erreichen, wurde zunächst die optimale Menge an einzusetzender siRNA ermittelt. Hierfür wurden U373 MG-Zellen mit siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 in Konzentrationen zwischen 0,01 nM und 100 nM transfiziert, nach 72 h das Gesamtprotein isoliert und die EGFR-Expression durch den Nachweis im Western Blot bestimmt.



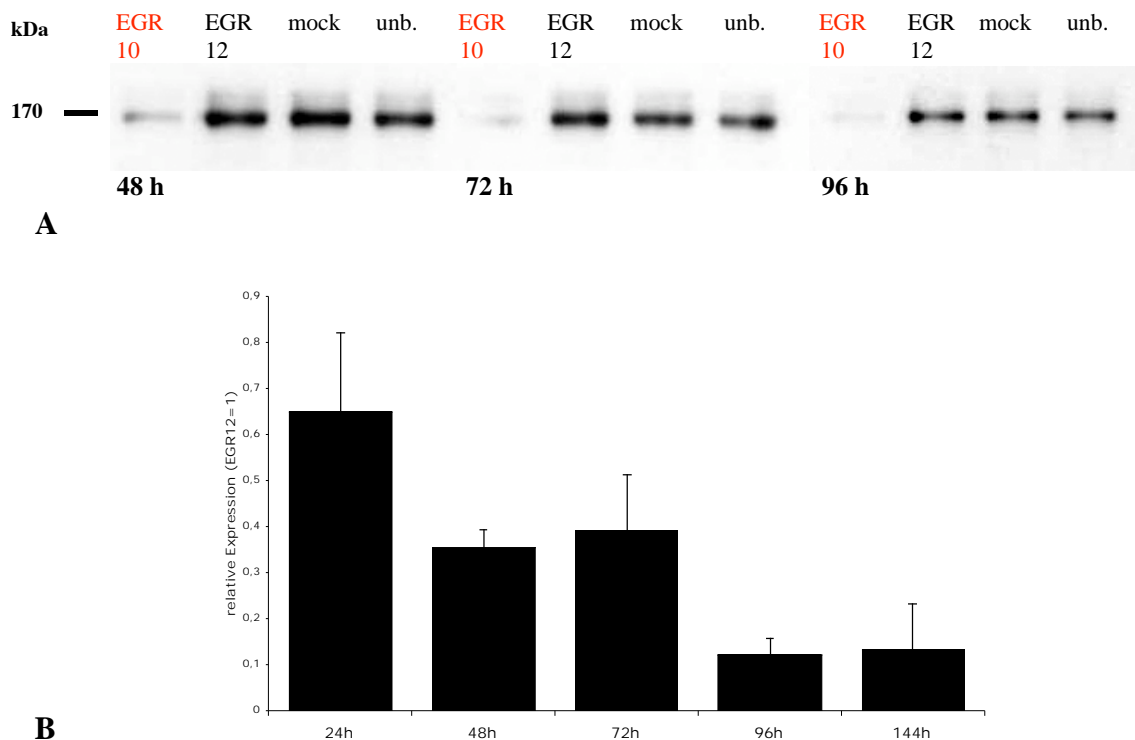
**Abb. 11: EGFR-Proteinexpression nach Transfektion mit unterschiedlichen Konzentrationen an siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12**

U373 MG-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an EGFR-spezifischer siRNA EGR10 bzw. der Kontroll-siRNA EGR12 transfiziert, das Gesamtprotein wurde nach 72 h isoliert und die Expression des Rezeptors im Western Blot bestimmt. Während für EGR12 in keiner der eingesetzten Konzentrationen ein Effekt nachweisbar war, zeigte sich bei Transfektion mit EGR10 eine deutliche Reduktion der EGFR-Proteinmenge schon bei einer Konzentration von 1 nM. Der Nachweis von  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung des Gels; hier traten unter nicht-reduzierenden Bedingungen, die für den Einsatz des EGFR-spezifischen Antikörpers besser geeignet waren, auf Höhe von  $\beta$ -Aktin drei Banden auf (vgl.  $\beta$ -Aktin unter reduzierenden Bedingungen 1.1.2.1, Abb. 9).

Wie schon in den Experimenten zur Regulation von *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) und  $\beta$ -Aktin gezeigt, ergab sich auch bei der Anwendung der siRNA EGR10 ein dosisabhängiger Effekt. Es zeigte sich parallel zur Regulation von eGFP (vgl. 3.1.1.1.2, Abb.7), dass schon Konzentrationen unter 1 nM wirksam waren und eine Erhöhung über 10 nM keine zusätzliche Verstärkung des Effekts mehr erbrachte (Abb. 11). Für alle weiteren Experimente wurde deshalb zunächst eine Endkonzentration von 10 nM siRNA EGR10 gewählt.

Um Untersuchungen zum Einfluss der EGFR-Inhibition auf nachgeschaltete Signalwege und resultierende Änderungen auf zellulärer Ebene in den Gliomzellen durchführen zu können, sollten diese zum Zeitpunkt der stärksten Herunterregulierung des Rezeptors erfolgen. Um diesen zu ermitteln, wurden U373 MG-Zellen mit 10 nM siRNA EGR10 bzw. der Kontrolle EGR12 transfiziert und die EGFR-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Western Blot bestimmt. Dazu wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Die im PhosphorImager von der Nitrozellulose-Membran eingelesenen Banden wurden mit Hilfe der NIH Image Software analysiert und

die Proteinmenge quantifiziert. In Abbildung 12 A ist ein typischer Western Blot abgebildet, in 12 B sind die Ergebnisse graphisch zusammengefasst.



**Abb. 12: EGFR-Proteinexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion mit siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12**

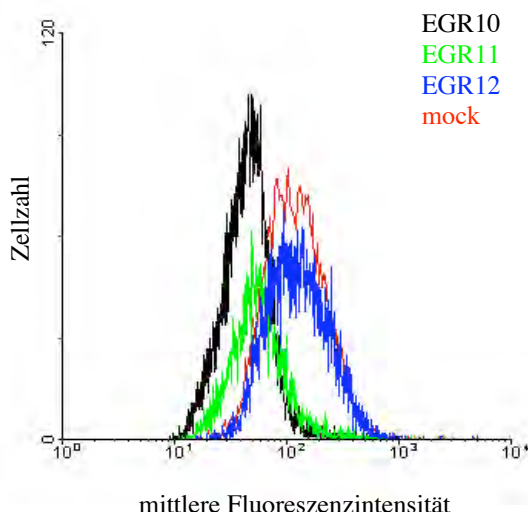
U373 MG-Zellen wurden mit jeweils 10 nM (f. c.) EGFR-spezifischer siRNA EGR10 bzw. unspezifischer siRNA EGR12 transfiziert. Zur weiteren Kontrolle wurde der Rezeptor in Lysaten von mock-behandelten (nur Transfektionsmittel) bzw. völlig unbehandelten Zellen (unb.) nachgewiesen; **A**: Exemplarischer Western Blot zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h, 96 h nach Transfektion ( $\beta$ -Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet (nicht gezeigt)). **B**: Im Western Blot erhaltene Banden wurden im PhosphorImager eingelesen und anschließend über NIH Image (16bit Graustufen) ausgewertet. Die Werte aller Proben wurden zunächst auf ihre jeweilige  $\beta$ -Aktin-Expression normalisiert und anschließend wurde die relative Expression bezogen auf die *mismatch* – Kontrolle (siRNA EGR12 = 1) aufgetragen. Es wurden jeweils drei (24/144 h) bzw. vier (48-96 h) unabhängige Experimente durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass bereits 48 h nach Transfektion mit siRNA EGR10 eine Verminderung der Proteinmenge um ca. 60 % gegenüber den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen festzustellen war. Die Herunterregulierung des Rezeptors erreichte bei 96 h ein Maximum mit einer Reduktion um ca. 90 %. Auch zum letzten untersuchten Zeitpunkt bei 144 h war die EGFR-Expression noch nicht auf ihr Ausgangsniveau

zurückgekehrt (Abb. 12). Man geht davon aus, dass der siRNA-vermittelte Effekt nach 6-8 Zellteilungen durch Ausverdünnen der Oligos (nicht durch deren Abbau) verschwindet (Stein et al., 2003), was in U373 MG-Zellen mit einer Verdoppelungszeit von ca. 30 h ungefähr einem Zeitraum von 10 Tagen entsprechen würde. Untersuchungen zu Zeitpunkten nach 144 h waren jedoch nicht möglich, da die Zellen bereits konfluent waren. Alle weiteren Versuche wurden daraufhin zum Zeitpunkt der maximalen Proteinreduktion bei 96 h nach Transfektion durchgeführt.

### 3.2.2.2 Nachweis in der Durchflusszytometrie

Um die Regulation nicht nur im Gesamtzell-Proteinlysats, sondern auch auf intakten Zellen nachzuweisen, wurden U373 MG- und LN18-Gliomzellen standardmäßig transfiziert und 96 h später die EGFR-spezifische Fluoreszenz wie unter 2.1.2.3 beschrieben im Durchflusszytometer analysiert. Neben EGR10 und der Kontroll-siRNA EGR12 wurde auch die zweite siRNA, die im Western Blot einen inhibierenden Effekt auf die Expression gezeigt hatte (EGR11, vgl. 3.2.1, Abb. 10) getestet.

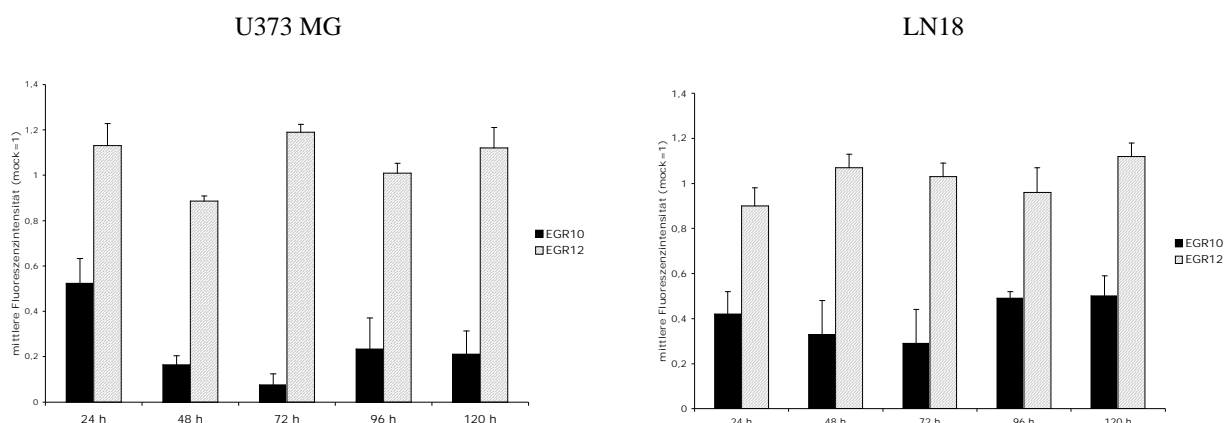


**Abb. 13: EGFR-spezifische Fluoreszenz auf U373 MG-Zellen**

Die Färbung erfolgte 96 h nach Transfektion mit siRNA EGR10 (schwarz), EGR11 (grün), EGR12 (blau), bzw. nach Behandlung nur mit Transfektionsmittel (mock, rot). Die Endkonzentration der siRNAs betrug 10 nM, die Kurven stellen Mittelwerte aus je drei Einzelerperimenten dar.

Hier zeigte sich eine leichte Überlegenheit der EGR10-siRNA (vgl. Abb. 13), so dass diese für alle weiteren Experimente verwendet wurde.

Die im Durchflusszytometer gewonnenen Werte stimmten im Wesentlichen mit den Daten aus dem Immunoblot überein. Im FACS wurde jedoch die maximale Reduktion der EGFR-Expression von ca. 90 % bereits nach 72 h erreicht (vgl. Abb. 14).



**Abb. 14: EGFR-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion mit 10 nM EGR 10 – Nachweis im Durchflusszytometer**

U373 MG- bzw. LN18- Gliomzellen wurden mit EGFR-spezifischer siRNA EGR10 bzw. Kontrolle EGR12 transfiziert und die Rezeptor-Expression auf der Zelloberfläche untersucht. Abgebildet sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

Insgesamt war in der LN18-Linie die maximale Herunterregulierung mit 70 % gegenüber der Kontroll-siRNA etwas schwächer als in den U373 MG-Zellen, möglicherweise durch eine etwas schlechtere Transfektionseffizienz bedingt. Ein weiterer Unterschied könnte in der intrazellulär vorhandenen Konzentration an molekularen Komponenten der RNAi-Maschinerie begründet sein (Denli und Hannon, 2003; Harborth et al., 2001). Schließlich wird noch die Menge an endogenen miRNAs, die mit den transfizierten siRNAs um RISC konkurrieren, als Faktor für die Unterschiede in der Sensitivität gegenüber siRNAs in verschiedenen Zelllinien diskutiert (Harborth et al., 2003).

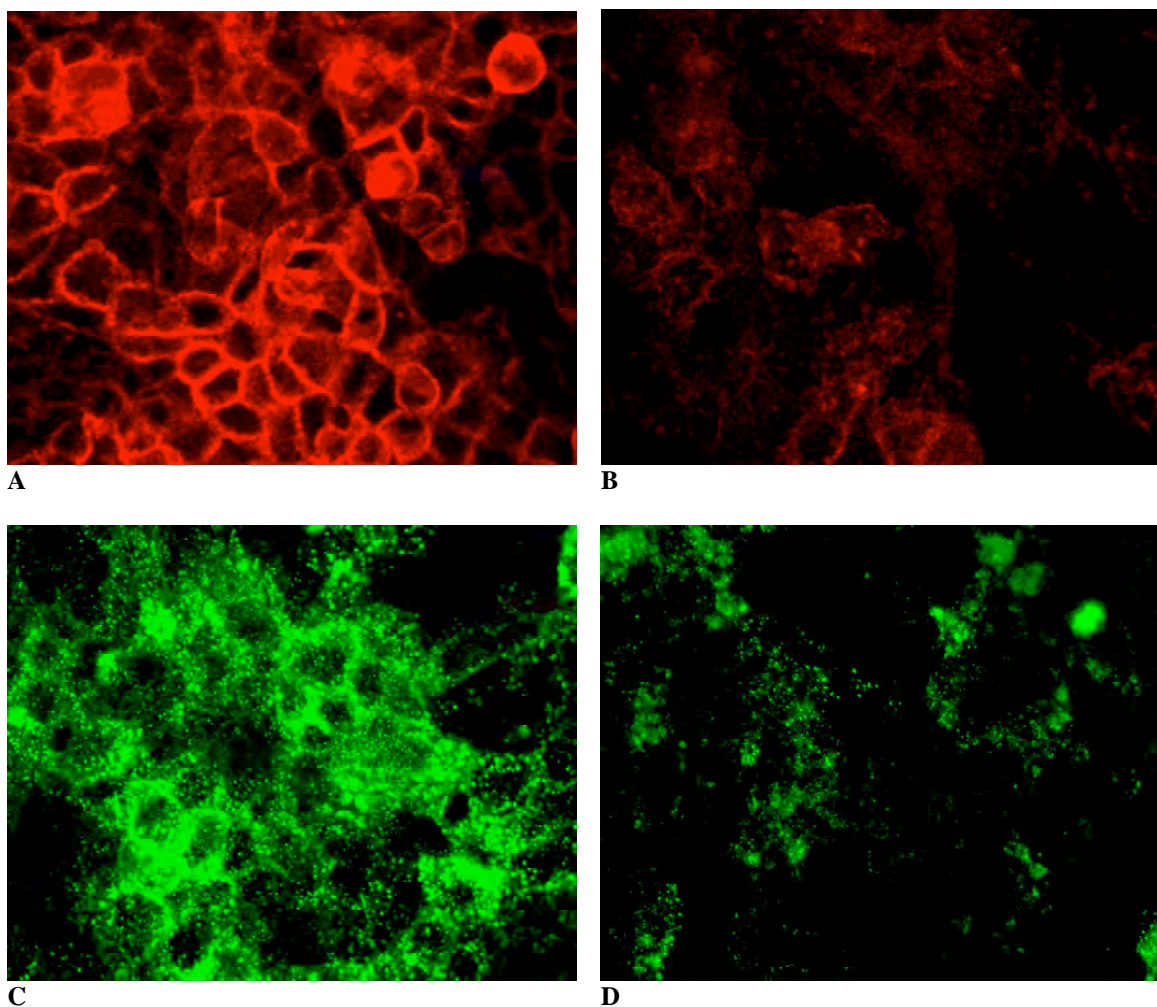
### 3.2.2.3 Immunzytochemischer Nachweis

Zuletzt sollte die Herunterregulierung sowohl des EGFR-Gesamtproteins, als auch des aktivierten (phosphorylierten) Rezeptors durch Immunfärbung auf der Zelloberfläche

nachgewiesen werden. Hierfür wurden A431-Zellen verwendet, die besonders große Mengen an EGFR exprimieren (ca.  $1,4 \times 10^6$  Rezeptoren/Zelle gegenüber  $6 \times 10^3 - 7 \times 10^4$  Rezeptoren/Zelle in U373 MG (Hoi Sang et al., 1995)), da eine spezifische Färbung des EGFR sowohl auf den U373 MG- als auch auf den EGFR-überexprimierenden LN18-Gliomzellen auf Grund des vergleichsweise niedrigen Expressionsniveaus nicht zu erzielen war. Eigene Untersuchungen im Durchflusszytometer hatten für die von uns verwendeten Zellen eine ca. 70-fach stärkere EGFR-spezifische Fluoreszenz in A431-Proben gegenüber U373 MG-Zellen ergeben, LN18-Zellen wiesen eine etwa doppelt so starke Fluoreszenzintensität im Vergleich zu U373 MG-Zellen auf (nicht gezeigt).

Die A431-Zellen wurden standardmäßig transfiziert und nach 96 h immunzytochemisch aufgearbeitet. Für die spezifische Färbung von aktiviertem (phospho-) EGFR wurden die Zellen vor der Fixierung 30 min mit *epidermal growth factor* (EGF, 20 ng/ml f. c.) stimuliert.

Sowohl die Verminderung des Gesamtproteins als auch von aktiviertem EGFR nach der Transfektion mit EGFR-spezifischer siRNA EGR10 konnte nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15). Deutlich ist die membranständige Verteilung von EGFR in unstimulierten Zellen zu erkennen, während sich der Rezeptor nach Zugabe von EGF im Zytoplasma wiederfindet. Vor der Internalisierung findet die Ansammlung der aktivierten Proteine in sogenannten *coated pits* statt (Wiley, 2003).



**Abb. 15: Immunzytochemischer Nachweis von EGFR bzw. phospho-EGFR nach Transfektion mit siRNA EGR10 (B, D) bzw. EGR12 (A, C)**

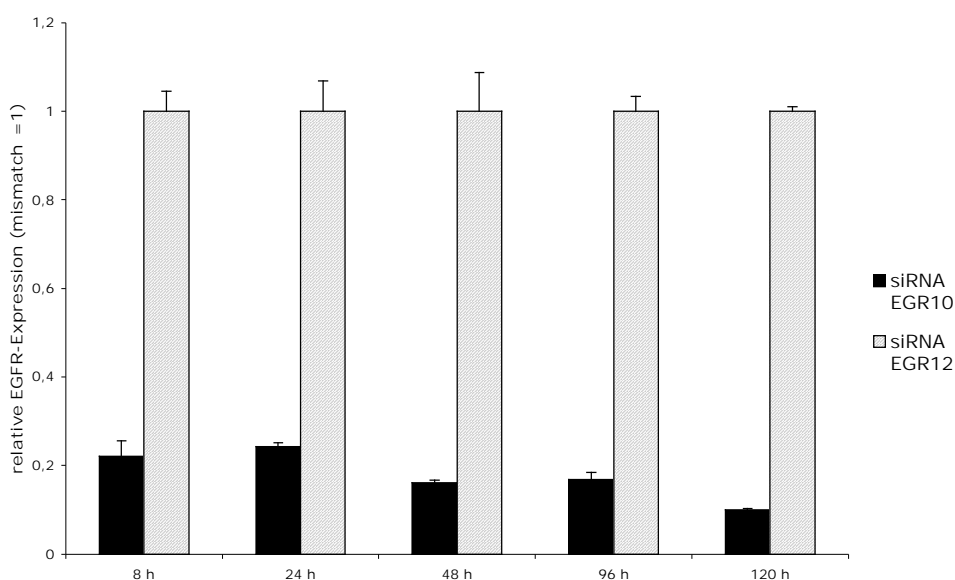
A431-Karzinomzellen wurden mit EGFR-spezifischer siRNA EGR10 bzw. Kontrolle EGR12 transfiziert (f. c. 10 nM) und die Expression von EGFR und phospho-EGFR wurde 96 h später fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. **A, C**: siRNA EGR12; **B, D**: siRNA EGR10. Negativkontrollen (Isotypkontrollen) zeigten keine Färbung; Vergrößerung: 400-fach, Belichtungszeit 800 ms (A, B) bzw. 2,5 s (C, D).

### **3.2.3 Regulation des EGFR auf mRNA-Ebene**

Da die RNA-Interferenz ein Mechanismus ist, der auf dem spezifischen Abbau der mRNA beruht, sollte dieser durch *real-time* PCR quantitativ bestimmt werden. Durch diesen Nachweis sollte außerdem demonstriert werden, dass die auf Proteinebene schon gezeigte Suppression nicht auf Effekten beruhte, die von der Degradation der RNA unabhängig

sind, wie sie mehrfach für Antisense-Oligonukleotiden beschrieben worden sind (Lebedeva und Stein, 2001; Lai et al., 2003).

Dazu wurden die U373 MG-Gliomzellen mit jeweils 10 nM EGFR-spezifischer siRNA (EGR10) bzw. Kontroll-siRNA (EGR12) transfiziert, dann wurde die RNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion isoliert, in cDNA umgeschrieben und in die quantitative *real-time* PCR eingesetzt (vgl. 2.2.3.3). Es zeigte sich bereits wenige Stunden nach Transfektion eine substantielle Reduktion der EGFR-mRNA, deren Maximum bei 90 % gegenüber den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen lag. Bis zum Ende des Versuchszeitraums nach fünf Tagen blieb dieser Effekt bestehen, spätere Zeitpunkte wurden nicht betrachtet, da die Kulturen bereits eine vollständige Konfluenz erreicht hatten.



**Abb. 16: EGFR mRNA-Quantifizierung in U373 MG-Zellen nach Transfektion mit EGR10**

U373-Gliomzellen wurden standardmäßig mit siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 (10 nM f. c.) transfiziert und anschließend wurde die Gesamt-RNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. Nach der reversen Transkription einer definierten RNA-Menge wurde die so gewonnene cDNA in die quantitative *real-time* PCR eingesetzt (vgl. 2.2.3.3). Die erhaltenen Werte für die EGFR-Expression wurden zunächst auf die Expressionswerte eines nicht-regulierten Haushaltsgens (GAPDH) derselben Probe normalisiert und anschließend zur besseren Übersicht die jeweiligen *mismatch*-Kontrollen gleich 1 gesetzt. Dargestellt ist eine einzelne Versuchsreihe, alle Werte wurden dreifach bestimmt ( $n=3$ ). Das gesamte Experiment wurde ein weiteres mal mit identischen Ergebnissen reproduziert.



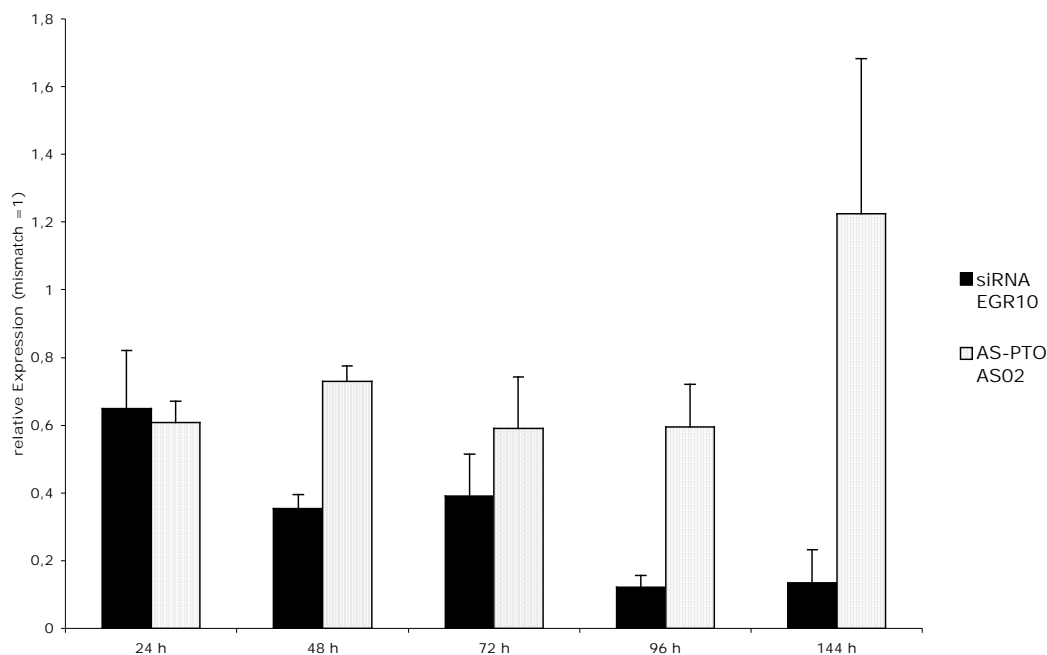
### **3.2.4 Vergleich von siRNA und Phosphorothioat-Antisense-Oligonukleotiden (AS-PTOs) in der EGFR-Regulation**

Um die Wirksamkeit von siRNAs im Hinblick auf eine mögliche spätere Verwendung in der experimentellen Tumorthherapie gegenüber der bereits in klinischen Studien verwendeten Antisense-Technologie abschätzen zu können, wurde die Effizienz der EGFR-Regulation durch siRNA EGR10 auf mRNA- und Protein-Ebene mit der eines veröffentlichten Antisense-Oligonukleotids gegen EGFR (Li et al., 2002; Witters et al., 1999) verglichen.

#### **3.2.4.1 Proteinexpression**

Hierfür wurden U373 MG-Zellen mit siRNAs EGR10 bzw. EGR12 (f. c. 10 nM) und EGFR-spezifischem Antisense-PTO AS02 bzw. AS-PTO Kontrolle (AS-K; f. c. 500 nM) transfiziert und die EGFR-Proteinmenge wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot untersucht. Die einzusetzende Menge an AS02 war in Vorversuchen ermittelt worden, ausgehend von den publizierten Daten, die unter anderen Versuchsbedingungen und mit anderen Zelllinien erstellt worden waren. Erst bei einer Konzentration von mindestens 0,5  $\mu$ M Antisense-Oligo konnte eine Regulation des Rezeptors unter den hier verwendeten Bedingungen festgestellt werden. Höhere Mengen von AS-PTOs (bis 10  $\mu$ M) zeigten eine unspezifische Toxizität ohne eine Verstärkung des EGFR-inhibierenden Effekts (Daten nicht gezeigt). Für alle Versuche wurden daher AS02 bzw. AS-K in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt.

Es zeigte sich, dass der maximal durch das spezifische Antisense-Oligo erzielbare Effekt eine Reduktion der Proteinexpression um ca. 40 % gegenüber der *mismatch*-Kontrolle nach 72 h bewirkte. Im Vergleich dazu ging die EGFR-Expression nach Behandlung mit siRNA EGR10 nach 96 h auf ca. 15-20 % gegenüber der Kontrollgruppe zurück (Abb. 17). Die eingesetzte siRNA-Konzentration lag um den Faktor 50 niedriger als die AS-PTO-Konzentration (10 nM gegenüber 500 nM).

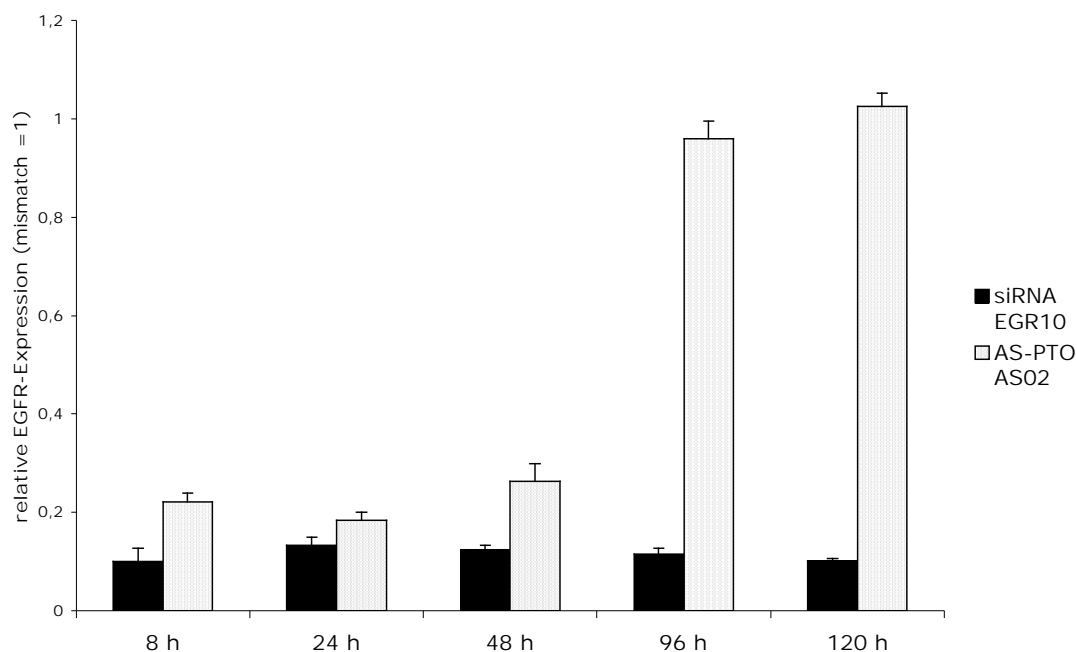


**Abb. 17: Regulation der EGFR-Proteinexpression in U373 MG-Zellen nach Transfektion mit siRNA EGR10 (10 nM) bzw. AS02 (500 nM).**

U373 MG-Zellen wurden mit siRNA EGR10 bzw. Kontrolle EGR12 (je 10 nM f. c.) und Antisense-Oligo gegen EGFR AS02 bzw. Kontrolle AS-K (je 500 nM f. c.) transfiziert und das Gesamtprotein zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert. Die im Western Blot erhaltenen Banden wurden über NIH Image (16bit Graustufen) ausgewertet. Die Werte aller Proben wurden zunächst auf die  $\beta$ -Aktin-Expression normalisiert und anschließend relativ zu ihren jeweiligen Kontrollen dargestellt (*mismatch*-Kontrollen=1; n=4).

#### 3.2.4.2 mRNA-Expression

Wie in 3.2.4.1 für die EGFR-Proteinexpression gezeigt, sollte auch auf transkriptioneller Ebene die Wirksamkeit des siRNA-vermittelten RNA-Abbaus im Vergleich zu Antisense-Oligonukleotiden (AS-PTOs) untersucht werden. Analog zu den siRNA-Experimenten in 3.2.3 wurden hier U373 MG-Zellen mit jeweils 500 nM AS-PTO AS02 (EGFR-spezifisch) und AS-K (*mismatch*-Kontrolle) transfiziert. Die RNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion isoliert (8 h, 24 h, 48 h, 96 h, 120 h), in cDNA umgeschrieben (vgl. 2.2.3.2) und in die quantitative *real-time*-PCR (QRT-PCR) eingesetzt (vgl. 2.2.3.3). Die so ermittelten Expressionswerte wurden mit den Daten aus 3.2.3 verglichen (vgl. Abb. 16).



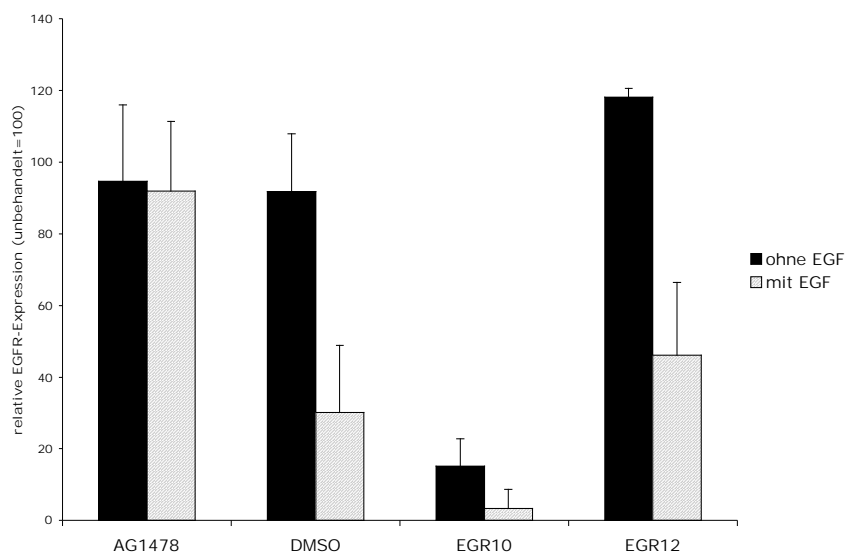
**Abb. 18: Expression von EGFR- mRNA in U373 MG-Zellen nach Transfektion mit 10 nM siRNA EGR10 bzw. 500 nM AS02**

Die Gesamt-RNA von U373 MG-Gliomzellen wurde nach Transfektion mit 10 nM siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA und 500 nM EGFR-spezifischem Antisense-Oligonukleotid AS02 bzw. Kontroll-Oligo AS-K zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert, in cDNA umgeschrieben und in die quantitative *real-time* PCR eingesetzt. Die erhaltenen Werte für die EGFR-Expression wurden zunächst auf die Expression eines nicht-regulierten Haushaltgens (GAPDH) derselben Probe normalisiert und anschließend die Reduktion der mRNA durch die spezifischen Oligos relativ zu deren jeweiligen *mismatch*-Kontrollen (siRNA EGR10 bzw. AS-K) dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, wobei jede Quantifizierung jeweils dreifach durchgeführt wurde (n=6).

Zum einen konnte festgestellt werden, dass die EGFR-mRNA durch siRNA EGR10 um ca. 90 % vermindert wurde, die maximale Reduktion durch AS02 betrug ca. 80 %. 8 h nach Transfektion war sowohl in den siRNA- als auch in den Antisense-behandelten Zellen die EGFR-Expression stark herunterreguliert. Der größte Unterschied in der Wirkung der verschiedenen Ansätze bestand in der Dauer des vermittelten Effekts. Während das Expressionsniveau nach siRNA - Transfektion bis zum Ende der Untersuchung nach 5 Tagen noch immer bei 10 % der Normalwerte war, lag bei Behandlung mit AS02 bereits nach 4 Tagen wieder die gleiche Menge an EGFR-Transkript wie in der Kontrollgruppe vor.

### **3.3 Auswirkung der EGFR-Regulation durch siRNAs in Gliomzelllinien**

Nachdem die spezifische Herunterregulierung des EGFR durch siRNA EGR10 nachgewiesen worden war und den Gliomzellen nur noch ca. 10-20 % ihrer ursprünglichen Menge an Rezeptoren zur Verfügung standen, sollten die Auswirkungen dieser eingeschränkten Signalvermittlung durch das potentielle Onkogen EGFR untersucht werden. Hierfür wurden zum einen U373 MG-Zellen und zum anderen, zumindest in einem Teil der Experimente, LN18-Zellen verwendet, da der Effekt der EGFR-Suppression auf Gliome mit normalem EGFR-Expressionsniveau (U373 MG) und mit EGFR-Überexpression (LN18; Schlegel et al., 2000) untersucht werden sollte. Um die Effektivität der siRNA-Behandlung einschätzen zu können, wurde zum Vergleich der spezifische EGFR-Inhibitor AG1478 (Tyrophostin AG1478; 4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline) eingesetzt. Dieser synthetische Wirkstoff gehört der Substanzklasse der Quinazoline an, aus der auch ZD 1839 (Gefitinib, „Iressa“) stammt, ein EGFR-Inhibitor, der im Jahr 2003 als erstes EGFR-spezifisches Therapeutikum zur Behandlung bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom zugelassen wurde. AG1478 bindet mit hoher Spezifität an EGFR (IC<sub>50</sub>: 0,003 µM; die IC<sub>50</sub> für das zweite Mitglied der EGFR-Familie ErbB2 liegt bei über 100 µM (Datenblatt des Vertreibers Calbiochem)). Seine Wirksamkeit beruht auf der kompetitiven Bindung an die ATP-Bindestelle der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors. Die Phosphorylierung von Zielproteinen wird so verhindert und die EGFR-Signaltransduktion unterbunden. Die Menge an AG1478, bei der eine Hemmung der Proliferation der Gliomzellen auftrat, wurde in Vorversuchen bestimmt und als Maß für eine effektive und spezifische EGFR-Blockade angesehen. Die hier ermittelte Endkonzentration betrug 20 µM. DMSO als Lösungsmittel für AG1478 wurde in gleicher Menge wie AG1478 zu den Zellen gegeben und diente als Kontrolle. Sowohl im Durchflusszytometer als auch im Western Blot (nicht gezeigt) zeigte sich wie erwartet bei Einsatz eines kompetitiven Inhibitors keine Veränderung der EGFR-Proteinmenge nach Zugabe von AG1478. Andererseits konnte beobachtet werden, dass nach Zugabe von AG1478 bei Stimulation mit *epidermal growth factor* (EGF) keine Internalisierung der Rezeptoren mehr stattfand (vgl. Abb. 19).



**Abb. 19: EGFR-Expression auf U373 MG-Zellen mit und ohne Zugabe von *epidermal growth factor* (EGF)**

Die EGFR-Expression von U373 MG-Gliomzellen wurde 72 h nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Zellen (Transfektion mit 10 nM spezifischer siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 einerseits, oder Zugabe von 20  $\mu$ M EGFR-Inhibitor AG1478 bzw. DMSO als Kontrolle andererseits) im Durchflusszytometer untersucht. Zur Hälfte der Proben wurde 15 min vor der Immunfärbung EGF (20 ng/ml) ins Medium gegeben, um die Auswirkung der unterschiedlichen Behandlungen auf die EGFR-Internalisierung nachzuweisen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Die Werte wurden auf die Fluoreszenz unbehandelter Zellen normalisiert.

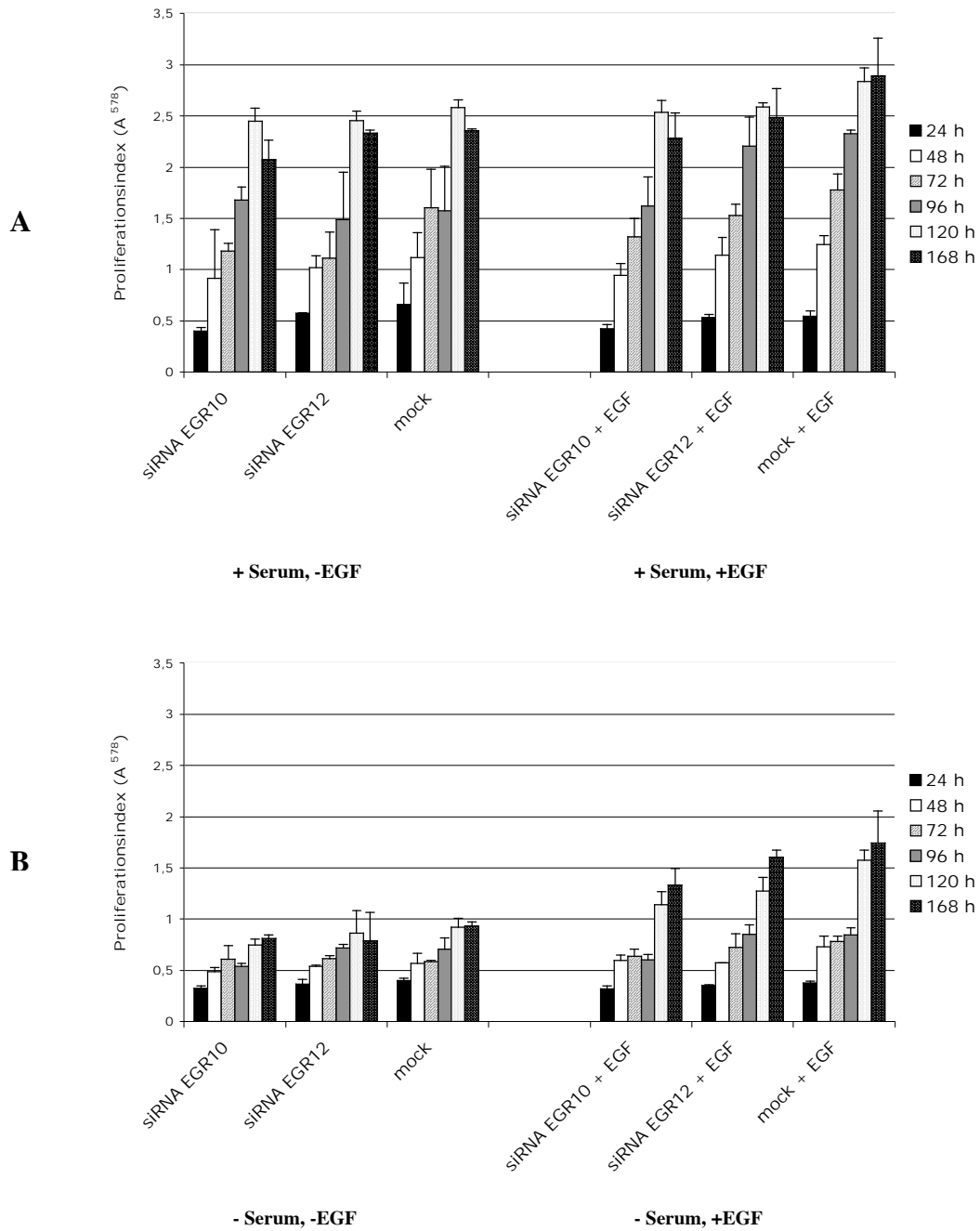
### **3.3.1 Zellproliferation**

Es lag nahe, als erstes Kriterium für eine mögliche Einschränkung des Tumorwachstums und für die Erzeugung eines weniger malignen Phänotyps in den Gliomzellen, den Einfluss der verminderten EGFR-Expression auf deren Proliferationsverhalten zu untersuchen. Zwei Nachweismethoden wurden hierfür angewandt. Entweder wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer nach Anfärben mit Trypanblau ausgezählt (s. 2.2.1.6.1), oder die Zellmasse über den Kristallviolett-Assay (s. 2.2.1.6.2) bestimmt. Bei letzterem Verfahren wurden nur adhärente, lebende Zellen angefärbt, während im Überstand schwimmende, potentiell nicht mehr viable Zellen nicht berücksichtigt wurden. Es wurden verschiedene Zelllinien und unterschiedliche Kulturbedingungen getestet.

### 3.3.1.1 Proliferation nach Standardtransfektion von siRNA EGR10

Die Proliferation wurde zum einen unter Standardbedingungen (DMEM + 10 % FCS) und zum anderen unter serumfreien Bedingungen (DMEM – FCS) mit und ohne Zugabe von *epidermal growth factor* (EGF; 20 ng/ml f. c.) untersucht. Durch die Zugabe von EGF sollte einerseits dessen prinzipiell mitogener Effekt auf die ausgewählten Gliomzelllinien nochmals gezeigt und andererseits durch die Verwendung serumfreier Medien eine Kompensation der potentiell durch die siRNA vermittelten EGFR-Hemmung durch im Serum enthaltene Wachstumsfaktoren unterbunden werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von EGF ins Medium einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation hatte, der vor allem unter serumfreien Bedingungen deutlich wurde. Eine Herabregulierung der EGF-Rezeptors durch siRNA EGR10 hatte jedoch in keinem der unterschiedlichen Versuchsansätze einen negativen Einfluss auf das Wachstum der U373 MG-Gliomzellen (vgl. Abb. 20).

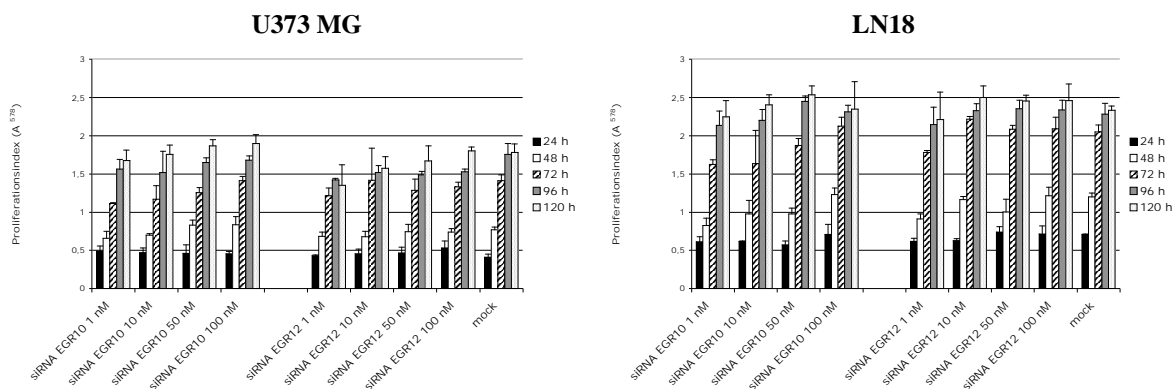


**Abb. 20: Proliferation von U373 MG-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen**

U373 MG-Gliomzellen wurden mit je 10 nM siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 transfiziert und die Proliferation in den unterschiedlichen Medien (jeweils mit und ohne Zugabe von 20 ng/ml EGF) wurde durch Färbung der Zellen im Kristallviolett-Assay bestimmt (Absorption bei 578 nm); Die Abbildung zeigt ein typisches Experiment, wobei jede Bestimmung dreifach durchgeführt wurde (n=3). Insgesamt wurde der Proliferationsassay dreimal wiederholt. **A:** DMEM + 10 % FCS; **B:** DMEM serumfrei.

### 3.3.1.2 Proliferation nach Transfektion von erhöhten Konzentrationen siRNA EGR10

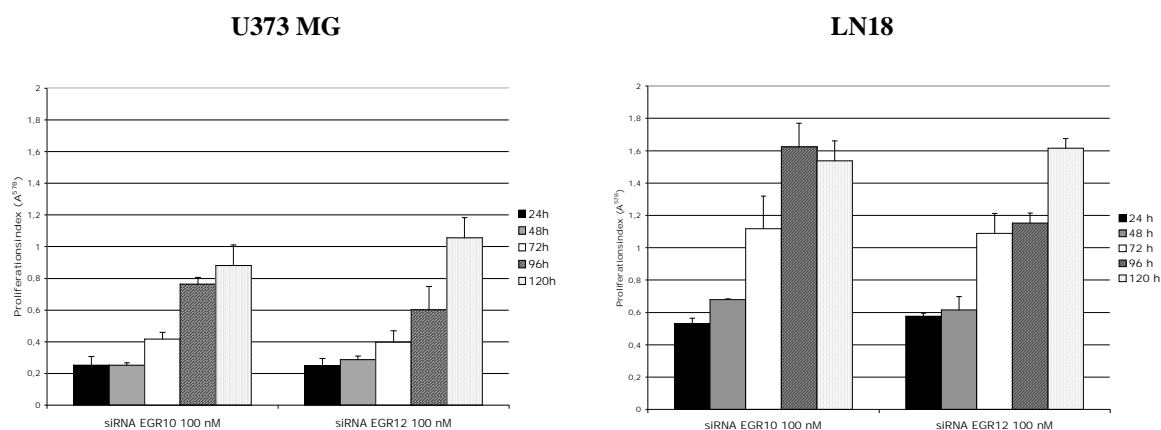
Da in den Experimenten zur Bestimmung der Regulation der EGFR-Proteinexpression keine weitere Verstärkung des Effekts bei Konzentrationen von mehr als 10 nM siRNA EGR10 stattfand (vgl. 3.2.2.1), wurde EGR10 in allen Experimenten zunächst in dieser Endkonzentration verwendet. Im folgenden wurde dennoch versucht, durch Erhöhung der Konzentration auf bis zu 100 nM einen proliferationshemmenden Effekt zu erreichen. U373 MG- und LN18-Zellen wurden einerseits wieder unter Standardkulturbedingungen und andererseits in serumfreiem Medium mit Zusatz von EGF getestet (vgl. Abb. 21, 22). Auch der Einsatz von höheren siRNA-Konzentrationen bis 100 nM erbrachte in keiner der beiden untersuchten Zelllinien weder im normalen Kulturmedium noch unter serumfreien Bedingungen mit EGF als einzigem Wachstumsfaktor einen Unterschied in der Proliferationsrate. Parallel durchgeführte Versuche, bei denen die Gesamtzellzahl einschließlich der abgestorbenen Zellen durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer (s. 2.2.1.6.1) ermittelt wurde, erbrachten das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 21: Proliferation von U373 MG- und LN18-Zellen in DMEM (10 % FCS) nach Transfektion mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen**

U373 MG- und LN18-Zellen wurden mit siRNA-Konzentrationen zwischen 1 nM und 100 nM transfiziert, anschließend wurde die Proliferationsrate in Vollmedium durch Quantifizierung im Kristallviolett-Assay (Absorption bei 578 nm) ermittelt. Gezeigt ist ein typisches Experiment, jede Bestimmung wurde dreifach angesetzt und der Proliferationsassay insgesamt dreimal durchgeführt (n=3).





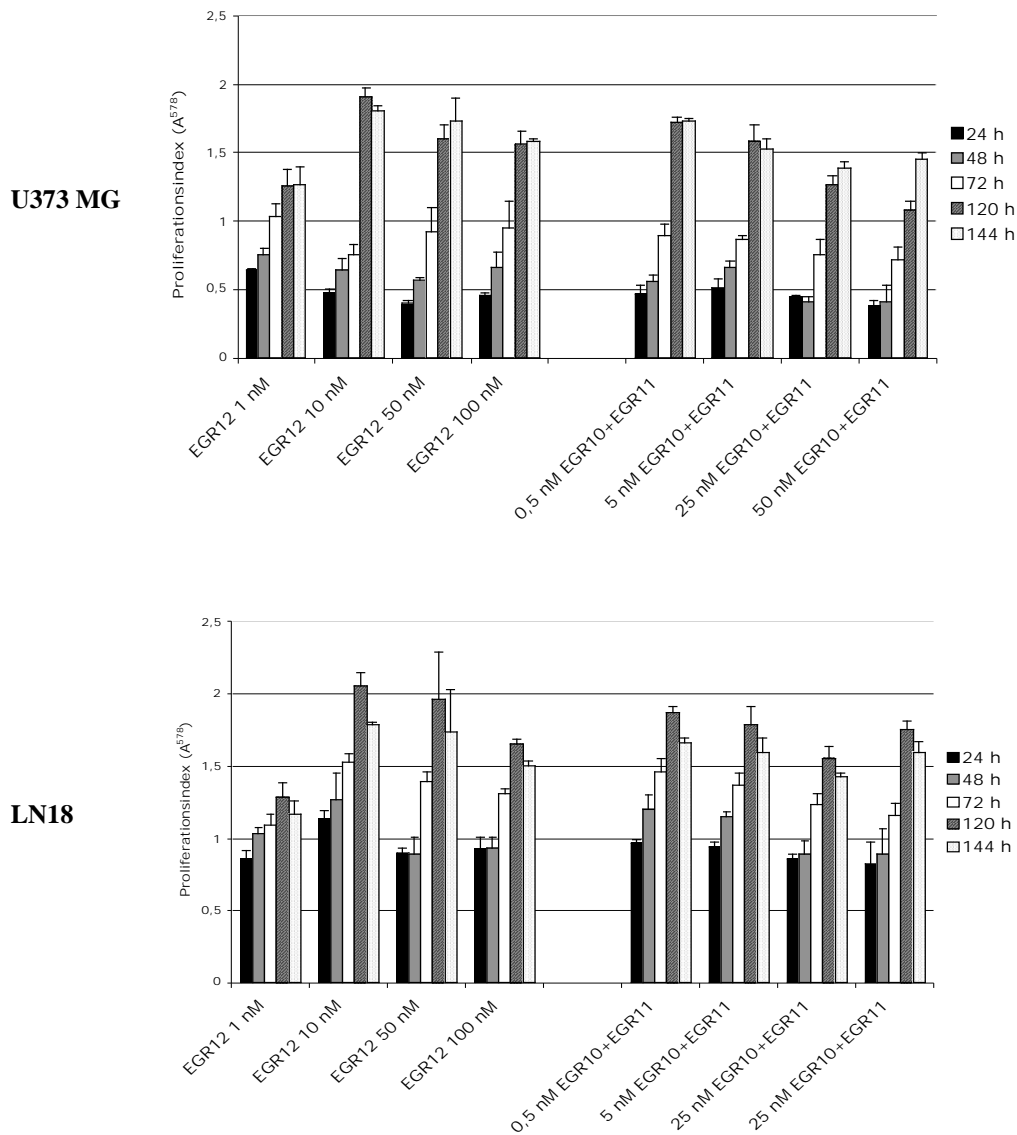
**Abb. 22: Proliferation von U373 MG- und LN18-Zellen in serumfreiem DMEM + EGF (20 ng/ml) nach Transfektion mit 100 nM siRNA EGR10**

Beide Zelllinien wurden mit 100 nM siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 transfiziert und in serumfreiem Medium unter Zugabe von 20 ng/ml EGF bis 5 Tage nach Transfektion inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung der Proliferation im Kristallviolett-Assay (Absorption bei 578 nm). Jede Bestimmung wurde dreifach angesetzt und der Proliferationsassay insgesamt dreimal durchgeführt (n=3).

### 3.3.1.3 Proliferation nach kombinierter Transfektion von siRNA EGR10 und EGR11

Ein weiterer Ansatz bestand darin, durch Kombination der beiden EGFR-spezifischen siRNAs für die eine Herabregulation des Proteins nachgewiesen worden war (EGR10 und EGR11; vgl. Abb. 9, Abb. 13), eine Proliferationshemmung zu vermitteln. Der Einsatz von zwei unterschiedlichen siRNAs an verschiedenen Abschnitten der Zielsequenz hatte in einem vergleichbaren Ansatz zu einer Addition der einzelnen inhibierenden Effekte geführt, sowohl auf regulatorischer als auch auf funktioneller Ebene (Ji et al., 2003).

Dazu wurden U373 MG- und LN18-Gliomzellen zum einen mit Kontroll-siRNA EGR12 (1 nM/ 10 nM / 50 nM / 100 nM), zum anderen mit einer Kombination der beiden EGFR-regulierenden siRNAs (jeweils 0,5 nM / 5 nM / 25 nM / 50nM) unter Standardbedingungen transfiziert und die Proliferation der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im Kristallviolett-Assay bestimmt (vgl. Abb. 23).



**Abb. 23: Proliferation von U373 MG- und LN18-Gliomzellen nach kombinierter Transfektion von EGFR-spezifischen siRNAs EGR10 und EGR11**

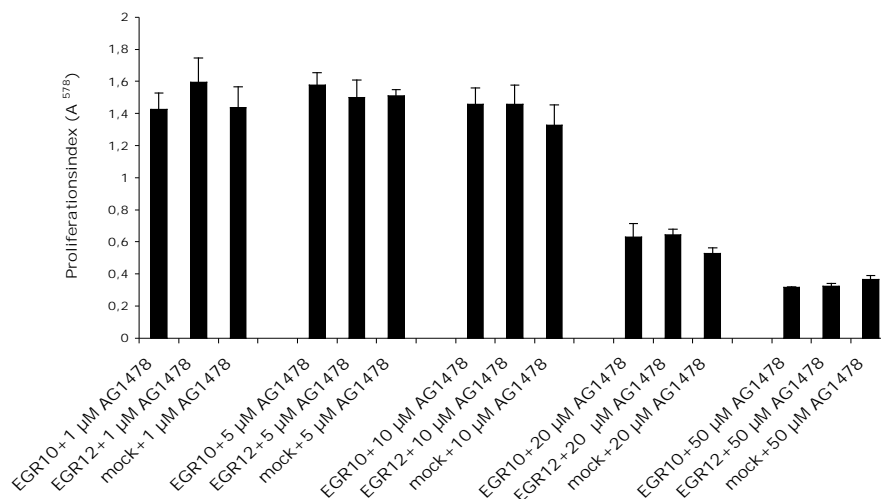
Beide Gliomzelllinien wurden mit 1-100 nM Kontroll-siRNA EGR12, bzw. mit einer Kombination der beiden inhibitorisch wirksamen siRNAs EGR10 und EGR11 transfiziert. Die Endkonzentrationen der einzelnen siRNAs lag hierbei zwischen 0,5 nM und 50 nM, so dass die insgesamt eingesetzte siRNA-Menge derjenigen der Kontrollgruppe entsprach. Die Proliferation wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bis zu 6 Tage nach Transfektion im Kristallviolett-Assay (Absorption bei 578 nm) bestimmt. Zum Zeitpunkt 144 h war keine Erhöhung der Zellmasse mehr möglich, da nach 120 h die Zellen bereits zu 100 % konfluent waren. Jede Bestimmung wurde dreifach durchgeführt.

Wie in den vorangegangenen Versuchen zur Proliferation konnte auch bei der Kombination der beiden verschiedenen EGFR-spezifischen siRNAs kein inhibitorischer Effekt festgestellt werden. Es bestand außerdem kein Unterschied zwischen den

Proliferationsraten der Zellen, die mit der siRNA-Kombination behandelt worden waren gegenüber den Zellen, die nur EGR10 bzw. EGR11 in den entsprechenden Konzentrationen erhalten hatten (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.1.4 Proliferation bei Kombination von siRNA EGR10 mit AG1478

Eine mögliche Kooperation der beiden EGFR-Blocker, siRNA EGR10 und Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478, und eine dadurch bedingte Verstärkung des proliferationshemmenden Effekts des Inhibitors (Wachstumshemmung bereits bei niedrigeren AG1478-Konzentrationen) sollte durch Transfektion von siRNAs bei gleichzeitiger Gabe verschiedener Konzentrationen von AG1478 untersucht werden. Dafür erfolgte zunächst die Transfektion von U373 MG- und LN18-Zellen mit 10 nM EGR10 bzw. EGR12, nach 6 h wurde auf DMEM-Medium mit 10 % FCS und den verschiedenen AG1478-Konzentrationen gewechselt und die Proliferation zu verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h) im Kristallviolett-Assay bestimmt.



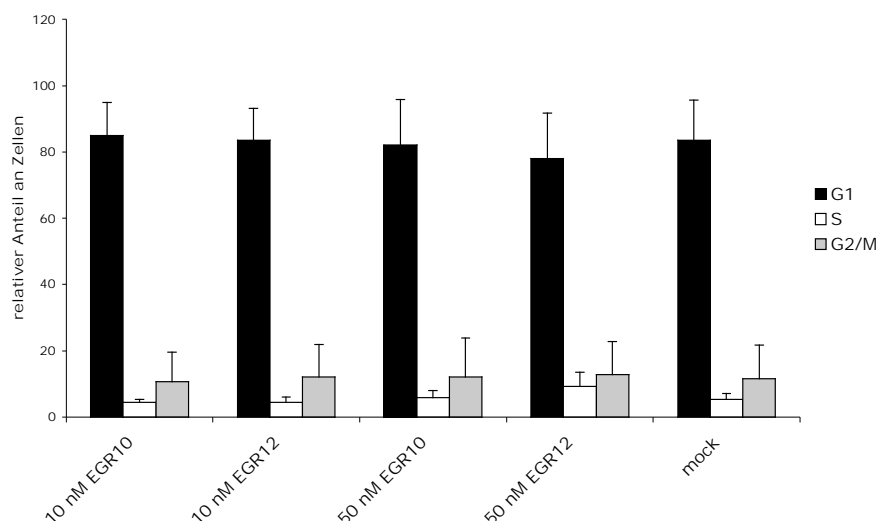
**Abb. 24: Proliferation von U373 MG-Zellen nach Transfektion mit siRNA und gleichzeitiger Zugabe von AG1478**

U373 MG-Gliomzellen wurden zunächst mit 10 nM EGFR-spezifischer siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und erhielten 6 h nach Transfektion beim Wechsel von Transfektions- auf Vollmedium gleichzeitig AG1478 in unterschiedlichen Konzentrationen (1 bis 50 µM f. c.). Zellen die nur Transfektionsmittel (mock) und AG1478 erhielten, dienten als weitere Kontrolle. Anschließend wurde die Proliferationsrate im Kristallviolett-Assay (Absorption bei 578 nm) bestimmt, um einen möglichen additiven Effekt der beiden EGFR-Inhibitoren siRNA EGR10 und AG1478 zu untersuchen. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Werte zum Zeitpunkt 96 h nach Transfektion (n=3).

Es konnte kein additiver Effekt der beiden EGFR-Inhibitoren festgestellt werden. Eine Hemmung der Proliferation von U373 MG-Zellen trat, wie in den Vorversuchen ermittelt, bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  AG1478 auf. Die parallel dazu in der LN18-Zelllinie durchgeführten Versuche erbrachten das gleiche Ergebnis (nicht gezeigt).

### 3.3.2 Zellzyklusanalyse

Ein weiterer Ansatz, um die Proliferation der Gliomzellen zu charakterisieren, war die Färbung mit Propidiumiodid (PI), um die DNA-Menge in den Zellen und somit die Phase des Zellzyklus zu bestimmen, in der die Zellen sich zum Zeitpunkt der Untersuchung befanden (vgl. 2.2.1.7). Bei einem Einfluss der EGFR-Depletion auf die Proliferation sollte sich bei dessen Hemmung durch die siRNA ein erhöhter Anteil von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase befinden (G<sub>1</sub>-Arrest). Dies wurde an U373 MG-Zellen 96 h nach Transfektion mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 nM bzw. 50 nM) siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 untersucht. Es ließ sich jedoch keine Veränderung in der Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen nachweisen (vgl. Abb. 25).



**Abb. 25: Zellzyklusanalyse in U373 MG-Zellen nach Transfektion mit siRNA EGR10**

U373 MG-Gliomzellen wurden mit 10 bzw. 50 nM (f. c.) siRNA EGR10 oder Kontroll-siRNA EGR12 transfiziert, nach 96 h wurde der prozentuale Anteil der Zellen an den einzelnen Phasen des Zellzyklus durch Färbung mit Propidiumiodid im Durchflusszytometer bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Zudem konnte durch die PI-Färbung und die durchflusszytometrische Untersuchung der Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur ermittelt werden, da in diesem Fall eine charakteristische Zellpopulation (Sub-G<sub>1</sub>-Fraktion) nachzuweisen ist. Bei einem Vergleich der EGR10- bzw. EGR12-transfizierten Zellen war keine vermehrte Apoptose in den EGFR-depletierten Ansätzen feststellbar. Dieses Ergebnis war in Übereinstimmung mit den in den Kristallviolett-Assays gewonnenen Daten, bei denen ebenfalls nur viable Zellen detektiert wurden und sich kein Unterschied in der Zellmasse feststellen ließ (vgl. 3.3.1).

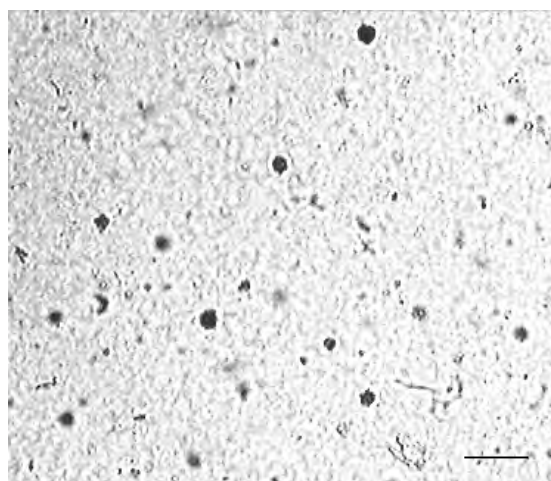
### **3.3.3 Kolonienbildung im Soft Agar**

Viele untransformierte Zellen proliferieren *in vitro* nur auf einer soliden Unterlage unter Ausbildung eines einschichtigen Zellrasens (*monolayer*) und stellen das Wachstum ein, wenn sie sich gegenseitig berühren. Neben dem Verlust dieser sog. Kontaktinhibition ist ein wesentliches Merkmal für einen transformierten Phänotyp der Verlust der *anchorage dependence*, so dass die Zellen für ihr Wachstum und ihre Vermehrung keine Anheftung an eine feste Oberfläche mehr benötigen und unabhängig sind von etwaigen Wachstumsfaktoren der extrazellulären Matrix. Dieses Verhalten lässt sich im sog. *colony formation assay* untersuchen. Das normale Kulturmedium erhält durch Zugabe von Agar eine gelartige Konsistenz, wirkt so hemmend auf die Beweglichkeit der Zellen und erlaubt die Ausbildung von Kolonien aus Einzelzellen. Zellen aus solchen Kolonien können Tumore *in vivo* ausbilden und eine Abnahme der Kolonienzahl nach Behandlung mit einem zytotoxischen Agens wird als Maß für dessen Wirksamkeit angesehen.

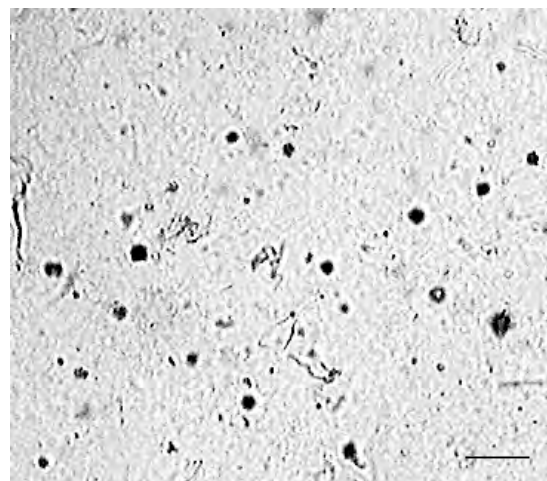
Hier sollte untersucht werden, ob humane Gliomzellen (U373 MG) nach Herunterregulierung des EGFR durch Transfektion mit siRNA EGR10 bzw. durch Blockade mit AG1478 eine verminderte Fähigkeit zur Kolonienbildung in halbfestem Medium aufweisen. Die Gliomzellen wurden mit siRNA EGR10 bzw. EGR12 (f. c. 10 nM) transfiziert oder unter Zugabe von AG1478 (20 µM) bzw. DMSO 96 h kultiviert und anschließend wie unter 2.2.1.8 beschrieben in halbfestem Medium ausgesät. Zusätzlich wurden siRNA-transfizierte Zellen einmalig mit Medium überschichtet, das AG1478 in einer Konzentration von 20 µM enthielt, um möglicherweise einen additiven Effekt der beiden EGFR-Regulatoren EGR10 bzw. AG1478 nachzuweisen. AG1478 vorbehandelte

Zellen erhielten ebenfalls einmalig am Tag der Aussaat AG1478 in den Überstand. Das Medium wurde einmal wöchentlich ausgetauscht und nach 5 Wochen die Anzahl der gebildeten Kolonien mit einem Durchmesser  $\geq 20 \mu\text{m}$  ausgezählt (vgl. 2.2.1.8).

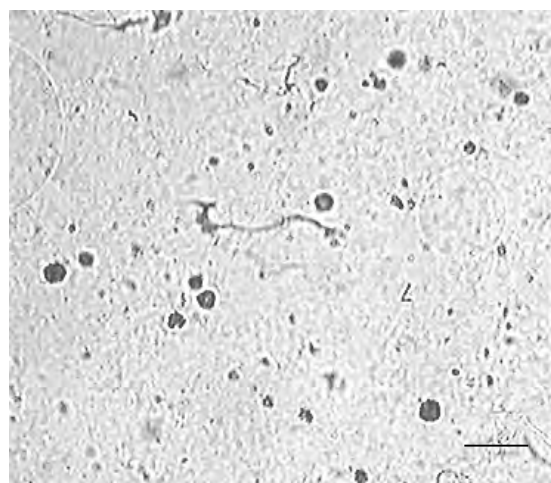
Abbildung 26 zeigt die Kolonienbildung der U373 MG-Zellen in den verschiedenen Behandlungsgruppen nach fünfwöchiger Inkubation.



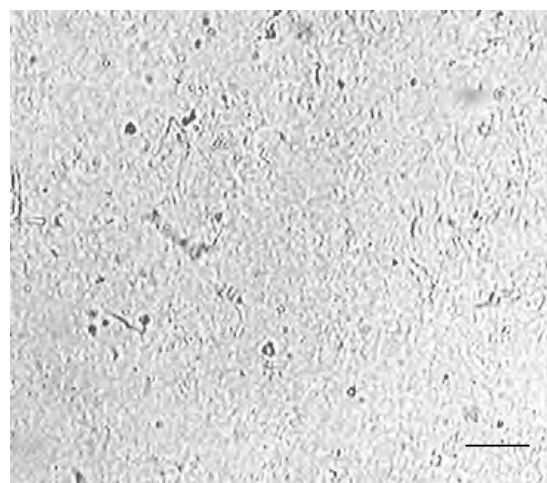
Kontroll-siRNA EGR12



EGFR-siRNA EGR10



DMSO

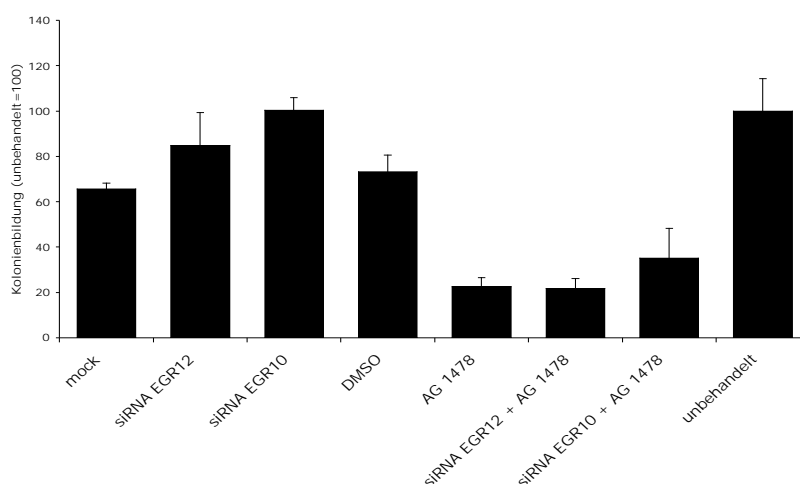


AG1478

**Abb. 26: Kolonienbildung von U373 MG-Gliomzellen im Soft Agar**

U373 MG-Zellen wurden standardmäßig mit EGFR-spezifischer siRNA EGR10 bzw. mit Kontroll-siRNA EGR12 transfiziert oder mit dem kompetitiven EGFR-Inhibitor AG1478 behandelt (Kontrollbehandlung mit DMSO) und 96 h später in einer Dichte von  $10^4$  Zellen je Vertiefung (6-well-Platte) ausgesät. Die Zellen wurden mit DMEM (10 % FCS) überschichtet und erhielten in der AG1478-Behandlungsgruppe einmalig AG1478 ( $20 \mu\text{M}$  f. c.) bzw. DMSO in der Kontrollgruppe in den Überstand. Das Medium wurde einmal wöchentlich gewechselt und gebildete Kolonien mit einem Durchmesser über  $20 \mu\text{m}$  nach fünf Wochen ausgezählt; Maßstab:  $250 \mu\text{m}$ .

Es war deutlich zu erkennen, dass die U373 MG-Zellen durch die Transfektion mit EGFR-spezifischer siRNA in ihrer Fähigkeit Kolonien im Soft Agar auszubilden nicht eingeschränkt wurden. Hingegen hatte die Behandlung mit AG1478 einen deutlich inhibierenden Effekt, sowohl in den AG1478-vorbehandelten Kulturen, als auch in den Ansätzen, die zunächst nur mit siRNAs transfiziert worden waren und AG1478 dann einmalig in den Überstand erhielten.



**Abb. 27: Quantifizierung der Kolonienbildung von U373 MG-Gliomzellen im Soft Agar**

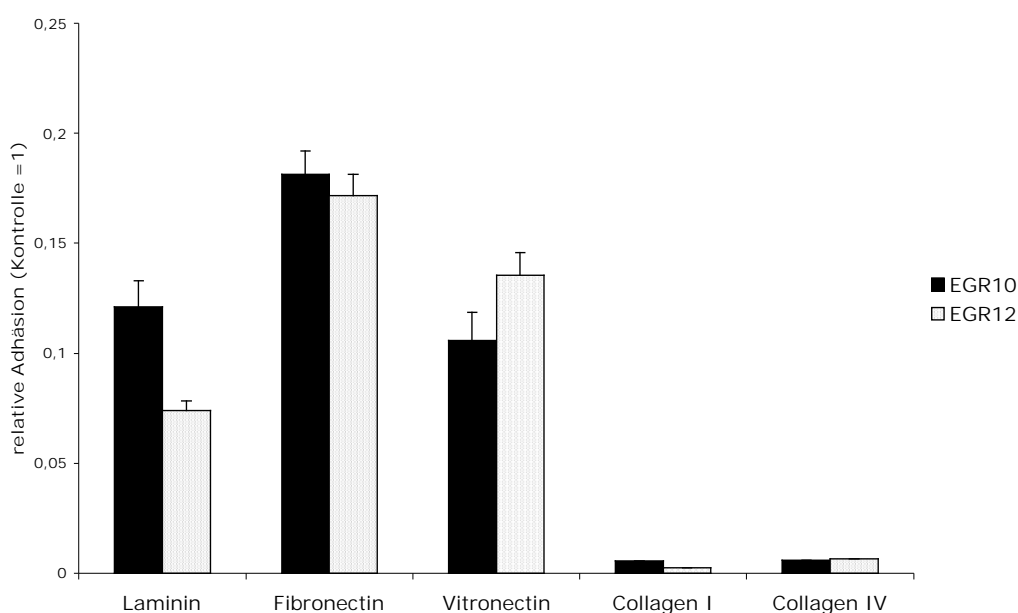
Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die Kolonienbildung unbehandelter Zellen wurde gleich 100 % gesetzt; mock: nur mit Transfektionsmittel behandelt.

### **3.3.4 Adhäsion an unterschiedliche Proteine der extrazellulären Matrix**

Die Veränderung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte stellt ein Kennzeichen für die Transformation einer Zelle dar. EGFR wurde mit Änderungen im Adhäsionsverhalten verschiedener Zelltypen in Verbindung gebracht. Hier sollte untersucht werden, ob die verminderte EGFR-Expression nach Transfektion der U373 MG Gliomzellen Einfluss auf deren Fähigkeit zur Bindung an verschiedene Oberflächenproteine hatte.

Dafür wurden die Zellen wie üblich mit siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 (jeweils 10 nM f. c.) transfiziert und nach 72 h Inkubation in Vollmedium auf serumfreies DMEM umgestellt. Nach weiteren 24 h erfolgte eine sechsstündige Stimulation der Zellen mit EGF (20 ng/ml) und die anschließende Aussaat auf den mit unterschiedlichen

Proteinen der extrazellulären Matrix beschichteten 96-*well*-Platten (vgl. 2.2.1.9) in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen je Vertiefung. In drei voneinander unabhängigen Experimenten wurde die Adhäsion an Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Collagen I und Collagen IV im CytoMatrix Assay (Chemicon, Hofheim) nach Angaben des Herstellers getestet. BSA-beschichtete Vertiefungen in den Platten dienten als Negativ-Kontrolle. Die Auswertung erfolgte nach einstündiger Inkubation bei 37°C durch Färbung der anhaftenden Zellen mit Kristallviolett und Messung der Absorption bei 578 nm. Die Werte der negativen BSA-Kontrollen wurden als Hintergrund von allen anderen Werten abgezogen. Da nach Ablauf der Inkubationszeit die nicht anhaftenden Zellen abgenommen wurden und in einer separaten Platte anschließend adhärten, konnten die Zellen aus der BSA-Kontrolle als Positivwert (da 100 % der ursprünglich ausgesäten Zellen) herangezogen werden.



**Abb. 28: Adhäsion von U373 MG-Gliomzellen an unterschiedliche Matrixproteine**

Die Adhärenz der U373 MG-Zellen wurde 96 h nach Transfektion mit 10 nM siRNA EGR10 bzw. siRNA EGR12 im Cytomatrix Screen Kit bestimmt. Je  $2 \times 10^4$  Zellen wurden 1 h bei 37°C in einem mit den einzelnen Proteinen beschichteten Kulturgefäß inkubiert, anschließend wurde der Anteil der adhärten Zellen durch Färbung mit Kristallviolett bestimmt. Mit Rinderserumalbumin (BSA) beschichtete Platten dienen als Negativkontrolle, die hiervon abgenommenen und separat gefärbten Zellen (entsprechend 100 % der ursprünglich ausgebrachten Zellmenge) wurden gleich 1 gesetzt und die Werte der anderen Adhäsionsversuche darauf normalisiert. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente in jeweils 5 Ansätzen durchgeführt (n=3).



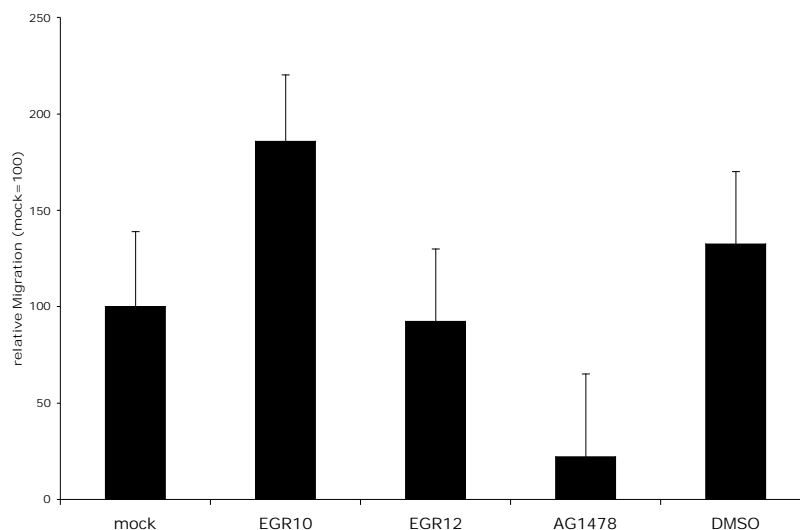
Es zeigte sich zum einen, dass auf den Collagenen unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Adhäsion der U373 MG-Zellen stattfand. Bei Laminin, Fibronectin und Vitronectin kam es zu einer Anheftung von 10 % – 20 % der Zellen. Obwohl eine leichte Tendenz zu einer verstärkten Anheftung an Laminin nach EGFR-siRNA-Transfektion beobachtet werden konnte, war kein signifikanter Unterschied zwischen den mit spezifischer EGFR-siRNA behandelten Zellen und der Kontrollgruppe feststellbar (vgl. Abb. 28)

### **3.3.5 Invasion und Migration von U373 MG-Zellen**

Die Fähigkeit einer Tumorzelle zum Abbau der sie umgebenden extrazellulären Matrix und die anschließende Durchquerung der Endothelzellmembran mit darauf folgender Metastasierung stellen ein Maß für die Malignität dieser Zelle dar. Der Effekt der Regulation des EGFR auf die Migrations- und Invasionseigenschaften der Gliomzellen wurde im *Boyden-Chamber-Assay* (vgl. 2.2.1.10) untersucht. Hierbei mussten die Zellen zunächst eine Matrigel-Schicht überwinden und dann durch die Mikroporen der Membran wandern. Als Chemoattraktans diente konditioniertes Fibroblastenmedium. Es wurden U373 MG-Zellen mit 10 nM (f. c.) EGFR-spezifischer siRNA EGR10 oder Kontroll-siRNA EGR12 transfiziert und einerseits mit Zellen verglichen, die nur Transfektionsmittel erhielten (mock), und andererseits mit Zellen, die mit 20 µM AG1478 behandelt wurden. Als Kontrolle für die AG1478-Behandlung diente die Zugabe von DMSO. Es wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils drei Ansätzen miteinander verglichen.

Es zeigte sich zunächst, dass alle Kontrollen (mock, siRNA EGR12, DMSO) eine relativ gute Übereinstimmung in der Anzahl der gewanderten Zellen aufwiesen, so dass eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet war. Außerdem ließ sich feststellen, dass die siRNA-vermittelte Herunterregulierung des EGFR nicht ausreichend war, um eine verminderte Invasion und Migration der U373 MG-Gliomzellen zu bewirken. Es ließ sich sogar eher noch ein verstärkender Effekt in der mit siRNA EGR10-transfizierten Population gegenüber den Kontrollgruppen beobachten. Dagegen hatte die

Behandlung der Zellen mit AG1478 eine deutliche Reduktion in der Zahl der gewanderten Zellen zur Folge.



**Abb. 29: Invasion und Migration von U373 MG-Zellen im *Boyden-Chamber-Assay***

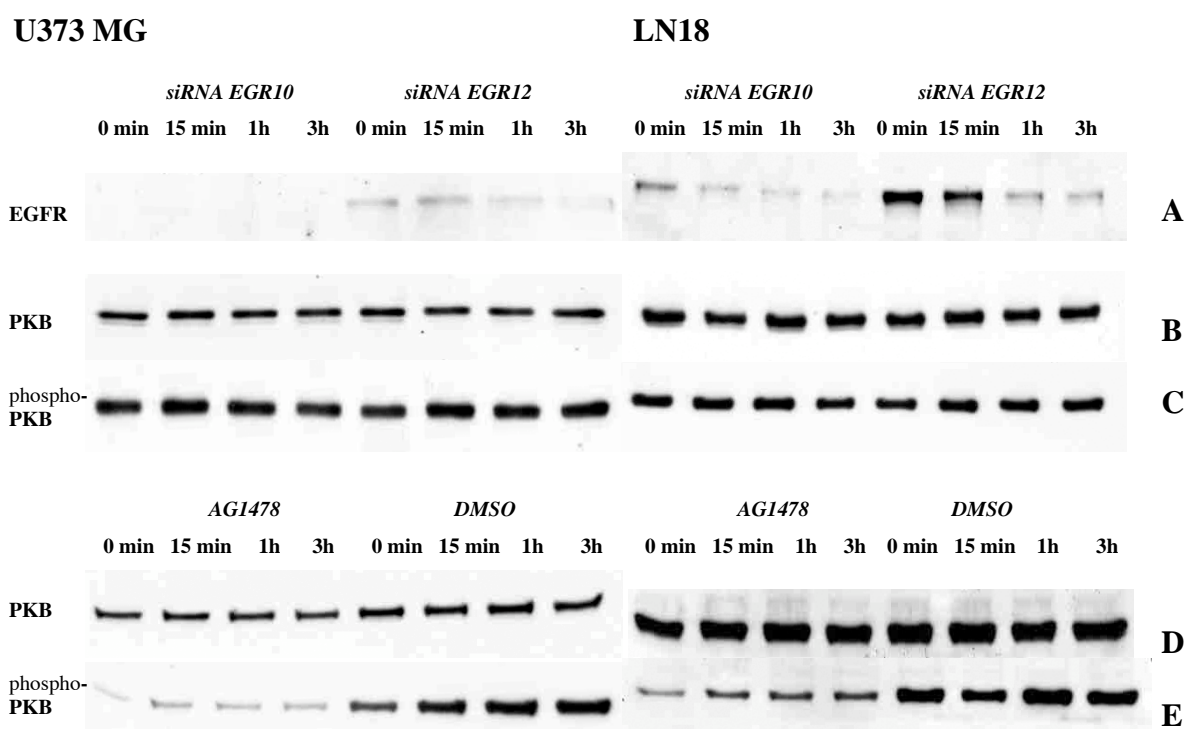
U373 MG-Gliomzellen wurden nach Transfektion mit 10 nM siRNA EGR10 bzw. EGR12 oder nach Zugabe von 20  $\mu$ M AG1478/DMSO 96 h in DMEM + 10 % FCS kultiviert und anschließend ihr Migrationsverhalten in der Boyden-Kammer untersucht. Bei jeder Behandlungsgruppe wurden drei Bestimmungen angesetzt, insgesamt wurde der Assay dreimal unabhängig durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aller Quantifizierungen (n=9).

### **3.3.6 Einfluss auf EGFR-abhängige Signalwege**

#### **3.3.6.1 Regulation von Proteinkinase B**

Die EGFR-abhängige Aktivierung von Phospho-Inositol-3-Kinase (PI(3)K) führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase B (PKB/AKT) und stellt einen der Hauptwege der EGFR-vermittelten Signaltransduktion dar. Besondere Bedeutung wird dem PKB-Signalweg in der Vermittlung antiapoptotischer Stimuli beigemessen (Besson und Yong, 2001; Brunet et al., 1999; Cardone et al., 1998; Datta et al., 1997) und seine Aktivierung könnte zur Resistenz von Gliomzellen gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie beitragen. Um zu untersuchen, ob die EGFR-Regulation durch siRNA

EGR10 Einfluss auf den Aktivierungszustand des nachgeschalteten Signalmoleküls Proteinkinase B hatte, wurden U373 MG- und LN18-Gliomzellen zunächst mit 10 nM (f. c.) siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA unter Standardbedingungen transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde auf serumfreies Medium gewechselt und weitere 24 h später die Zellen mit 20 ng/ml *epidermal growth factor* (EGF) stimuliert. Vor der EGF-Gabe (t=0 min) und zu verschiedenen Zeitpunkten danach wurde das Gesamtprotein isoliert und anschließend die PKB-Aktivierung mit einem für das phosphorylierte Protein spezifischen Antikörper im Western Blot untersucht. Zur Kontrolle wurde Gesamt-PKB nachgewiesen.



**Abb. 30: Aktivierung von Proteinkinase B (PKB/AKT) in U373 MG- und LN18-Gliomzellen**

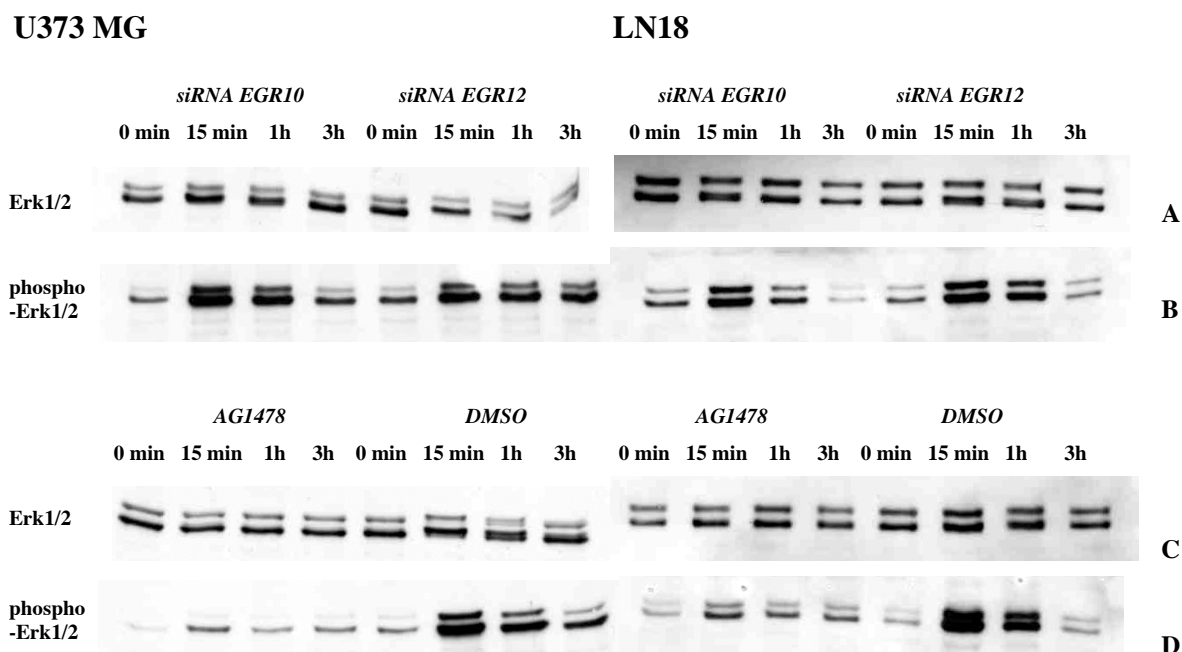
U373 MG- und LN18-Zellen wurden entweder mit siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 (10 nM f. c.) transfiziert oder mit dem spezifischen EGFR-Inhibitor AG1478 (20  $\mu$ M f. c.) behandelt. 72 h später erfolgte ein Wechsel zu serumfreien Bedingungen und weitere 24 h danach eine Stimulation der Zellen mit *epidermal growth factor* (EGF, 20 ng/ml). Das Gesamtprotein wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach EGF-Gabe isoliert und der Aktivierungszustand von PKB/AKT im Western Blot untersucht.

**A:** EGFR-Expression nach Transfektion mit EGR10 zur Kontrolle der Wirksamkeit der siRNA; **B:** PKB unphosphoryliert nach Transfektion mit siRNAs EGR10, EGR12; **C:** phospho-PKB nach Transfektion mit siRNAs EGR10, EGR12; **D:** PKB unphosphoryliert nach AG1478/DMSO-Behandlung; **E:** phospho-PKB nach AG1478/DMSO-Behandlung.

Es zeigte sich, dass der EGFR in beiden Zelllinien durch die Transfektion mit siRNA EGR10 substantiell herunterreguliert worden war und die Proteinmenge im Verlauf der Untersuchung nach der Stimulation mit EGF durch Internalisierung und Degradierung noch zusätzlich abnahm (vgl. Abb. 30, A). Die RNAi-vermittelte verringerte EGFR-Expression hatte jedoch keinen Einfluss auf die Menge an aktivierter Proteinkinase B (vgl. Abb. 30, C). Wie für LN18-Zellen schon gezeigt (Schlegel et al., 2000), lag auch in U373 MG-Zellen das Protein konstitutiv phosphoryliert vor (starke phospho-PKB-Expression unter serumfreien Bedingungen auch ohne EGF-Stimulation; vgl. Abb. 30 C, E). Dies könnte im Fall der U373 MG-Linie durch das Fehlen des Tumorsuppressors PTEN bedingt sein, der ein negativer Regulator des PKB/AKT-Signalwegs ist (Stambolic et al., 1998) und dessen Deletion mit einer konstitutiven Phosphorylierung von PKB in Verbindung gebracht wurde (Schlegel et al., 2000). Bei Zugabe des spezifischen EGFR-Inhibitors AG1478 ließ sich jedoch in beiden Zelllinien eine deutliche Verminderung von phospho-PKB gegenüber der DMSO-Kontrolle nachweisen.

#### 3.3.6.2 Regulation der MAP-Kinasen ERK1/2

Ein weiterer Signalweg, der von EGFR aktiviert werden kann, ist die Kaskade der *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) über Ras und MEK1/2 zu ERK1/2 (extrazellulär-regulierte Kinasen 1/2, MAPK p44/p42) wodurch eine Vielzahl zellulärer Antworten wie Proliferation und Differenzierung hervorgerufen werden können (Besson und Yong, 2001; Feldkamp et al., 1997). Analog zu den Untersuchungen des PI(3)K/PKB-Signalwegs (vgl. 3.3.6.1) sollte die Auswirkung der siRNA-vermittelten EGFR-Regulation auf die Aktivierung von Erk1/2 in den beiden Gliomzelllinien U373 MG und LN18 untersucht werden. Die Gliomzellen wurden wiederum mit 10 nM EGFR-spezifischer siRNA EGR10 bzw. Kontrolle EGR12 transfiziert und zum Vergleich parallele Kulturen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 (20 µM) bzw. DMSO behandelt. 72 h nach Transfektion wurde den Zellen das Serum entzogen und diese nach weiteren 24 h durch Zugabe von EGF (20 ng/ml) stimuliert. Zum Zeitpunkt 0 min (vor EGF-Zugabe) und zu mehreren Zeitpunkten nach Aktivierung mit EGF wurde das Gesamtprotein isoliert und die Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinasen Erk1/2 im Western Blot untersucht. Als Kontrolle wurde die Gesamt-Proteinmenge von Erk1/2 nachgewiesen.



**Abb. 31: Aktivierung von ERK1/2 in U373 MG- und LN18-Gliomzellen**

U373 MG und LN18-Zellen wurden mit EGFR-spezifischer siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 (10 nM f. c.) transfiziert oder mit AG1478 (20  $\mu$ M f. c.) behandelt. 72 h später erfolgte ein Medienwechsel zu serumfreien Bedingungen und weitere 24 h danach eine Stimulation der Zellen mit (20 ng/ml). Das Gesamtprotein wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach EGF-Gabe isoliert und der Aktivierungszustand von Erk1/2 im Western Blot untersucht.

**A:** Erk1/2 unphosphoryliert nach Transfektion mit siRNAs EGR10, EGR12; **B:** phospho-Erk1/2 nach Transfektion mit siRNAs EGR10, EGR12; **C:** Erk1/2 unphosphoryliert nach AG1478/DMSO-Behandlung; **D:** phospho-Erk1/2 nach AG1478/DMSO-Behandlung.

Während das Gesamt-Expressionsniveau von ERK1/2 unverändert blieb, kam es 15 min nach Zugabe von EGF sowohl in U373 MG als auch in LN18-Gliomzellen zu einer starken Aktivierung der MAP-Kinasen, die innerhalb des beobachteten Zeitraums von 3 h wieder auf den Ausgangswert zurückging. In den mit siRNA EGR10-transfizierten Zellen zeigte sich kein inhibitorischer Effekt auf die Kinasen-Phosphorylierung, wohingegen die Inkubation mit AG1478 in beiden Zelllinien einen starken Rückgang der Menge an aktivierten ERK1/2 bewirkte.

### **3.4 Genexpressionsanalyse durch Mikroarrays**

Um den Einfluss der EGFR-Regulation auf das Expressionsmuster der U373 MG-Zellen zu untersuchen, wurden GeneChip-Array-Analysen durchgeführt. Da die bis hierhin durchgeführten Experimente keinen Effekt auf den Phänotyp der Gliomzellen nachgewiesen hatten, sollte der Array Aufschluss über mögliche bislang nicht untersuchte Signalwege und zelluläre Funktionen geben. In drei unabhängigen Experimenten wurden U373 MG-Zellen jeweils mit siRNA EGR10 bzw. EGR12 (f. c. 10 nM) transfiziert und für insgesamt 96 h kultiviert (für detaillierte Versuchsbedingungen s. 2.2.3.4), da nach diesem Zeitraum die maximale EGFR-Proteinreduktion nachgewiesen worden war (vgl. 3.2.2) und man somit auch einen maximalen Einfluss auf die Expression von EGFR-regulierten Genen bei Stimulation mit einem spezifischen Liganden (EGF) erwarten konnte. Die RNA-Isolierung erfolgte 6 h nach Zugabe von EGF, da möglichst sowohl die Regulation von schnell, als auch von erst verzögert ansprechenden Genen erfasst werden sollte. Ein Verlauf der Expressionsänderung über mehrere Zeitpunkte wäre wünschenswert, war aus Kostengründen jedoch nicht durchführbar.

Mit den gewonnenen RNAs wurden insgesamt drei Experimente durchgeführt (vgl. 2.2.3.4.3). Dabei wurden pro Experiment jeweils zwei Arrays hybridisiert, einer mit RNA aus siRNA EGR10- und der andere mit RNA aus Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Es stellte sich zunächst heraus, dass es nicht möglich war, die EGR10-transfizierten Proben auf der einen und die EGR12-transfizierten auf der anderen Seite zusammenzufassen, da sich die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Experimente sehr viel stärker voneinander unterschieden als die Behandlungsgruppen. Somit war nur ein paarweiser Vergleich (10 vs. 12) der jeweils aus einem Experiment stammenden Arrays möglich. Im Anschluss daran wurden dann die drei Arraypaare miteinander auf Übereinstimmungen in ihren Expressionsmustern untersucht. Die hier verwendeten GeneChip Arrays (U133 A) von Affymetrix enthielten über 22.000 Einzelsonden mit 18.400 Transkripten von 14.500 Genen, 46,2 % der Transkripte waren durchschnittlich in den Proben nachweisbar (*present*). Es stellte sich heraus, dass die Unterschiede in den beiden Gruppen (siRNA EGR10 vs. Kontroll-siRNA EGR12) insgesamt nur sehr gering waren. Es wurden daher mehrere, dafür weniger stringente Kriterien zur Auswertung herangezogen und das Hauptaugenmerk auf die Reproduzierbarkeit auch kleiner Unterschiede gelegt

(vgl. 2.2.3.4.3). Dadurch ergab sich eine reproduzierbare differenzielle Expression von insgesamt 103 Transkripten (0,56 %) bzw. 95 Genen (0,66 %). 44 der Gene waren auf- und 51 herunterreguliert. Tabelle 11 zeigt eine Liste der unter Anwendung der in 2.2.3.4.3 aufgeführten Kriterien als signifikant verändert eingestuft Genen.

Gensymbol	Affymetrix Probe Set	Titel	-fache Änderung der Expression (RMA/MAS)	paired t-test (RMA/MAS)	Punkte
EGFR (*2)	201983_s_at 201984_s_at	Epidermal growth factor receptor	-4,98/-4,29 -1,48/-1,87	0,012/0,008 0,029/0,049	11 10
ARHI	215506_s_at	Ras homolog gene family member 1	-1,97/-1,95	0,037/0,076	10
ALDH1A3	203180_at	Aldehyd dehydrogenase family member A3	-1,79/-1,91	0,038/0,039	11
IQGAP1	213446_s_at	IQ motif containing GTPase activating protein 1	-1,77/-2	0,005/0,001	10
DUSP5	209457_at	Dual specificity phosphatase 5	-1,75/-1,74	0,048/0,004	10
ESDN	213865_at	Endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like protein	-1,68/-2,19	0,196/0,067	8
MCL1	200798_x_at	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	-1,66/-1,41	0,095/0,101	8
PTPN12	216915_s_at	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	-1,65/-1,55	0,08/0,066	10
MAP4K4(*2)	218181_s_at 206571_s_at	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	-1,6/-1,41 -1,37/-1,59	0,175/0,1 0,028/0,02	9 11
IL8	202859_x_at	Interleukin 8	-1,59/-1,41	0,036/0,09	10
P37NB	205381_at	37 kDa leucine rich repeat protein	-1,58/-1,7	0,023/0,194	8
PLXNA1	221538_s_at	Plexin A1	-1,58/-1,87	0,033/0,001	11
HSMPP8	221771_s_at	M-phase phosphoprotein mpp8	-1,56/-1,48	0,007/0,024	10
RIS1	213338_at	Ras-induced senescence 1	-1,55/-2,05	0,039/0,101	8
DTR (*2)	38037_at 203821_at	Diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, HB-EGF)	-1,55/-1,82 -1,46/-2,52	0,21/0,01 0,001/0,054	11 11
LIF	205266_at	Leukemia-inhibitory factor	-1,49/-1,59	0,027/0,062	9
CDC42BPB	217849_s_at	CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)	-1,49/-1,38	0,147/0,042	8
SYBL1	202829_s_at	Synaptobrevin-like 1	-1,49/-1,48	0,113/0,091	9
PHLDA1	218000_s_at	Pleckstrin homology-like domain, family A, member1	-1,48/-2,52	0,101/0,099	8
DDEF1	221039_s_at	Development and differentiation enhancing factor 1	-1,48/-1,52	0,015/0,074	11
FOSL2	218880_at	FOS-like antigen 2	-1,47/-1,35	0,096/0,052	10
PTH1H	206300_s_at	Parathyroid hormone-like hormone	-1,45/-1,35	0,074/0,045	10
MAP2K3 (*2)	215498_s_at 215499_at	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	-1,43/-1,52 -1,18/-1,38	0,047/0,121 0,059/0,042	9 8
PLAUR	210845_s_at	Plasminogen activator, urokinase receptor	-1,43/-1,32	0,012/0,047	10
FNI	216442_x_at	Fibronectin 1	-1,42/-1,35	0,045/0,019	10
TCF7L2 (*2)	212762_s_at 216511_s_at	Transcription factor 7-like 2/TCF 4	-1,42/-1,26 -1,36/-1,32	0,058/0,067 0,293/0,097	8 8
SPRY4	221489_s_at	Sprouty homolog 4 (drosophila)	-1,41/-1,52	0,051/0,072	10
HMG1A1	206074_s_at	High mobility group AT-hook 1	-1,41/-1,7	0,009/0,206	9
SFRP1	202036_s_at	Secreted frizzled-related protein 1	-1,41/-1,38	0,05/0,045	10
FOXM1	202580_x_at	Forkhead box M1	-1,4/-1,38	0,255/0,088	8
RBPMS	209488_s_at	RNA binding protein with multiple splicing	-1,38/-1,41	0,016/0,065	8
ITGA7	209663_s_at	Integrin alpha 7	-1,38/-1,59	0,183/0,094	8
CPA4	205832_at	Carboxypeptidase A4	-1,37/-1,45	0,199/0,036	8
SLC5A3	213164_at	Solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	-1,36/-1,29	0,003/0,03	8

Gensymbol	Affymetrix Probe Set	Titel	-fache Änderung der Expression (RMA/MAS)	paired t-test (RMA/MAS)	Punkte
SHC1	214853_s_at	SHC (Src homology 2 domain containing transforming protein	-1,35/-1,29	0,026/0,029	8
DCTN1	201082-s_at	Dynactin 1	-1,35/-1,55	0,169/0,079	8
SAC2	203607_at	Sac domain-containing inositol phosphatase 2	-1,35/-1,35	0,216/0,089	8
BCL2L1	212312_at	BCL2-like 1	-1,35/-1,48	0,053/0,076	9
TIAM1	213135_at	t-cell lymphoma invasion and metastasis 1	-1,34/-1,32	0,025/0,075	10
PITPN	201192_s_at	Phosphatidylinositol transfer protein	-1,34/-1,23	0,014/0,07	8
DUSP6	208893_s_at	Dual specificity phosphatase 6	-1,34/-2,09	0,006/0,068	11
p66alpha	218131_s_at	p66alpha	-1,29/-1,35	0,018/0,086	8
TNC	216005_at	Tenascin C	-1,27/-1,32	0,04/0,026	8
FLJ12750	221704_s_at		-1,27/-1,41	0,006/0,048	8
RAB31	217762_s_at	RAB31 member RAS oncogene family	-1,25/-1,32	0,05/0,044	8
ETS2	201329_s_at	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	-1,24/-1,32	0,053/0,01	8
MET	213816_s_at	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	-1,24/-1,35	0,051/0,079	8
INPP5A	203006_at	Inositol phosphatase-5-phosphatase, 40 kDa	-1,23/-1,32	0,001/0,047	8
NR1D1	204760_s_at	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	-1,22/-2,09	0,011/0,035	8
P4HA2	202733_at	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase	1,25/1,35	0,058/0,072	8
NUDT9	218375_at	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X) type motif 9	1,32/1,41	0,221/0,063	8
ANXA1	201012_at	Annexin A1	1,34/1,38	0,011/0,004	10
AKR1C1	204151_x_at	Aldo-keto reductase family 1 member C1	1,34/1,45	0,081/0,153	8
SFRS7	214141_x_at	Splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35 kDa	1,34/1,35	0,107/0,038	8
SMARCA1	215294_s_at	SW1/SNF related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A member 1	1,35/2,7	0,014/0,046	8
DUT	209932_s_at	DUTP pyrophosphatase	1,35/1,45	0,052/0,015	10
ANKT	219978_s_at	Nucleolar protein 1	1,35/1,38	0,002/0,056	10
MYLK	202555_s_at	Myosin light polypeptide kinase	1,36/1,45	0,074/0,032	10
NUP88	202900_s_at	Nucleoporin 88 kDa	1,38/1,35	0,099/0,089	9
HEBP2	203430_at	Heme binding protein 2	1,41/1,35	0,05/0,026	9
CREG	201200_at	Cellular repressor of E1A-stimulated genes	1,41/1,32	0,07/0,096	10
EFEMP1	201842_s_at	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	1,41/1,38	0,004/0,01	11
FLJ12671	212766_s_at		1,41/1,48	0,014/0,028	9
ALCAM	201951_at	Activated leukocyte cell adhesion molecule	1,41/1,41	0,002/0,056	9
SERPINA3	202376_at	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3	1,42/1,32	0,388/0,012	8
PDCD2	213581_at	Programmed cell death 2	1,42/1,41	0,074/0,218	8
CSPG6	209257_s_at	Chondroitin sulfate proteoglycan 6 (Bamacan)	1,42/1,48	0,219/0,096	8
RARG-1 (*2)	202882_x_at 210097_s_at	Retinoic acid repressible protein	1,44/1,32 1,37/1,32	0,021/0,044 0,031/0,011	8 9
OAZ1	215947_s_at	Ornithine decarboxylase antizyme 1	1,44/1,38	0,026/0,02	10
HBLD2	209274_s_at	HESB-like domain containing 2	1,45/1,45	0,082/0,105	8
C6ORF111	212177_at	Chromosome 6 open reading frame 111	1,45/1,48	0,025/0,156	9
ARL5	218150_at	ADP-ribosylation factor-like 5	1,46/1,45	0,036/0,115	8
DMN	212730_at	Desmuslin	1,46/1,38	0,074/0,141	8
GPC4	204984_at	Glypican 4	1,46/1,35	0,068/0,07	10
TNFRSF10B	209295_at	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1,47/1,45	0,017/0,069	11
SSB	201138_s_at	Sjogren Syndrome Antigen B (autoantigen La)	1,48/1,52	0,086/0,039	11
SCRG1	205475_at	Scrapie responsive protein 1	1,48/1,41	0,097/0,138	8
IGSF4	209030_s_at	Immunoglobulin superfamily, member 4	1,49/1,45	0,018/0,023	9
THOC2	212994_at	THO complex	1,53/1,35	0,016/0,026	10



Gensymbol	Affymetrix Probe Set	Titel	-fache Änderung der Expression (RMA/MAS)	paired t-test (RMA/MAS)	Punkte
<b>TOP2A</b>	201291_s_at	Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDA	<b>1,54/1,55</b>	0,069/0,047	11
<b>SCA1</b>	203232_s_at	Spinocerebellar ataxia 1	<b>1,58/1,7</b>	0,034/0,069	11
<b>S164</b>	212027_at	S 164 protein	<b>1,61/1,62</b>	0,074/0,055	10
<b>MYCBP</b>	203359_s_at	c-myc binding protein	<b>1,64/1,66</b>	0,019/0,161	9
<b>AKR1B10</b>	206561_s_at	Aldo-keto-reductase family 1, member B10	<b>1,65/1,59</b>	0,1/0,056	8
<b>EDNRB</b>	204271_s_at	Endothelin receptor type B	<b>1,65/1,48</b>	0,002/0,084	11
<b>CUTL1</b>	214743_at	Cut-like 1, CCAAT displacement protein (Drosophila)	<b>1,67/1,59</b>	0,057/0,038	11
<b>CDC10</b>	213151_s_at	CDC10 cell division cycle 10 homolog	<b>1,69/1,59</b>	0,011/0,022	11
<b>COL11A1</b>	37892_at	Collagen type XI, alpha 1	<b>1,69/1,74</b>	0,088/0,121	8
<b>FABP7</b>	205029_s_at	Fatty-acid binding protein 7, brain	<b>1,74/1,66</b>	0,035/0,104	9
<b>ARL6IP</b>	211935_at	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein	<b>1,9/1,74</b>	0,09/0,125	8
<b>PAIP1 (*5)</b>	210283_x_at	Polyadenylate binding protein interacting protein 1	<b>1,93/2</b>	0,068/0,049	11
	213754_s_at		<b>1,92/1,82</b>	0,041/0,061	11
	208051_s_at		<b>1,92/1,78</b>	0,089/0,113	9
	209064_x_at		<b>1,83/1,87</b>	0,073/0,046	11
	209063_x_at		<b>1,81/1,87</b>	0,066/0,033	11
<b>HMGN3</b>	209377_s_at	High mobility group nucleosomal binding domain 3	<b>2,05/2</b>	0,081/0,142	9

**Tabelle 11: Ergebnis der Mikroarray-Analyse**

Dargestellt sind die 95 Gene, die in den mit EGFR-spezifischer siRNA EGR10 behandelten Zellen unter den verwendeten Kriterien als differenziell exprimiert gewertet wurden. *Affymetrix Probe Set* bezeichnet die auf dem Array aufgebrachten spezifischen Oligonukleotidsequenzen, durch die das jeweilige Transkript repräsentiert wird. Einige Gene wurden auf jedem Array durch mehrere verschiedene *Probe Sets* repräsentiert, um bspw. die Expression von unterschiedlichen Splicevarianten nachweisen zu können. Die Sequenzen können über die Affymetrix-Webseite abgefragt werden ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). In der Spalte zur Expressionsänderung sind die über die RMA-Analyse bzw. den MAS 5.0-Algorithmus erhaltenen entlogarithmierten Werte als x-fache Änderung der Expression nach „oben“ (+, Induktion) oder „unten“ (-, Repression) gegenüber den kontrolltransfizierten Zellen angegeben (vgl. 2.2.3.4.3). Die Ergebnisse der *paired t-test* beziehen sich jeweils auf die in der RMA- bzw. MAS 5.0-Analyse erhaltenen Werte. Die Spalte „Punkte“ gibt Aufschluss über die durch die verschiedenen Kriterien (Änderung der Expression, *paired t-test*, *detection*; vgl. 2.2.3.4.3) in das Wertesystem eingegangenen Punkte mit der maximalen Anzahl 11 (höchste Signifikanz).

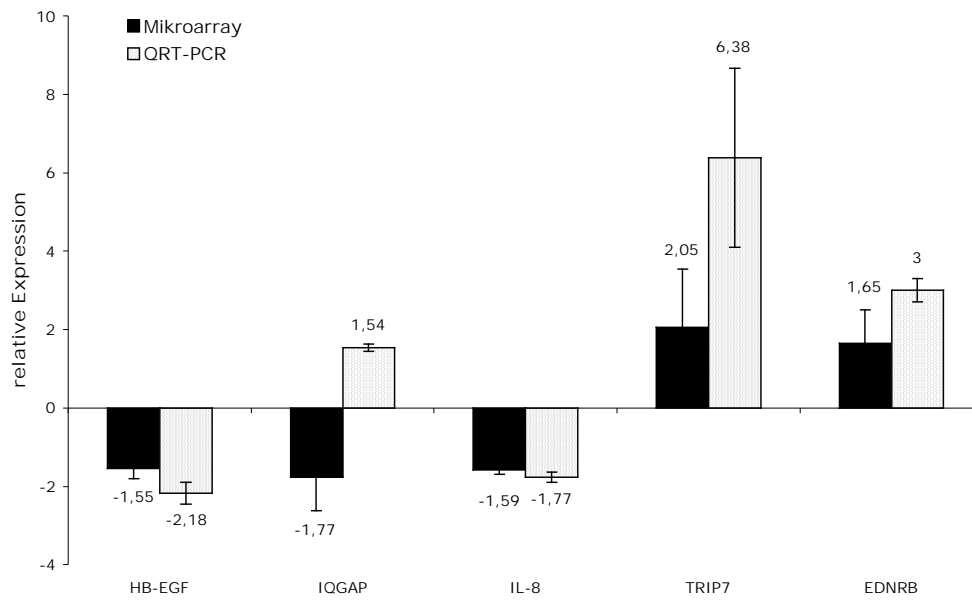
Für das Transkript des EGFR findet man mit einer 5-fachen Herunterregulierung von einem der *Probe Sets* die stärkste Regulation im gesamten Mikroarray. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den in der *real-time* PCR erhaltenen Daten überein (vgl. 3.2.3) und lässt auf die prinzipielle Richtigkeit der in den Expressionsanalysen erhaltenen Aussagen schließen. Insgesamt wird der EGFR im hier verwendeten Array durch sechs unterschiedliche *Probe Sets* repräsentiert, wodurch der größte Teil der EGFR-mRNA abgedeckt wird. Zwei dieser *Probe Sets* wurden als signifikant verändert gewertet (vgl. Tab.11), für die anderen wurde das angelegte Signifikanzniveau nicht erreicht. Dies lag v. a. daran, dass nicht in allen Arrays ein Signal detektiert wurde, d.h. die *Probe Sets* wurden als *not present* gewertet.

Das am stärksten aufregulierte Gen ist HMGN3/TRIP7, dessen Produkt zur Familie der Nukleosom-bindenden Proteine gehört und einen transkriptionellen Cofaktor mit besonders ausgeprägter Expression in Astrozyten darstellt (Ito und Bustin, 2002). Unter den reprimierten Genen finden sich vor allem solche, für die eine Beteiligung bei der Migration und Invasion von Zellen nachgewiesen wurde (DDEF1, HMGA1, TIAM1, TNC, ESDN, PTHLH, IQGAP, UPAR, ETS-2, MAP4K4, MET, ITGA7, FN). Zum anderen sind proliferationsfördernde (FOSL2, FOXM1B, MAP2K3, TCF7L2) und anti-apoptotische (MCL1, BCL2L) Gene herunterreguliert. Mit DTR (*diphtheria-toxin receptor/heparin-binding EGF-like growth factor*, HB-EGF) findet sich außerdem ein EGFR-spezifischer Ligand unter den stark herunterregulierten Genen. Die durch die EGFR-Regulation induzierten Gene bildeten eine funktionell sehr heterogene Gruppe. Neben einigen proapoptotischen Genen (TNFRSF10B, PCD2) fanden sich verschiedene DNA- bzw. RNA-bindende Moleküle (ANKT, SCA1, SMARCA1, bzw. PAIP1, SSB, THOC2, SFRS7), sowie Transkripte aufreguliert, deren Produkte bei der Ausbildung der extrazellulären Matrix (ECM) und bei Kommunikationsvorgängen über diese eine Rolle spielen (COL1A1, ALCAM, IGSF4, EFEMP1).

### **3.5.1 Bestätigung der Array-Daten durch quantitative *real-time* PCR (QRT-PCR)**

Um die in den Expressionsanalysen gewonnenen Daten zu verifizieren, wurde für fünf Gene exemplarisch eine quantitative *real-time* PCR (QRT-PCR) durchgeführt. U373 MG-Gliomzellen wurden parallel zu den Proben für die Mikroarray-Experimente mit siRNA EGR10 bzw. EGR12 transfiziert und nach einer Inkubationszeit von 72 h mit anschließendem Serumentzug (24 h) für 6 h mit EGF stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert, wie unter 2.2.3.2 beschrieben prozessiert und in die QRT-PCR eingesetzt (s. 2.2.3.3). Für die Analyse wurden exemplarisch zwei induzierte Gene (*endothelin receptor type B* (EDNRB), *high mobility group nucleosomal binding domain 3* (HMGN3/TRIP7)) und drei reprimierte Gene (*heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), *IQ motif containing GTPase activating protein 1* (IQGAP), Interleukin-8 (IL-8)) ausgewählt. Es wurden für jedes Gen drei unabhängige PCR-Läufe mit jeweils drei Ansätzen durchgeführt. Die erhaltenen Expressionsdaten wurden zunächst auf die GAPDH-Expression der Probe normalisiert und anschließend die x-fache Änderung der

Expression des jeweiligen Gens gegenüber den kontrolltransfizierten Zellen ermittelt. Die im Mikroarray und in der *real-time* PCR erhaltenen Daten sind in Abb. 32 miteinander verglichen.



**Abb. 32: Validierung der Mikroarray-Daten durch quantitative *real-time* PCR**

U373 MG-Zellen wurden analog zu den Mikroarray-Experimenten transfiziert und inkubiert, anschließend wurde die RNA nach 6-stündiger Stimulation mit EGF isoliert. Mit Hilfe der *real-time* PCR wurden die Änderungen in der Transkription von fünf Genen nachgewiesen, die im Mikroarray als differenziell exprimiert gefunden wurden. Die Mittelwerte der drei Arrayexperimente und von drei QRT-PCR-Quantifizierungen wurden miteinander verglichen ( $n=3$ ). Die Zahlenwerte geben die relative Änderung der Expression an.

Zum einen war festzustellen, dass sich auch bei vergleichsweise niedrig exprimierten Genen wie beim EDNRB Unterschiede in der Expression durch die PCR nachweisen ließen. Auch relativ kleine Veränderungen in der Transkriptionsrate wie bei IL-8 mit einer im Mikroarray festgestellten  $-1,6$ -fachen Regulation gegenüber der Kontrollgruppe konnten reproduziert werden. Die in der QRT-PCR erhaltenen Daten von 4 der 5 untersuchten Gene stimmten weitestgehend mit den Ergebnissen aus der Mikroarray-Analyse überein, wobei die Unterschiede in der PCR insgesamt etwas stärker ausfielen. Hingegen ließ sich die im Array ermittelte verminderte Expression von IQGAP nicht wiederholen.

## **IV. Diskussion**

Kaum ein Bereich in der naturwissenschaftlichen Forschung hat in den letzten Jahren eine so rasante Entwicklung durchgemacht wie die Entdeckung und Untersuchung neuer Funktionen von Ribonukleinsäuren in der Zelle. RNA-Interferenz (RNAi) und die Rolle von *small interfering* RNAs in unterschiedlichen zellulären Regulationsvorgängen wurden 2002 als „*breakthrough of the year*“ gefeiert (Couzin, 2002). Die Anwendung von siRNAs zur spezifischen Genregulation durch Abbau der zugehörigen mRNA wurde in Säugerzellen erstmals 2001 von der Arbeitsgruppe um Tuschl publiziert (Elbashir et al., 2001a). Durch die Zusammenarbeit mit der siRNA-Forschergruppe um Dr. Roland Kreutzer und Dr. Stefan Limmer (Alnylam Europe AG, Kulmbach), war es uns möglich, etwa zur gleichen Zeit mit Untersuchungen in der neuro-onkologischen Grundlagenforschung zum Einsatz dieser völlig neuartigen Technologie zu beginnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Applikation der siRNAs in humanen Gliomzellen etabliert und optimiert, um dann gezielt die Expression eines tumorrelevanten Gens zu reprimieren. Hierfür wurde der in Glioblastomen häufig fehlregulierte *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gewählt. In zwei gut charakterisierten Gliomzelllinien, U373 MG und LN18, sollte der hemmende Effekt dieses spezifischen EGFR-*Knockdowns* auf verschiedene Parameter des Tumorzellwachstums untersucht werden. Zusätzlich wurde die Änderung der Genexpression nach siRNA-vermittelter EGFR-Regulation mit Hilfe von Mikroarrays analysiert.

### **4.1 Applikation von siRNAs in humanen Gliomzelllinien**

Am Anfang dieser Arbeiten standen zunächst methodische Überlegungen. Einerseits war noch nicht bekannt, ob der RNAi-Mechanismus in allen humanen Zelltypen funktionell aktiv war und davon abhängig die Anwendung von siRNAs in astrozytären Gliomzellen möglich sein würde. Andererseits gab es nur wenige Daten zur erfolgreichen Applikation von siRNAs. Daher mussten zunächst Untersuchungen zu ihrem optimalen Einsatz in den von uns verwendeten Zellen durchgeführt werden. Dies geschah zu Beginn noch durch Kotransfektion von Plasmiden, die ein Reporter gen (*enhanced green fluorescent protein*,

eGFP) enthielten, zusammen mit eGFP-spezifischen siRNAs in die Gliomzellen. Dies erwies sich jedoch als schwierig, da die Transfektionseffizienz hierbei nur äußerst gering (<2 % der Zellen) und ein spezifischer Effekt daher nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Durch den Einsatz einer stabil eGFP exprimierenden Gliomzelllinie (U373eGFP) und durch die Regulation von endogenem  $\beta$ -Aktin, für das eine erfolgreiche siRNA-vermittelte Modulation *in vitro* nachgewiesen worden war (Harborth et al., 2001), wurde ein direkterer Weg eingeschlagen. Dabei stellte sich heraus, dass es entgegen ursprünglicher Annahmen von entscheidender Bedeutung war, die Zellen bei sehr geringer Dichte zu transfizieren. Transfektionsexperimente mit Antisense-Oligonukleotiden und Kotransfektionsversuche mit Plasmiden waren in unserer Arbeitsgruppe bei einer Konfluenz von ca. 80 % bereits erfolgreich durchgeführt worden. Die siRNA-Transfektion benötigte dagegen eine Zelldichte von 20-30 % (vgl. 3.1.1.2.1, Abb. 9). Dadurch wurde das Testen verschiedener Transfektionsmittel nötig, da bei geringer Verträglichkeit nur eine sehr kleine Anzahl von Zellen die Behandlung überlebte. Unter optimierten Bedingungen konnte dann eine Transfektionseffizienz von über 90 % erreicht werden (vgl. 3.1.1.1.2, Abb. 8). Weitere Untersuchungen zeigten die Konzentrationsabhängigkeit des siRNA-vermittelten Effekts. Eine spezifische Regulation der eGFP- (und später der EGFR-) Expression konnte bereits bei einer Endkonzentration von 0,1 nM siRNA nachgewiesen werden (vgl. 3.1.1.1.2, Abb. 7 und 3.2.2.1, Abb. 11). Konzentrationen von 50 nM und darüber führten teilweise zu zytotoxischen Effekten und konnten zudem die regulatorische Wirkung gegenüber einer Konzentration von 10 nM nicht mehr weiter verstärken (vgl. 3.1.1.1.2, Abb. 6). Nach Optimierung der verschiedenen Parameter konnte hier also durch die Regulation von eGFP und  $\beta$ -Aktin der *proof of principle* für die erfolgreiche Anwendung von siRNAs in verschiedenen Gliomzelllinien erbracht werden.

## **4.2 Regulation des EGFR durch siRNAs**

Im nächsten Schritt sollte die Regulation eines für die Progression von glialen Tumoren des ZNS potentiell relevanten Gens stehen. Es lag nahe, die Expression des in humanen Gliomen am häufigsten überexprimierten Gens, des *epidermal growth factor receptor* (EGFR; Kleihues und Ohgaki, 1999) durch siRNAs zu unterdrücken. Die bei 40-50 % aller

hochgradigen Gliome gefundene Überexpression (Ekstrand et al., 1991; Libermann et al., 1985; Wong et al., 1987) kann mit einer Genamplifikation verbunden sein, die wiederum in ca. 40 % dieser Fälle mit einer Mutation des Rezeptors gekoppelt ist (Frederick et al., 2000). Durch den EGFR vermittelte Signale modulieren Proliferation, Adhäsion, Invasion und Migration von neoplastischen Zellen, beeinflussen deren Überlebensrate und spielen eine Rolle bei der Neubildung von Gefäßen (Woodburn, 1999).

#### **4.2.1 Identifizierung einer funktionellen EGFR-spezifischen siRNA**

Es wurden mehrere EGFR-spezifische siRNAs synthetisiert und auf ihre Funktionalität getestet. Diese waren zum einen gegen verschiedene Abschnitte der mRNA gerichtet, zum anderen besaßen sie strukturelle Unterschiede durch unterschiedliche Längen und Überhänge an den Enden der Duplexe (vgl. 3.2.1, Tab. 10). Dabei stellte sich heraus, dass keine der in dieser ersten Synthesephase generierten siRNAs eine Regulation des EGF-Rezeptors vermittelte (vgl. 3.2.1, Abb. 10 A). Die Ursachen hierfür sind unklar. Möglicherweise wurden Bereiche der mRNA gewählt, die für den degradierenden RISC-Komplex schlecht zugänglich waren. Dies erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da unterschiedliche RNA-Abschnitte als Zielsequenz dienen. Im Gegensatz zu Antisense-Oligonukleotiden, bei denen die Zugänglichkeit der Zielregion entscheidend von der mRNA-Konformation abhängt (Ding und Lawrence, 2001), scheint bei der Anwendung von siRNAs die Sekundärstruktur der RNA eher eine untergeordnete Rolle zu spielen (Holen et al., 2002; Reynolds et al., 2004). Hingegen können positionelle Verschiebungen in der Zielsequenz um wenige Nukleotide einen bedeutenden Effekt auf die Funktionalität der siRNA haben (Holen et al., 2002; Reynolds et al., 2004). Deshalb wird mittlerweile die siRNA-Sequenz selbst als ausschlaggebender Faktor für ihre Effektivität betrachtet (Amarzguioui und Prydz, 2004; Reynolds et al., 2004). Die mangelnde Funktionalität der von uns getesteten siRNAs könnte daher in ihrer Struktur begründet sein. Einerseits wurden Oligos mit sog. *blunt ends* ohne Überhänge, andererseits eine Basenlänge von 22 nt plus 2 nt lange Überhänge verwendet. Allerdings konnte auch mit zwei Sequenzen, die in ihrer Struktur den natürlichen *Dicer*-Abbauprodukten (Elbashir et al., 2001b) entsprachen (19-mer mit symmetrischen 2 nt-Überhängen), keine EGFR-Regulation nachgewiesen werden. Möglicherweise war hierfür die Zielsequenz verantwortlich, oder

aber es waren weitere Faktoren ungünstig gewählt, wie bspw. der GC-Gehalt (Reynolds et al., 2004).

In einer weiteren Synthesephase wurden dann zwei siRNAs generiert, die eine spezifische Regulation des EGFR in unterschiedlichen Gliomzelllinien hervorriefen (siRNA EGR10, EGR11). Eine entsprechende Kontroll-siRNA mit vier Fehlpaarungen zur Zielsequenz (EGR12) hatte keinen Einfluss auf die EGFR-Expression (vgl. 3.2.1, Abb. 10 B). Da sich siRNA EGR10 gegenüber EGR11 in verschiedenen Experimenten als etwas wirksamer herausstellte (vgl. 3.2.2.2, Abb. 13), beschränkte sich der Großteil der Untersuchungen auf diese Sequenz.

#### **4.2.2 Regulation der EGFR-Expression durch die spezifische siRNA EGR10**

Die Verminderung der EGFR-Gesamtproteinmenge wurde zunächst im Western Blot gezeigt. Wie schon in den Versuchen mit eGFP wurde auch hier bereits bei 0,1 nM ein regulatorischer Effekt nachgewiesen, der durch Erhöhung der siRNA-Konzentration auf über 10 nM nicht mehr verstärkt werden konnte (vgl. 3.2.2.1, Abb. 11). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich 96 h nach Transfektion eine maximale Reduktion der Proteinexpression um ca. 90 % bei einer Endkonzentration von 10 nM siRNA EGR10 (3.2.2.1, Abb. 12). Diese Ergebnisse konnten durch durchflusszytometrische und immunzytochemische Nachweismethoden bestätigt werden (vgl. 3.2.2.2, 3.2.2.3).

Auch auf transkriptioneller Ebene konnte die Funktionalität der siRNA durch spezifischen Abbau der EGFR-mRNA nachgewiesen werden. Diese wurde ebenfalls um bis zu 90 % reduziert (vgl. 3.2.3, Abb. 16). Sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene blieb der Effekt über den gesamten Untersuchungszeitraum von bis zu sechs Tagen bestehen (3.2.2.1, Abb. 12; 3.2.2.2, Abb. 14; 3.2.3, Abb. 16).

#### **4.2.3 Vergleich von siRNA EGR10 mit EGFR-spezifischem Antisense-Oligonukleotid**

Um EGR10 und die neue Substanzklasse der siRNAs näher zu charakterisieren, wurde sie mit einer anderen, seit Jahren etablierten Methode zur genspezifischen Regulation auf Nukleinsäurebasis, dem Einsatz von Antisense-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODNs) verglichen. Obwohl es mit Vitravene (Isis Pharmaceuticals) aus dieser Substanzklasse bereits ein zugelassenes Präparat für die Behandlung von Cytomegalovirus-induzierter

Retinitis gibt und sich verschiedenste AS-ODNs in klinischen Untersuchungen befinden (Bogdahn et al., 2004; Übersicht in Dean und Bennett, 2003), konnte bisher auch mit diesen Molekülen in der Tumorthherapie noch kein entscheidender Durchbruch erzielt werden. In der Antisense-Technologie werden einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle unterschiedlicher Länge und mit unterschiedlichen Modifikationen eingesetzt. Durch ihre Bindung an die komplementäre Sequenz der mRNA wird über verschiedene Mechanismen die Synthese des entsprechenden Proteins verhindert. Am häufigsten erfolgt dies durch den RNase H-abhängigen Abbau der mRNA. Weitere Möglichkeiten stellen die Inhibition der RNA-Prozessierung (*splicing*) durch Bindung an Intronsequenzen, oder die Blockade der Translation durch sterische Hinderung der dazu benötigten Proteine dar (Überblick in Dorsett, 2004). Zumeist werden kurze, 12-25 nt lange DNA-Oligonukleotide mit unterschiedlichen Modifikationen eingesetzt (Übersicht in Agrawal und Kandimalla, 2000). Eine der häufigsten Veränderungen des Nukleinsäuregerüsts besteht im Austausch von nicht-brückenbildenden Sauerstoffatomen der Phosphodiesterbindung gegen Schwefelatome. Von diesen Phosphorothioat-Antisense-Oligonukleotiden (AS-PTOs) ist bekannt, dass sie besonders effizient die RNase H-vermittelte Degradation der RNA auslösen. AS-PTOs sind auch die am weitesten in ihrer Entwicklung fortgeschrittenen Moleküle dieser Substanzklasse. Das hier verwendete EGFR-spezifische AS-PTO (AS02) wurde erstmals 1999 von L. Witters et al. veröffentlicht und seine Wirksamkeit in humanen Ovarial- und Lungenkarzinom-Zelllinien gezeigt (Witters et al., 1999).

In den von uns durchgeführten Versuchen wurde die Effektivität untersucht, mit der AS02 bzw. siRNA EGR10 die Expression von EGFR-mRNA und -Protein reduzieren. Dabei zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der siRNA gegenüber dem Antisense-Oligonukleotid. Zum einen wurde durch die siRNA bereits bei sehr viel niedrigeren Konzentrationen ein Effekt vermittelt. Die Mindestmenge an einzusetzendem AS02 lag bei 500 nM gegenüber 10 nM siRNA EGR10. Die maximale Reduktion der Proteinmenge durch AS02 betrug ca. 40 %, die mRNA wurde um 80 % vermindert (jeweils 90 % bei EGR10; vgl. 3.2.4.1 und 3.2.4.2). Der Hauptunterschied zwischen den beiden Substanzen lag jedoch in der Dauer des vermittelten Effekts. Während bei Antisense-Behandlung die EGFR-mRNA schon nach 96 h, die Proteinmenge nach spätestens 144 h ihr Ausgangsniveau wieder erreicht hatten, blieb der siRNA-vermittelte *Knockdown* über den gesamten Zeitraum hinweg bestehen.



Bei diesem Vergleich muss berücksichtigt werden, dass die verwendete Transfektionsmethode für den Einsatz von siRNAs optimiert wurde. Durch Verwendung anderer Transfektionsmittel und veränderte Zellkulturbedingungen hätte die Effizienz des AS-PTOs möglicherweise gesteigert werden können. Allerdings betrug auch in der Originalpublikation, in der eine Proteinverminderung um ca. 90 % festgestellt wurde, die eingesetzte Konzentration an AS02 300 nM. Zudem wäre wahrscheinlich auch die Dauer des Effekts durch diese Optimierung nicht wesentlich verlängert worden. Mittlerweile sind verschiedene Arbeiten zum Vergleich der Effizienz von synthetischen siRNAs mit Antisense-Oligonukleotiden erschienen, und obwohl Daten veröffentlicht wurden, die AS-PTOs und siRNAs eine vergleichbare Wirksamkeit bescheinigen (Vickers et al., 2003), gilt es als erwiesen, dass eine siRNA in 10-1000fach niedrigerer Konzentration als ein vergleichbares Antisense-Oligonukleotid eingesetzt werden kann (Bertrand et al., 2002; Grunweller et al., 2003; Kretschmer-Kazemi Far und Sczakiel, 2003; Miyagishi et al., 2003; Xu et al., 2003).

### **4.3 Einfluss der EGFR-Regulation auf humane Gliomzellen**

Nachdem die Stärke und Dauerhaftigkeit des durch die siRNA EGR10 vermittelten Effekts nachgewiesen worden waren, sollten nun funktionelle Studien zum Einfluss der EGFR-Regulation auf die hier untersuchten Gliomzelllinien durchgeführt werden. Ein völliger *Knockout* ist durch die Transfektion synthetischer siRNAs nicht zu vermitteln (Carpenter und Sabatini, 2004), die hier erreichten Werte mit einer Verminderung des mRNA-Expressionsniveaus um bis zu 90 % entsprachen jedoch den Anforderungen an eine hochfunktionelle siRNA (Hohjoh, 2002; Reynolds et al., 2004; Ui-Tei et al., 2004). Obwohl immer noch eine Restmenge an Protein vorhanden war, sollte das Ausmaß des so vermittelten *Knockdowns* groß genug sein, um eine Änderung im Verhalten der untersuchten Zellen zu bewirken.

Für einen Großteil der Untersuchungen wurden mindestens zwei verschiedene, gut charakterisierte Gliomzelllinien eingesetzt. Zum einen die Linie U373 MG mit normaler Expression des EGFR, zum anderen die EGFR-überexprimierende LN18-Linie (Schlegel et al., 2000; Piontek, pers. Mitt.). Durch die Überexpression könnte eine stärkere

Abhängigkeit dieser Zellen von der EGFR-Signalvermittlung gegeben sein, so dass eine Inhibition hier möglicherweise zu deutlicheren Effekten führen sollte.

#### **4.3.1 Zellproliferation**

Zunächst wurde der Einfluss der EGFR-Regulation durch siRNAs auf das Proliferationsverhalten der Gliomzellen untersucht. Die Zugabe des EGFR-Liganden *epidermal growth factor* (EGF) hatte unter serumfreien Bedingungen einen wachstumsfördernden Effekt (vgl. 3.3.1.1, Abb. 20 B), so dass von der Funktionalität dieses Signalweges in beiden Zelllinien ausgegangen werden konnte. Der Einsatz des spezifischen EGFR-Inhibitors AG1478 sollte als Kontrolle dienen, für ihn war in Vorversuchen eine dosisabhängige Proliferationshemmung bei Konzentrationen ab 20  $\mu\text{M}$  ermittelt worden (Daten nicht gezeigt).

Die Proliferation der U373 MG- und LN18-Gliomzellen nach Transfektion mit siRNA EGR10 wurde unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen getestet (serumhaltige bzw. serumfreie Medien, Zugabe von EGF, unterschiedliche siRNA-Konzentrationen). Es war jedoch in keinem Fall eine Änderung im Wachstumsverhalten festzustellen (vgl. 3.3.1.1 Abb. 20; 3.3.1.2, Abb. 21 und 22). Auch die Kombination von siRNA-Transfektion und AG1478-Gabe hatte keinen Einfluss auf die für die Proliferationshemmung nötige Inhibitorkonzentration (vgl. 3.3.1.4). Die gleichzeitige Behandlung mit zwei verschiedenen wirksamen siRNAs (EGR10 + EGR11) hatte ebenfalls keinen inhibierenden Effekt (vgl. 3.3.1.3). Da durch den spezifischen Inhibitor AG1478 jedoch eine Hemmung der Proliferation der hier verwendeten Gliomzellen stattfand, kann ein EGFR-vermittelter Effekt auf das Zellwachstum nicht ausgeschlossen werden. AG1478 gilt als wirksamer und hochselektiver EGFR-Inhibitor, dessen  $\text{IC}_{50}$  für den zu EGFR nah verwandten ErbB2 und eine weitere Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), *platelet derived growth factor receptor* (PDGFR) laut Angaben des Vertreibers Calbiochem bei über 100  $\mu\text{M}$  liegt (Calbiochem Produktbeschreibung; Levitzki und Gazit, 1995). Seine Wirkung wird durch kompetitive Blockade der ATP-Bindungsstelle an der Tyrosinkinase-Domäne vermittelt. AG1478 wurde bereits mehrfach in Untersuchungen zur EGFR-Inhibition in Gliomzellen verwendet und auch dort in einer Konzentration von 10–25  $\mu\text{M}$  eingesetzt, wobei Zellzahl, RTK-Aktivität und transkriptionelle Hemmung EGFR-nachgeschalteter Gene als funktionelle *readouts* betrachtet wurden (Chakravarti et al., 2002; Lal et al., 2002; Steinbach et al.,

2002). Trotzdem kann ein möglicherweise unspezifischer Effekt auf andere Proteine auch unterhalb der Rezeptorebene nicht ausgeschlossen werden. Zur Spezifität von AG1478 existieren nach unseren Informationen keine eingehenden Untersuchungen. Dagegen konnten Arbeiten von Lipson et al. zeigen, dass AG1478 bei Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und darüber die Phosphorylierung von PDGFR unspezifisch hemmt (Lipson et al., 1998). Für den wie AG1478 aus der Substanzklasse der Quinazoline stammenden und bereits zugelassenen EGFR-Inhibitor Gefitinib ("Iressa", ZD1839) gibt es ebenfalls keine näheren Angaben zum möglichen Einfluss auf andere Proteinkinasen (Cohen et al., 2004). Auch die Bindung von Gefitinib erfolgt an der ATP-Bindestelle, einer Region mit hoher Homologie zwischen den verschiedenen RTKs. Bei Untersuchungen zur Hemmung von Endothelzellen und Fibroblasten durch Gefitinib stellte sich heraus, dass die durch *platelet derived growth factor* (PDGF) und *insulin-like growth factor* (IGF) stimulierte Proliferation bei gleichen  $\text{IC}_{50}$ -Werten gehemmt wurde wie die von EGF abhängige Proliferation. Möglicherweise wurden hier also unspezifisch die Rezeptoren dieser Wachstumsfaktoren (PDGFR bzw. IGF1R) ebenso wie der EGFR blockiert. Da diese  $\text{IC}_{50}$ -Werte auch im Bereich der erreichten Plasmakonzentrationen im Patienten liegen, sind zytotoxische Effekte durch eine unspezifische Wirkung auf andere Tyrosinkinasen neben EGFR durchaus denkbar (Cohen et al., 2004).

Der mangelnde additive Effekt von AG1478 und siRNA EGR10 ist möglicherweise durch den Versuchsaufbau zu erklären. Da die Inhibition durch AG1478 bereits zu einem Zeitpunkt begann, an dem noch keine siRNA-bedingte Verminderung des Rezeptors stattgefunden hatte, eine Blockade der Tyrosinkinase-Einheit durch AG1478 aber die Rezeptorinternalisierung verhindert, könnte möglicherweise die Menge an membranständigem EGFR über den ganzen Zeitraum unverändert geblieben und dadurch auch die gleiche Konzentration an AG1478 zur Hemmung der Signaltransduktion benötigt worden sein.

In einer 2003 erschienenen Publikation hatte die Transfektion von zwei unterschiedlichen siRNAs gegen das gleiche Transkript eine verstärkte Herunterregulierung der untersuchten Gene und auch einen erhöhten funktionellen Effekt zur Folge (Ji et al., 2003). Allerdings waren hier siRNAs benutzt worden, die eine Reduktion der Genexpression um maximal

70 % bewirkt hatten. Dadurch war hier noch eine Steigerung der Effizienz auf ca. 90 % möglich, wohingegen die von uns eingesetzten Oligos bereits bei unkombinertem Einsatz die EGFR-mRNA um bis zu 90 % reduzierten. Sollte diese Reduktion durch den zusätzlichen Einsatz der siRNA EGR11 noch erhöht worden sein, hatte dies zumindest auf die Proliferationsrate keinen Einfluss. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ließ sich auch in einer durchflusszytometrischen Analyse keine Veränderung im verhältnismäßigen Anteil der Zellen an den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus nachweisen (vgl. 3.3.2, Abb. 25). Es ist außerdem hinzuzufügen, dass auch das Verhältnis von lebenden und toten bzw. apoptotischen Zellen in diesen Versuchen konstant blieb. Morphologisch ließen sich zwischen Zellen, die nur mit Transfektionsmittel behandelt worden waren, und siRNA EGR10-transfizierten Kulturen keine Unterschiede feststellen. Dagegen wuchsen AG1478-behandelte, adhärenzte Zellen verstärkt spindelförmig, außerdem traten vermehrt abgerundete und vom Untergrund abgelöste Formen auf. Nach siRNA-Transfektion wurden dagegen weder Veränderungen im Kristallviolett-Assay nachgewiesen, noch erhöhte sich die Anzahl gefärbter Zellen im Trypanblau-Ausschluß-Verfahren. Auch in der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse, bei der apoptotische Zellen als distinkter Gipfel (sog. *sub-G1 peak*) im Histogramm zu erkennen sind, konnte eine solche Zellfraktion nicht gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Ein möglicher Erklärungsansatz für den fehlenden Einfluss der siRNA könnte sein, dass EGFR nicht primär einen proliferationsfördernden Effekt auf die Gliomzellen ausübt, sondern vor allem auf zelluläre Antworten wie Migrations- oder Invasionsverhalten wirkt. Die Trennung von Zellwachstum und Zellmotilität nach Aktivierung des EGFR konnte von Chen et al. gezeigt werden (Chen et al., 1994). Westermarck et al. fanden bereits 1982 nach Zugabe von EGF eine erhöhte Beweglichkeit von Gliomzellen bei einer unveränderten Wachstumsrate (Westermarck et al., 1982). Berens et al. sahen in Abhängigkeit von der EGFR-Expressionsstärke ebenfalls einen primär migrationsstimulatorischen Effekt von EGF, wohingegen nur ca. 17 % der von ihnen untersuchten Gliome mit einer Erhöhung der Proliferationsrate reagierten (Berens et al., 1996). Hoi Sang et al. postulierten für den EGFR eine abweichende Funktion in Gliomen im Vergleich zu anderen Tumoren, die hauptsächlich mit einer erhöhten Proliferationsrate auf eine erhöhte EGFR-Expression reagieren. Die Autoren fanden einerseits in den von ihnen getesteten Zelllinien (u. a. auch

U373 MG), keinen Zusammenhang zwischen Proliferationsrate und EGFR-Expressionsniveau und andererseits wurde ein Wachstumsvorteil durch erhöhte EGFR-Expression nur im dreidimensionalen Medium festgestellt (Hoi Sang et al., 1995).

Um die Möglichkeit zu überprüfen, dass sich die EGFR-Reduktion vor allem in einer verminderten Tumorigenität der U373 MG-Gliomzellen äußert, wurde die Fähigkeit der Zellen zum Wachstum im Soft Agar nach siRNA-Transfektion bzw. AG1478-Behandlung untersucht (vgl. 3.3.3). Dabei zeigte sich ein den Proliferationsexperimenten vergleichbares Resultat. Der Einsatz von 20  $\mu$ M AG1478 führte zu einer stark reduzierten Anzahl gebildeter Kolonien, die Regulation von EGFR durch die siRNA EGR10 hatte jedoch eher noch einen entgegengesetzten Effekt mit einer gegenüber der kontrolltransfizierten Gruppe leicht erhöhten Kolonienzahl (vgl. 3.3.3, Abb. 27).

#### **4.3.2 Motilität, Migration und Invasion**

Nachdem ein Einfluss der siRNA-vermittelten EGFR-Reduktion weder in zwei-, noch in dreidimensionalen Proliferationsexperimenten gezeigt werden konnte, sollte ein möglicher funktioneller Effekt durch Untersuchung von Adhäsions- und Migrationseigenschaften der U373 MG-Zellen überprüft werden.

Obwohl Gliome selten metastasieren (Bernstein und Woodard, 1995; Pasquier et al., 1980), sind sie durch ein hochinvasives Wachstum gekennzeichnet, bei dem einzelne Zellen sich von der Haupt-Tumormasse entfernen und eine vollständige Resektion somit unmöglich machen (Mäenpää et al., 1997). Die Migration dieser Zellen erfolgt entlang bestimmter morphologischer Strukturen, wie den Basalmembranen der Blutgefäße und der *Glia limitans externa* oder den Nervenfaserbahnen der weißen Substanz. Dieses Verhalten ist teilweise bedingt durch die Interaktion der Gliomzellen mit spezifischen Molekülen der dort vorhandenen extrazellulären Matrix (Goldbrunner et al., 1998), die, wie z. B. Laminin, Collagen IV, Tenascin und Hyaluronsäure, bevorzugte Substrate für die Ausbreitung der Gliome darstellen (Chintala et al., 1996; Giese und Westphal, 1996). Die rezeptorvermittelte Adhäsion der Tumorzellen an solche Matrixproteine gilt als erster Schritt im dreistufigen Prozess der Invasion (Liotta et al., 1986), auf den dann der Abbau der extrazellulären Matrix durch tumoreigene Metalloproteinasen und die Besetzung des so entstandenen freien Raumes durch die Gliomzellen folgen (Giese und Westphal, 1996). Die Beteiligung des EGFR an diesem Prozess konnte *in vitro* beispielsweise durch EGFR-

inhibierende Antikörper nachgewiesen werden, welche die durch Laminin erhöhte Migrationsrate von Gliomzelllinien antagonisieren (Tysnes et al., 1997). Auch konnten eine erhöhte Beweglichkeit der Zellen (El-Obeid et al., 1997) sowie die Stimulation des Tumorwachstums und eine erhöhte Migrationsrate im Sphäroidmodell nach EGF-Gabe nachgewiesen werden (Lund-Johansen et al., 1990). Die EGFR-Überexpression hatte außerdem eine erhöhte Kolonienbildung im Soft Agar und eine verstärkte Invasion in Konfrontationsstudien zur Folge (Engebraaten et al., 1993). Die Bindung von Gliomzellen an Hyaluronan bewirkte die Bindung des Hyaluronanrezeptors an den EGFR und die Aktivierung nachgeschalteter MAP-Kinasen sowie die Induktion der Expression verschiedener invasionsfördernder Gene (Tsatas et al., 2002).

Um Änderungen im Hinblick auf Zellmotilität, Adhäsion und Migration nach siRNA-vermittelter EGFR-Depletion nachzuweisen, wurden zunächst Versuche zur Adhäsion von U373 MG Gliomzellen an unterschiedliche Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) nach Transfektion mit EGFR-spezifischer bzw. Kontroll-siRNA und Stimulation mit EGF durchgeführt. Während einerseits auf Collagen I und Collagen IV keinerlei Adhäsion stattfand, adhärten zwischen 10 % und 20 % der Zellen auf Laminin, Vitronectin, bzw. Fibronectin (vgl. 3.3.4, Abb. 28). Diese Befunde stehen etwas im Widerspruch zu Daten, die im allgemeinen Collagen IV als gutes, Vitronectin und Fibronectin hingegen als nicht-permissive Substrate für eine Anheftung und Migration verschiedener Gliomzelllinien darstellen (Giese und Westphal, 1996). Allerdings wurde in dieser Arbeit auch eine Linie beschrieben, die von diesem Schema abwich und eine ähnliche Substratspezifität wie die von uns verwendeten U373 MG-Zellen aufwies. Von Ling et al. konnte für eine weitere Zelllinie Adhäsion an die genannten Proteine gezeigt werden (Ling et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass für dieses Phänomen wahrscheinlich rein vom Zelltyp abhängige Unterschiede verantwortlich sind, ähnlich wie auch die *in vitro* von verschiedenen Gliomzellen selbst produzierte ECM in der Zusammensetzung ihrer Komponenten sehr variabel ist (McKeever et al., 1986). Davon unabhängig war jedoch zwischen EGR10- und kontrolltransfizierten Zellen kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Im so genannten *Boyden-Chamber-Assay* sollte daraufhin die Fähigkeit der Zellen überprüft werden, eine künstliche Basalmembran als *in vitro*-Modell der Tumorerkrankung zu überwinden. Die Fähigkeit von Gliomzellen in Abhängigkeit von differentiell exprimierten

Integrinen und verschiedenen Proteasen durch diese Membran und den anschließenden Filter zu wandern, wurde mehrfach gezeigt (Lakka et al., 2000; Paulus et al., 1993; Rao et al., 1994; Wick et al., 1998). In den von uns durchgeführten Versuchen wurde zunächst entweder die EGFR-Expression der U373 MG-Zellen durch siRNA-Transfektion herunterreguliert oder der Rezeptor durch Zugabe von AG1478 blockiert. Anschließend erfolgte die Migration der Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit konditioniertem Fibroblastenmedium als chemotaktischem Reiz. Während die mit AG1478 behandelten Zellen eine stark reduzierte Fähigkeit zur Invasion in das Matrigel zeigten, verminderte sich die Zahl der gewanderten Zellen in der siRNA EGR10 transfizierten Gruppe nicht. Es ließ sich im Gegensatz dazu eine eher noch erhöhte Transmigrationsrate feststellen (vgl. 3.3.5).

#### **4.3.3 EGFR-abhängige Signaltransduktion**

Da weder die Wachstumseigenschaften, noch die migratorischen Fähigkeiten der untersuchten Gliomzellen durch den siRNA-vermittelten *Knockdown* der EGFR-Expression in irgendeiner Form eingeschränkt worden waren, wurde zusätzlich der Aktivierungszustand der nachgeschalteten Kinasen Erk1/2 und Proteinkinase B (PKB/AKT) überprüft, die wesentliche Vermittler der EGFR-Signaltransduktion darstellen. Während durch die Aktivierung der MAPKs über ras vor allem proliferationsfördernde Signale vermittelt werden, resultiert die Aktivierung von PI(3)K und PKB primär in der Blockade apoptotischer Moleküle (Übersicht in Kapoor und O'Rourke, 2003). Ca. 80 % aller humanen Gliome exprimieren aktivierte PKB (Haas-Kogan et al., 1998), deren Überexpression zur Progression vom anaplastischen Astrozytom zum Glioblastom führen kann (Sonoda et al., 2001). Die gleichzeitige Aktivierung von ras und PKB in neuronalen Vorläuferzellen induziert die Bildung von Gliomen (Holland et al., 2000). In einer Reihe verschiedener Gliomzelllinien, u. a. LN18, konnte gezeigt werden, dass diese beiden Signalkaskaden alternativ zueinander konstitutiv aktiviert vorliegen (Schlegel et al., 2000). Dies wurde durch unsere Ergebnisse bestätigt, die sowohl für U373 MG als auch für LN18-Zellen eine konstitutive Phosphorylierung der Proteinkinase B ergaben (vgl. 3.3.6.1, Abb. 30 C, E). Bei Stimulation mit EGF zeigte sich hier auch nur eine, wenn überhaupt, minimale Steigerung der Menge an phosphorylierter PKB. Hingegen war der MAPK-Signalweg mit Erk1/2 ohne ligandenabhängige EGFR-

Aktivierung nicht induziert (3.3.6.2, Abb. 31 B, D), die Zugabe von EGF führte hier zu einer deutlichen Erhöhung an phospho-Erk1/2. Die konstitutive PKB-Phosphorylierung ist in U373 MG-Zellen möglicherweise auf die Mutation des Tumorsuppressors PTEN zurückzuführen, dessen fehlende Funktionalität zur dauerhaften PKB-Aktivierung führt (Haas-Kogan et al., 1998). LN18-Zellen hingegen besitzen ein funktionelles PTEN (Ishii et al., 1999). Schlegel et al. konnten die Abhängigkeit der PKB-Aktivierung in diesen Zellen von PI(3)K nachweisen und folgerten daraus und aus der Überexpression des EGFR in dieser Linie eine rezeptorvermittelte Autophosphorylierung von PKB. Dies wird gestützt durch die Verminderung an phospho-PKB durch AG1478 (Schlegel et al., 2000; vgl. auch 3.3.6.1, Abb. 30 E). Sowohl in U373 MG- als auch in LN18-Gliomzellen kommt es nach Zugabe des EGFR-Inhibitors zu einer starken Verminderung des phosphorylierten Zustands sowohl von PKB/AKT als auch von Erk1/2. Hingegen ist nach Transfektion mit siRNA EGR10 kein Unterschied in der Menge der aktivierten Kinasen gegenüber den kontrolltransfizierten Zellen nachzuweisen (3.3.6.1, Abb. 30, 3.3.6.2, Abb. 31).

Insgesamt lassen sich die durchgeführten Experimente zu einem unerwarteten Ergebnis zusammenfassen. Entgegen den vorherigen Annahmen scheint die spezifische Regulation der EGFR-Expression und die damit verbundene massive Verminderung des Proteingehaltes durch *small interfering RNAs* keinen hemmenden Effekt auf die hier verwendeten Gliomzelllinien auszuüben. Dies ist umso überraschender, da für EGFR-gerichtete Antisense-Oligonukleotide, deren Wirkung ebenfalls auf einer spezifischen Regulation der Genexpression beruht, ein Effekt auf Proliferation (Brader et al., 1998; Ciardiello et al., 2001; Fang und Chen, 1999; Wang et al., 1995; Witters et al., 1999), Tumorigenität (Alper et al., 2000; Chakrabarty et al., 1995; Moroni et al., 1992; Ciardiello et al., 2001), Migrationsfähigkeit (Alper et al., 2000), Angiogenese (Riedel et al., 2002) und Apoptose (Ciardiello et al., 2001) verschiedener Tumorzelllinien gezeigt werden konnte. In diesen Arbeiten könnten zelltypabhängige Unterschiede für die von unseren Daten abweichenden Ergebnisse verantwortlich sein, da es sich hier um Zellen nicht glialen Ursprungs handelte. Andererseits wurden auch einige solcher Experimente in humanen Gliomen durchgeführt und dort konnte ebenfalls eine antiproliferative und antiapoptotische Wirkung *in vitro* und eine verminderte Tumorbildung im Tiermodell



gezeigt werden (Pu et al., 2000; Rubenstein et al., 2001; Sugawa et al., 1998; Tian et al., 1998; Tian et al., 2002; Wang et al., 1999; Zhang et al., 2002a; Zhang et al., 2002b).

Dies scheint schwer erklärbar. Ein möglicher Diskussionspunkt ist zum einen, dass in den genannten Arbeiten mit Gliomzelllinien bis auf zwei Ausnahmen (Rubenstein et al., 2001; Sugawa et al., 1998) alle Versuche mit stabil transfizierten Expressionsvektoren durchgeführt wurden, die eine EGFR *antisense*-codierende cDNA enthielten. Bei Sugawa et al. wurden zwar kurze AS-Oligos durch transiente Transfektion in die Zellen eingebracht; allerdings zeigte sich hier durch das verwendete Kontroll-Oligomer eine starke Regulation der EGFR-Kinase-Aktivität und des Zellwachstums, so dass die dargestellten Effekte möglicherweise nicht auf einer spezifischen *antisense*-Reaktion beruhen. Bei einer stabilen Transfektion von Vektoren, die in einer Transkription langer *antisense*-RNA-Sequenzen resultiert, ist zum einen der genaue Mechanismus der Inhibition unklar (Tian et al., 1998), zum anderen tritt hier durch die permanente Suppression dank der ständigen erneuten Synthese keine Verdünnung oder rascher Abbau des Wirkstoffs auf. Im Gegensatz zur transienten Transfektion könnte so ein verstärkter Effekt vermittelt werden. Die stabile Transfektion eines siRNA EGR10 exprimierenden Plasmids könnte darüber Aufschluss geben, ob durch die andauernde Applikation ein Effekt auf die Tumorzellen erkennbar werden würde. Ein weiterer Aspekt bei der transienten Transfektion ist die Halbwertszeit des zu untersuchenden Proteins. Ist dieses sehr stabil, so besteht die Möglichkeit, dass bei einer transienten Transfektion die mRNA-Regulation schon wieder zurückgeht, während die Proteinmenge noch nicht unter ein für die Funktion kritisches Niveau gefallen ist. Dagegen spricht allerdings in den von uns durchgeführten Versuchen, dass es sich bei dem EGFR um ein Protein mit einer kurzen Halbwertszeit auch in Abwesenheit eines Liganden handelt (7-14 h in untransformierten Fibroblasten und Epithelzellen; Baulida et al., 1996; Burke und Wiley, 1999) und 20-48 h in Tumorzellen (Stoscheck und Carpenter, 1984; Wiley et al., 1991)). Da in den hier durchgeführten Experimenten nach bis zu 144 h eine beständige Herunterregulation sowohl der EGFR-mRNA als auch des Proteins gezeigt werden konnte, sollte ein funktioneller Effekt auf die untersuchten Zellen in diesem Zeitraum jedoch nachweisbar sein.

Zu den oben genannten Veröffentlichungen mit *antisense*-Oligonukleotiden gegen EGFR ist noch anzumerken, dass bis auf Pu et al. (C6 Ratten-Gliomzelllinie) und Rubenstein (humane T98G-Zellen) alle anderen Arbeiten mit der humanen Gliomzelllinie U87

durchgeführt wurden, so dass neben der Verwendung eines stabilen Transfektionssystems die Untersuchungen auch auf ein sehr enges Spektrum unterschiedlicher Gliomzellen beschränkt waren.

Erstaunlicherweise gibt es kaum Untersuchungen zur Wirkung von EGFR-Inhibitoren aus der Substanzklasse der Antikörper (z. B. Cetuximab) oder der *small molecules* (Gefitinib, Erlotinib) in humanen Gliomen, trotz der Beispielfunktion dieser Tumore für eine veränderte EGFR-Expression. Die einzig bisher veröffentlichte Untersuchung zur Wirkung von Cetuximab in Gliomzellen zeigte einen Zellzyklusarrest und eine verstärkte Apoptose nur in Linien mit EGFR-Genamplifikation. Zellen ohne Amplifikation (z. B. U373 MG) wurden nicht inhibiert (Eller et al., 2002). Der Effekt von Erlotinib (Tarceva) auf neun GBM-Zelllinien hinsichtlich Proliferation, Kolonienbildung im Soft Agar, Apoptose *in vitro* und Tumorwachstum *in vivo* wurde von Halatsch et al. untersucht. Hierbei zeigte sich einerseits, dass kein Zusammenhang zwischen basalem EGFR-Expressionsniveau und Sensitivität gegenüber dem Inhibitor bestand, dass im Vergleich zu anderen Tumoren (z.B. Kolonkarzinom, Kopf-Hals-Tumore) eine erheblich höhere Konzentration notwendig war, um eine signifikante Hemmung der Proliferation zu erreichen und dass die Ansprechrate der verschiedenen Gliomzellen sehr unterschiedlich war. Der wachstumshemmende Effekt von Erlotinib zeigte sich vor allem im dreidimensionalen Medium und konnte durch die zelleigene Induktion der EGFR-mRNA teilweise aufgehoben werden (Halatsch et al., 2004). Etwas mehr Literatur ist verfügbar zur Anwendung von Gefitinib (Iressa). Während Stea et al. eine Erhöhung der Apoptoserate bei Kombination von Bestrahlung und Gefitinib-Gabe beobachteten (Stea et al., 2003), fanden Sundberg et al. bei Behandlung mit Gefitinib alleine keine Proliferationshemmung in der untersuchten Gliomzelllinie (Sundberg et al., 2003). In einer Phase II-Studie in Patienten mit rezidivierendem GBM konnte in keinem Fall eine objektive Tumorantwort bei Einsatz von Gefitinib festgestellt werden (Rich et al., 2004).

Einen möglichen Erklärungsansatz für die beobachteten schwachen Effekte in den genannten Publikationen und für unsere eigenen Ergebnisse bietet die Arbeit von Li et al. (Li et al., 2003). Dort konnte gezeigt werden, dass es bei Einsatz von Gefitinib in verschiedenen GBM-Zelllinien zu einer sehr effizienten Inhibition der EGFR-Phosphorylierung kam, dass unabhängig davon aber die EGF-abhängige Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege (Aktivierung von PKB/AKT und Erk1/2) dennoch stattfand.

Die Hemmung dieser Kinasen erforderte eine sehr viel höhere Konzentration an Inhibitor. Sowohl EGF-induzierte Proliferation als auch das unverminderte Durchlaufen des Zellzyklus konnten trotz vollständiger Blockade der Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden, wobei diese Effekte unabhängig vom ursprünglichen EGFR-Expressionsniveau waren. Bei Verwendung eines zweiten spezifischen EGFR-Inhibitors der gleichen Substanzklasse zeigte sich sogar eine leichte Erhöhung des Anteils der sich in der S-Phase befindenden Zellen, was an die von uns gefundene Tendenz der U373 MG-Zellen zur leicht vermehrten Kolonienbildung im Soft Agar nach siRNA-Transfektion erinnert (3.3.3, Abb. 26).

Obwohl es sich hier um eine von den siRNAs völlig verschiedene Substanzklasse handelt, lassen sich aus den Ergebnissen von Li et al. möglicherweise Rückschlüsse auf die von uns erhaltenen Resultate ziehen. Da anscheinend eine vom EGFR-Aktivierungszustand abgekoppelte Signalgebung in Gliomen möglich ist, wäre es denkbar, dass auch die siRNA-vermittelte Regulation des Rezeptors nicht ausreichend ist, um eine negative Modulation von PKB oder Erk1/2 zu erreichen. Der Mechanismus, durch den bei höheren Konzentrationen von Gefitinib doch eine Hemmung stattfindet, ist ungeklärt. Dieser Effekt ist aber durch siRNAs höchstwahrscheinlich nicht vermittelbar, da er sich einerseits nicht unbedingt auf den EGF-Rezeptor selbst beziehen muss (es wären z.B. unspezifische Effekte unterhalb der Signalebene des Rezeptors denkbar) und andererseits die maximal erreichbare Herunterregulierung durch die siRNAs nie 100 % erreichen wird. Die von uns eingesetzten Konzentrationen an AG1478 entsprachen den bei Li et al. angesprochenen hohen Dosen von Gefitinib, in Übereinstimmung hierzu waren auch sowohl PKB als auch Erk1/2-Phosphorylierung durch AG1478 vermindert (vgl. 3.3.6.1, 3.3.6.2). Da wir als Bewertungsgrundlage einer erfolgreichen Hemmung durch AG1478 aber nicht den EGFR-Phosphorylierungsstatus, sondern die Zellproliferation gewählt hatten, kann hier leider keine Aussage über einen möglicherweise ähnlichen Effekt dieses Inhibitors im niedrig dosierten Bereich gemacht werden.

Die Unabhängigkeit der Signalvermittlung von der EGFR-Inhibition könnte in den von uns untersuchten Zellen gegeben sein durch einen alternativen Weg der Weiterleitung über einen anderen Rezeptor. Hierfür kämen zum einen die anderen Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie in Frage. Neben EGFR (ErbB1) spielt vor allem ErbB2 und dessen fehlregulierte Expression bei der Entstehung und der Progression verschiedener humaner

Tumore eine Rolle (Olayioye et al., 2000). Alle ErbBs bilden präferentiell Heterodimere mit ErbB2, dessen Bindung die nachgeschaltete Signalgebung potenziert. Das Heterodimer aus ErbB2 und ErbB3 ist beispielsweise dasjenige mit dem größten transformierenden Potential und kann sowohl die Signalwege der Jun-Kinase als auch die der MAPK-Kaskade und der PI(3)-Kinase aktivieren (Yarden und Sliwkowski, 2001). Die Expression von ErbB2-4 in Gliomen ist bis heute nur wenig untersucht. Obwohl einige Daten eine (Über-) Expression von ErbB2 sowohl in primären Zellen als auch in etablierten Linien zeigten (Engelhard et al., 1995; Kristt et al., 1993; Schwechheimer et al., 1994; Westphal et al., 1997), konnte keine Korrelation zwischen erbB2-Expression und Prognose hergestellt werden (Haapasalo et al., 1996; Hiesiger et al., 1993; Schwechheimer et al., 1994). Während Westphal et al. die Expression von ErbB2 in ca. 75 % und die von ErbB3 und ErbB4 in ca. 50 % der untersuchten Gliomzellen nachweisen konnten (Westphal et al., 1997), zeigt eine neuere Untersuchung nur eine sehr schwache Expression aller drei Rezeptoren in verschiedenen Gliomzelllinien (Andersson et al., 2004). Die von uns verwendeten U373 MG-Zellen wurden von Lammering et al. in Untersuchungen zur Verbesserung der Strahlentherapie in humanen Tumoren durch Einsatz eines dominant-negativen EGFRs verwendet (Lammering et al., 2003). Hier wurde gezeigt, dass U373 MG-Zellen ErbB2, nicht aber ErbB3 und ErbB4 exprimieren. Für unsere Untersuchungen würde das bedeuten, dass nach siRNA-vermittelter EGFR-Regulation für ErbB2 kein Bindungspartner für die Bildung von Heterodimeren mehr vorhanden wäre. Obwohl ErbB2 keinen Liganden mit hoher Affinität bindet, können aber dennoch Homodimere gebildet und durch Transphosphorylierung aktiviert werden. Diese können bspw. das invasive Potential von untransformierten und malignen Mammaepithelzellen erhöhen (Seton-Rogers et al., 2004). Es wäre also denkbar, dass bei siRNA-vermitteltem Verlust des EGFR in den hier untersuchten Gliomzellen die Signalgebung durch ErbB2 aufrecht erhalten wird. Einerseits wäre die Bildung von ErbB2-Homodimeren denkbar, andererseits lässt sich aber auch nicht ausschließen, dass die Restmenge an noch vorhandenem EGFR-Protein zur Signalgebung beiträgt. Durch spezifische Blockade von ErbB2 könnte daher möglicherweise ein inhibierender Effekt auf die U373 MG-Zellen vermittelt werden.

Neben ErbB2 käme für eine Kompensation des EGFR-Verlusts bspw. auch der *insulin-like growth factor receptor I* (IGF1R) in Betracht, für den nachgewiesen wurde, dass er in

Gliomzellen eine Resistenz gegenüber AG1478 vermitteln kann (Chakravarti et al., 2002). Schließlich wäre es alternativ auch denkbar, dass die kleine Menge an noch vorhandenem EGFR ausreichend ist, um die nachfolgende Signalgebung aufrechtzuerhalten.

Zwei Arbeiten sind mittlerweile erschienen, die den Einsatz von siRNAs gegen den EGFR beschreiben. Nagy et al. konnten die Herunterregulierung des Rezeptors und die Inhibition der Proliferation eines Teils der untersuchten Zellen zeigen (Nagy et al., 2003). Allerdings handelte es sich hier um die A431-Linie, die besonders sensitiv gegenüber einer EGFR-Blockade reagiert, auch unter Bedingungen, unter denen sich bspw. Mamma- und Lungenkarzinomzellen (NSCLC) als resistent erwiesen haben (Bianco et al., 2003; Janmaat et al., 2003). Die Transfektion von HeLa-Zellen mit EGFR-spezifischer siRNA hingegen zeigte keine Wirkung auf deren Wachstumsverhalten. Eine zweite Publikation beschreibt ähnliche Ergebnisse wie in A431 für die hier verwendeten A549-Zellen (Lungenadenokarzinom; Zhang et al., 2004). Beide Gruppen postulieren als Grund für die beobachtete Proliferationshemmung trotz der verbleibenden Restexpression an EGFR (bis ca. 30 % der ursprünglichen Menge bei Zhang et al.) einen Schwellenwert für die Signalgebung. Fällt die EGFR-Menge unter ein bestimmtes Niveau, käme es zu einer völligen Abschaltung der Signaltransduktion. Dies steht wiederum im Widerspruch zu den von uns gefundenen Verhältnissen in den Gliomzellen, bei denen trotz einer starken EGFR-Regulation die nachfolgenden Signale nicht betroffen sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich ein komplexes Bild für die Rolle des EGFR in den verschiedenen Tumoren ergibt. Bisher gibt es keine Untersuchungen zur siRNA-vermittelten Regulation des EGFR in humanen Gliomzellen. Die in anderen Tumoren beobachteten Effekte auf das Proliferationsverhalten lassen sich möglicherweise durch zelltypabhängige Eigenschaften erklären, wobei die tatsächliche Abhängigkeit der jeweiligen Zelle von der EGFR-Signalgebung entscheidend sein könnte und nicht das Expressionsniveau des Rezeptors. Beispielsweise ließ sich auch in unseren Experimenten kein Unterschied in der Reaktion auf die EGFR-Modulation in niedrig (U373 MG) und hoch exprimierenden (LN18) Zellen finden.

Die durch den Einsatz von Antisense-Molekülen gegen den EGFR beschriebenen inhibierenden Effekte sind nicht einfach erklärbar. Allerdings handelt es sich hierbei um Untersuchungen, die einerseits größtenteils mit einer der transienten Transfektion von

siRNAs nicht unbedingt vergleichbaren Technologie durchgeführt wurden und andererseits auf sehr wenige Zelllinien beschränkt waren, so dass sich diese Ergebnisse möglicherweise nicht ohne weiteres auf andere Gliomzellen übertragen lassen.

Aus der überraschend geringen Anzahl an Veröffentlichungen und den dort dargestellten Experimenten mit kleinen inhibierenden Molekülen und Antikörpern kann man auf eine im Vergleich zu anderen Tumoren erhöhte Resistenz der Gliome gegen die Inhibierung der EGFR-Signaltransduktion schließen. Zudem wird ein sehr heterogenes Ansprechen unterschiedlicher Zelllinien unabhängig von deren EGFR-Expressionsstatus deutlich.

#### **4.4 Analyse der Genexpression von Gliomzellen nach Transfektion mit EGFR-spezifischer siRNA**

Um die erhaltenen Ergebnisse eingehender zu beleuchten, wurde untersucht, welchen Einfluss die EGFR-Regulation durch die von uns verwendete siRNA EGR10 auf das Genexpressionsmuster der U373 MG-Zellen hat. Zu diesem Zweck wurden Expressionsanalysen mit Mikroarrays durchgeführt.

Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente angesetzt, wobei U373 MG-Zellen mit siRNA EGR10 bzw. Kontroll-siRNA EGR12 transfiziert wurden. Bei einer *principal component* Analyse aller Experimente stellte sich heraus, dass nicht die jeweiligen Behandlungsgruppen (siRNA EGR10 vs. siRNA EGR12) einen gemeinsamen *Cluster* bildeten, sondern die drei Einzelerperimente sich in ihrem Expressionsmuster ähnlicher waren. Dies kann entweder auf zellkulturbedingte Unterschiede oder auf Unterschiede in der Array-Prozessierung bzw. auf den Mikroarrays selbst (z. B. Abweichungen in den Hybridisierungseigenschaften) zurückzuführen sein. Es ließ sich also nur jeweils eine paarweise Analyse durchführen, die Schnittmenge derjenigen Gene, die sich in allen Experimenten als differentiell exprimiert herausstellten, wurde näher untersucht (vgl. 3.4).

##### **4.4.1 Regulation von EGFR-spezifischen Transkripten**

Zunächst ließ sich die prinzipielle Gültigkeit der in den Mikroarrays erhaltenen Resultate untermauern durch das Ergebnis, dass der EGFR das am stärksten regulierte Transkript darstellte. Dessen ca. 5fache Herunterregulierung (vgl. 3.4, Tab. 11) entsprach den in der

*real-time* PCR erhaltenen Werten und einer Reduktion der mRNA-Menge um rund 80 %. Insgesamt wurde der EGFR auf dem verwendeten Array durch sechs unterschiedlichen *Probe Sets* repräsentiert, zwei davon wurden als differentiell reguliert gewertet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen *Probe Sets* können verschiedene Ursachen haben. Zum einen werden die Oligonukleotide auf den Arrays nicht auf ihre Hybridisierungseigenschaften hin überprüft, so dass Unterschiede in der Affinität zum Zielgen z. B. in Abhängigkeit vom GC-Gehalt bestehen können. Außerdem kann eine Hybridisierung der Proben-cRNA an die sogenannten *mismatch*-Oligonukleotide erfolgen. Fällt diese unspezifische Hybridisierung zu stark aus, kann das *Probe Set* ebenfalls als *not present* gewertet werden.

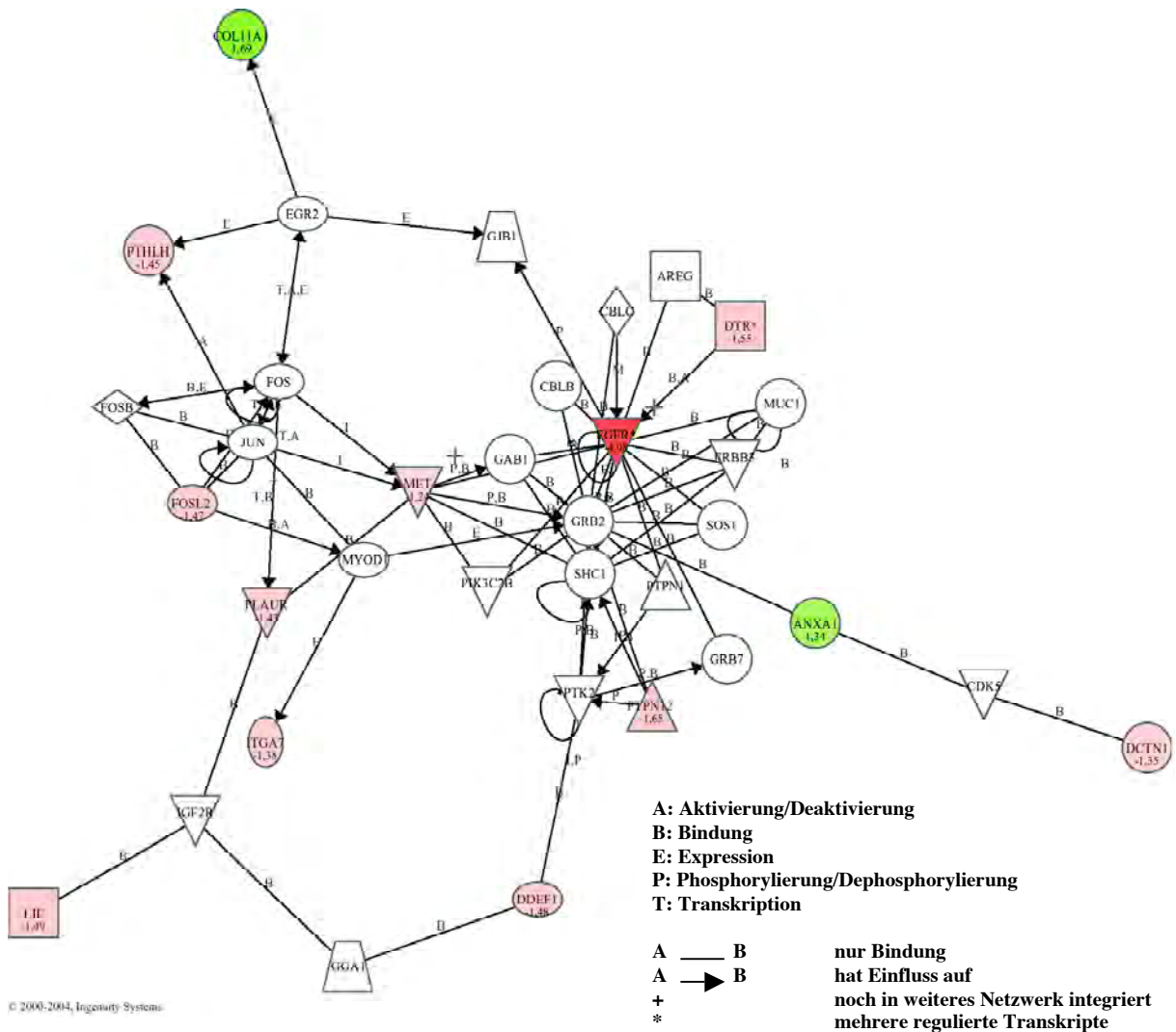
Eines der sechs *Probe Sets* (211551\_at) repräsentiert laut Affymetrix eine aberrante EGFR-mRNA, die bisher ausschließlich in der epidermalen Karzinomzelllinie A431 gefunden wurde (Merlino et al., 1985). Interessanterweise wurde dieses *Probe Set* in allen von uns durchgeführten Array-Experimenten durchgehend detektiert, man findet aber keine Regulation durch die siRNA EGR10. Dieses Transkript codiert für eine verkürzte 2.8 kB lange mRNA, deren Sequenz zunächst mit der des EGFR übereinstimmt, sich aber ab Intron 16 von der normalen Basenfolge unterscheidet (Merlino et al., 1985; Reiter et al., 2001). Allerdings fanden die Autoren für diese abweichenden 525 bp keine entsprechende genomische Sequenz und keinerlei Homologien, so dass die Entstehung eines neuartigen Exons postuliert wurde (Reiter et al., 2001). Die Detektion dieser Mutation in den von uns untersuchten U373 MG-Gliomzellen war überraschend. Bei näherer Überprüfung zeigte sich, dass zum einen die Sequenz von siRNA EGR10 in der von der normalen EGFR-Basenfolge abweichenden Teil gelegen ist und so keine Regulation dieses „EGFR-Transkripts“ stattfinden konnte. Zum anderen stellte sich bei einer BLAST-Suchabfrage für die unbekannte Sequenz heraus, dass entgegen den Angaben von Reiter et al. ein Stück abwärts vom 3' Ende des EGFR eine 98 %ige Übereinstimmung mit einem im Pseudogen CALM1P2 (*calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta) pseudogene 2*) gelegenen Abschnitt vorhanden ist. Dieses Gen ist nicht funktionell, es bestehen auch keine Homologien zu möglicherweise codierenden Sequenzen in Maus oder Ratte. Wahrscheinlich handelt es sich also bei der in den Mikroarray gefundenen positiven Hybridisierung an dieses *Probe Set* nicht um den Nachweis des aberranten 2.8 kB EGFR-Transkripts, sondern um die weiter *downstream* im Chromosom 7 gefundene Sequenz.

Durch eine PCR könnte die möglicherweise von Affymetrix fälschlich als EGFR-spezifisch ausgewiesene Annotation dieses Probe Sets nachgewiesen werden.

In Zusammenarbeit mit Dr. Bernd Becker (Institut für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) war es möglich, mit den von uns differentiell regulierten Transkripten eine sogenannte *Pathway*-Analyse durchzuführen (Ingenuity Pathways Analysis, Ingenuity Systems), bei der durch eine elektronische Datenbank auf alle aus der Literatur bekannten Informationen über ein bestimmtes Gen und dessen Verbindung zu anderen Genen zugegriffen und so ein Netzwerk aus miteinander verknüpften Signalwegen generiert werden kann. Dadurch wurde eine mögliche funktionelle Gruppierung der regulierten Gene vereinfacht. Ist ein Transkript unbekannt, sein Produkt noch nicht ausreichend charakterisiert, oder bestehen keine bekannten Interaktionen mit anderen Proteinen, taucht es in der Analyse nicht auf.

Die zentrale Rolle des EGFR bei den in den Mikroarrays gefundenen transkriptionellen Unterschieden wurde dadurch verdeutlicht, dass er in zwei der durch die *Pathway*-Analyse erstellten Netzwerke im Mittelpunkt eines *clusters* von differentiell regulierten Genen zu finden war. Daraus lässt sich ein guter Hinweis auf die Abhängigkeit der gefundenen Expressionsänderung der dort aufgeführten Gene von der verminderten EGFR-Menge ableiten. In Abbildung 33 ist exemplarisch eines dieser beiden Netzwerke dargestellt.





**Abb. 33: Beispiel eines der Netzwerke von differentiell regulierten Genen nach Knockdown des EGFR durch siRNA EGR10**

Gezeigt ist exemplarisch eines der durch die *Pathway*-Analyse erstellten Netzwerke, das die Gruppierung von einem Teil der differentiell regulierten Gene um den zentralen EGFR zeigt. Grüner Hintergrund markiert aufregulierte, rötlicher dagegen reprimierte Gene. Weiß sind Transkripte hinterlegt, die in diesem Netzwerk integriert sind, deren Expression aber nicht verändert wurde. Für SHC1 (-1,35) ist fälschlicherweise keine Regulation angezeigt (ANXA1: Annexin A1; COL11A: Collagen Typ XI alpha 1; DCTN1: Dynactin 1; DDEF1: *development and differentiation enhancing factor 1*; DTR: *diphtheria toxin receptor/HB-EGF*; FOSL2: *FOS-like antigen 2*; ITGA7: Integrin alpha 7; LIF: *leukemia-inhibitory factor*; MET: *met Proto-Onkogen/ hepatocyte growth factor receptor*; PLAUR: *plasminogen activator urokinase receptor*; PTHLH: *parathyroid hormone-like hormone*; PTPN12: *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 12*).

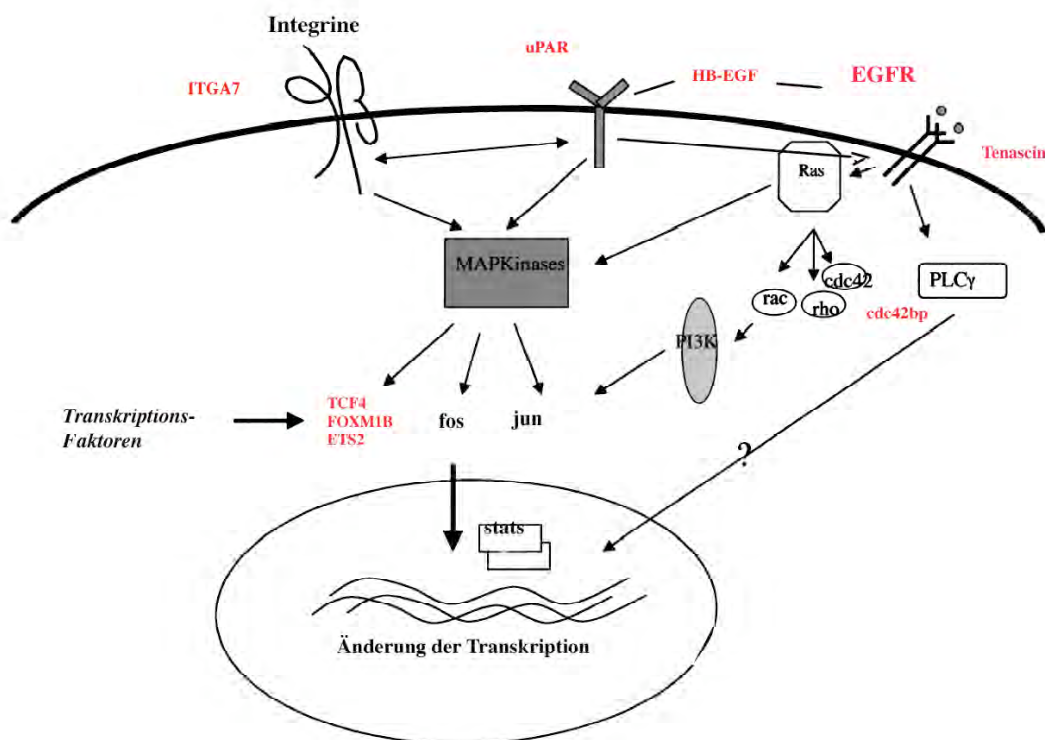
#### **4.4.2 Reprimierte Gene**

Neben dem EGFR waren noch 51 weitere Gene negativ reguliert. Unter ihnen befanden sich auffallend viele, denen eine Rolle in der Adhäsion und Migration von Zellen zugesprochen wird. Neben dem EGFR selbst sind das z. B. *IQ motif containing GTPase activating protein* (IQGAP, -1,77fach reguliert), dessen Amplifikation und Überexpression in Tumorzelllinien gefunden wurde und das an der Invasionsfront metastasierender Zellen lokalisiert sein kann. Außerdem wird durch IQGAP durch Verminderung von Zell-Zell-Verbindungen und über die Bindung an CDC42 die Invasion stimuliert (Briggs und Sacks, 2003; Mataraza et al., 2003; Mateer et al., 2003). Obwohl CDC42 (Familie der kleinen Rho-GTPasen: CDC42, Rho, Rac) selbst nicht reguliert ist, findet man eine Verminderung an *CDC42 binding protein kinase beta* (CDC42BPB, -1,49), für das eine Rolle als Effektor von CDC42 bei der Umstrukturierung des Zytoskeletts postuliert wurde (Leung et al., 1998). Ebenfalls negativ reguliert ist ein weiterer Modulator der Rho-Familie, *Tiam1 (t-cell lymphoma invasion and metastasis 1)*, der ein Vermittler der ras-induzierten Tumorbildung ist (Malliri et al., 2002) und durch Stimulation von Migration und Invasion zu einer erhöhten Malignität in Mammakarzinomen führt (Minard et al., 2004). Ein vergleichsweise stark reprimiertes Transkript ist das von *endothelial and smooth muscle derived neuropilin-like protein* (ESDN, -1,7fach reguliert), ein noch weitgehend unbekanntes Protein für das eine erhöhte Expression in metastasierenden Lungenkarzinomen gefunden wurde (Koshikawa et al., 2002). Durch DDEF1 (*development- and differentiation-enhancing factor 1*, -1,48fach) wurde neben einer unspezifischen Erhöhung der Zellmotilität (Furman et al., 2002) kürzlich auch eine Rolle beim Recycling des EGFR entdeckt (Kowanetz et al., 2004).

Ein funktioneller Zusammenhang in der Vermittlung transformierender und invasionsfördernder Prozesse kann zwischen EGFR, *urokinase plasminogen activator receptor* (uPAR, -1,43fach), den Integrinen (ITGA7, -1,38fach) und weiteren mit ihnen assoziierten Proteinen hergestellt werden. uPAR spielt eine prominente Rolle in der Regulation der Motilität in verschiedenen Zelltypen, einerseits durch die proteolytische Aktivität der gebundenen Protease uPA, andererseits durch die Induktion einer Signaltransduktion nach Bindung an andere Membranproteine und die dadurch vermittelte Änderung in Struktur und Adhäsionsverhalten der Zelle (Kjoller, 2002). Eine transkriptionelle Hochregulation der uPAR-Expression konnte in hochmalignen gegenüber

niedriggradigen Gliomen gezeigt werden (Bhattacharya et al., 2001). In den letzten Jahren hat sich eine funktionelle Verknüpfung von EGFR und uPAR gezeigt, bei der EGFR durch uPAR transaktiviert und dadurch intrazellulär die MAPK-Kaskade angeschaltet wird. (Guerrero et al., 2004; Jo et al., 2003; Liu et al., 2002). EGF bewirkt außerdem die transkriptionelle Hochregulation des uPAR-Transkripts in Prostatakarzinom-Zelllinien (Unlu und Leake, 2003). Eine weitere Verbindung besteht durch den uPAR-aktivierbaren *hepatocyte growth factor* Rezeptor (Proto-Onkogen c-met, -1,24fach), der wiederum von EGFR phosphoryliert werden kann (Jo et al., 2000). Das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin C (TNC, -1,27fach) wird besonders von malignen Gliomen stark exprimiert (Higuchi et al., 1993) und seine stimulatorische Wirkung auf Proliferation und Migration wurde in diesen Tumoren nachgewiesen (Herold-Mende et al., 2002). Interessant ist, das TNC als membrangebundener Ligand für EGFR fungieren und so dessen Aktivierung bewirken kann (Swindle et al., 2001). Tenascin C über EGFR und *hepatocyte growth factor* über c-met wiederum vermitteln gemeinsam Signale, die einen invasiven Phänotyp von Myofibroblasten in Kolonkarzinomen bewirken (De Wever et al., 2004). Auch die differentielle Expression des Integrins  $\alpha 7$  (ITGA 7), das den spezifische Rezeptor für das ECM-Protein Laminin darstellt, könnte in dieses Netzwerk passen.

Schließlich ist auch noch *heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) negativ reguliert (-1,6fach). Für diesen EGFR-Ligand wurde eine stark erhöhte Expression in malignen Gliomen gegenüber normalem Hirngewebe gefunden, seine Inhibition durch blockierende Antikörper resultierte in einer Hemmung der Proliferation, so dass hier ein autokriner Rückkopplungseffekt postuliert werden konnte (Mishima et al., 1998). Daneben kann die Expression von HB-EGF-RNA und -Protein auch durch EGF stimuliert werden (Martinez-Lacaci et al., 2001). HB-EGF wird v. a. mit der Transaktivierung von EGFR durch verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) in Verbindung gebracht. Dabei wird membranständiger HB-EGF nach GPCR-Aktivierung durch eine noch uncharakterisierte Metalloproteinase prozessiert, seine Bindung an EGFR führt dann zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Gschwind et al., 2001; Prenzel et al., 1999). Eine davon abhängige Migration konnte in glatten Muskelzellen (Kalmes et al., 2000), Keratinozyten (Tokumar et al., 2000) und Prostatakarzinomzellen (Madarame et al., 2003) gezeigt werden. Abb. 34 zeigt einige der genannten Proteine und ihr hypothetisches Zusammenwirken mit EGFR.



**Abb. 34: Möglicher funktioneller Zusammenhang verschiedener Matrixproteine und nachgeschalteter Signalgebung mit dem EGFR**

Dargestellt sind mögliche Interaktionen zwischen dem EGF-Rezeptor und mehreren, in der Mikroarrayanalyse als differentiell exprimiert gefundenen Proteinen (rot markiert), die eine Rolle bei Zellmotilität und Invasionsvorgängen spielen könnten (nähere Erläuterungen im Text; verändert aus Kassis et al., 2001).

Bei Fibronectin (Ohnishi et al., 1998), das auch in unserer Untersuchung herunterreguliert war, ebenso wie MAP4K4, das einerseits ein spezifischer Aktivator der Jun-Kinase ist, andererseits Transformations und Adhäsionsprozesse moduliert (Wright et al., 2003) handelt es sich um weitere Transkripte, die eine Implikation in der Migration von Tumorzellen haben. Ebenso bei *parathyroid hormone-related protein* (PTH<sub>LH</sub>/PTH<sub>RP</sub>, -1,45fach), das in normalen adulten Geweben nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird, in Tumoren aber häufig aufreguliert ist (Shen und Falzon, 2003; Shen et al., 2004; Surowiak et al., 2003). Anzumerken ist, dass die PTH<sub>LH</sub>-Transkription durch eine EGFR-Blockade inhibiert (Cho et al., 2004) und durch EGF-Gabe in U373 MG-Zellen stimuliert wird (Shankar et al., 2000).

Insgesamt handelt es sich hier um die negative Regulation von Genen, die primär mit migratorischen, nicht mit proliferativen Prozessen in Verbindung gebracht werden können.

Daneben finden sich allerdings auch vier Transkriptionsfaktoren (TFs) mit Einfluss auf die Zellproliferation. Zum einen TCF7L2 (T cell factor 4/TCF4, -1,43) der durch EGF über PKB aktiviert werden kann. FOSL2 (Fos-like antigen 2, -1,47), der zur Familie der Fos-Gene gehört, die zusammen mit Proteinen der Jun-Familie den Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1 bilden und Proliferation und Transformationsvorgänge steuern können. Fos-TFs wurden als mögliche Vermittler einer durch Wachstumsfaktoren gesteuerten Änderung der Transkription zur Stimulation von Motilität und Invasion genannt (Kustikova et al., 1998; Malliri et al., 1998). *Forkhead box transcription factor 1B* (FOXM1B) spielt eine Rolle in der transkriptionellen Regulation von Cylin B und Cyclin D (Wang et al., 2001), in der Tumorigenese von Nierenzellkarzinomen (Kalinichenko et al., 2004) und wurde außerdem in zwei Mikroarraystudien zur differentiellen Expression von hochgradigen vs. benignen Gliomen (Rickman et al., 2001), bzw. bei der Progression zum Glioblastom (van den Boom et al., 2003) als speziell in den hochmalignen Formen aufreguliert gefunden. Zuletzt findet man mit einer nur sehr schwach veränderten Expression ETS2, der ebenfalls durch EGF aktiviert werden kann (Watabe et al., 1998) wodurch beispielsweise die Transkription von HB-EGF (McCarthy et al., 1997) und die des putativen Suppressorgens *ras-induced senescence 1* (ris1, -1,55; Barradas et al., 2002) induziert wird. Außerdem wird auch die Expression von uPA und uPAR durch ets-2 gesteuert (Watabe et al., 1998). Daneben findet man mit HMGA1 (*high mobility group AT-hook 1*, -1,41fach) noch ein weiteres genregulatorisches Protein reprimiert, das durch Bindung an DNA deren Struktur moduliert und so eine Transkription initiiert. Die HMGA1-Expression korreliert direkt mit der Progression verschiedener Tumoren zu höhergradigen und metastasierenden Stadien (Holth et al., 1997; Reeves und Beckerbauer, 2003), ein Befund der jetzt auch in Gliomen nachgewiesen werden konnte (Donato et al., 2004).

#### **4.4.3 Induzierte Gene**

Betrachtet man die Liste der induzierten Gene ergibt sich ein sehr heterogenes Bild. Während man die oben genannten negativ regulierten Gene bestätigend zum größten Teil in nächster Umgebung des zentralen EGFR wiederfinden konnte, waren nur wenige der hochregulierten Transkripte mit anderen Genen in Verbindung zu bringen. Der Großteil der überhaupt in die Analyse eingegangenen Gene gruppierte sich hierbei in größerer

Entfernung um den Transkriptionsfaktor *myc*. Dazu gehörten das relativ neue *myc-binding protein* (MYCBP/AMY1, +1,64fach), das die Transkriptionsaktivität von *myc* stimulieren kann (Taira et al., 1998). Das SCA1-Gen (*spinocerebellar ataxia 1/Ataxin1*, +1,58fach), ein Protein aus einer Genfamilie mit unbekannter Funktion, in der jedoch häufig Mutationen zu finden sind, die zu einer Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen (autosomal dominante cerebelläre Ataxien, ADCA) führen. Ataxin1 ist im Zellkern lokalisiert und bindet an RNA (Servadio et al., 1995; Yue et al., 2001), so dass ihm eine Rolle im RNA-Metabolismus zugesprochen wurde. Neueste Untersuchungen zeigen, dass Ataxin1 als transkriptioneller Repressor fungieren und diese Funktion bei einer Mutation gestört sein könnte (Tsai et al., 2004). Außerdem wird durch *myc* offenbar die Transkription von ARL6IP (*ADP-Ribosylation factor-like 6 interacting protein*, +1,9fach) gesteuert, ein Mitglied der ARF-Überfamilie GTP-bindender Proteine. Auch dieses Protein ist nicht näher charakterisiert, durch seine Lokalisation in intrazytoplasmatischen Membranen wurde aber eine Rolle bei zellulären Transportvorgängen vorgeschlagen (Pettersson et al., 2000). Daneben findet man noch ein Mitglied der apoptosefördernden Familie der TNF-Rezeptoren (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b*, TNFRSF10b, +1,47fach) aufreguliert. Abgesehen von ihrer scheinbaren transkriptionellen Verknüpfung mit *myc* sind diese Gene schwer in einen funktionellen Zusammenhang zu bringen. Das vielleicht interessanteste Ergebnis in dieser Gruppe stellt die verhältnismäßig starke Induktion der Expression des Typ B Endothelin Rezeptors (EDNRB, +1,65fach) dar. Dessen Liganden (Endothelin 1-3/ET-1-3) sind stark gefäßmodulierende Moleküle, ET-1 ist ein wachstumsförderndes, proangiogenetisches und antiapoptotisches Peptid für verschiedene Tumore. In Gliomen wird ET-1 hauptsächlich von den Blutgefäßen gebildet, während die Tumorzellen EDNRB exprimieren (Egidy et al., 2000). In dieser Arbeit wurde außerdem festgestellt, dass durch ET-1 über EDNRB v. a. antiapoptotische, nicht proliferationsfördernde Signale über die Proteinkinase C und die Aktivierung der MAPK-Kaskade vermittelt werden. In Melanomen gilt EDNRB als Progressionsmarker und kürzlich wurde sein Einfluss auf die Veränderung von Zell-Zell-Kontakten mit nachfolgender Migration und Invasion in diesen Tumoren nachgewiesen (Bagnato et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse wurden in Mammakarzinomen (Grimshaw et al., 2004) und Neuroblastomen (Berry und Burchill, 2002) erzielt. Da es sich bei EDNRB um einen *G-protein coupled receptor* (GPCR) handelt, für den eine Transaktivierung des EGFR

(Iwasaki et al., 1999; Vacca et al., 2000) nachgewiesen wurde, könnte man spekulieren, dass in den von uns untersuchten Gliomzellen durch die Hochregulation dieses Rezeptors möglicherweise eine teilweise Kompensation einer durch die EGFR-Reduktion verminderten Signalgebung stattfindet. Dies würde allerdings voraussetzen, dass nicht die Restmenge an EGFR ausreichend für dessen normale Funktion ist.

Schließlich findet man noch als das am stärksten hochregulierte Transkript HMGN3 (*high mobility group nucleosomal binding protein 3/TRIP7*, +2,05fach), ein Protein, von dem angenommen wird, dass es durch Bindung an DNA die Chromatinstruktur verändert und so die Aktivierung der Transkription auslöst. Es handelt sich auch hier um ein weitgehend uncharakterisiertes Protein, dessen Expressionsmuster in Mäusen eine gute Übereinstimmung mit demjenigen von *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) aufweist, so dass ihm möglicherweise eine besondere Funktion in Astrozyten zukommt (Ito und Bustin, 2002). Kürzlich konnte die Fähigkeit von HMGN3 zur Steuerung der Transkription spezifischer Gene nachgewiesen werden (West et al., 2004), so dass es sich hier um einen auch in astrozytären Tumoren interessanten neuen Transkriptionsregulator handeln könnte.

Insgesamt konnten durch die Mikroarray-Analyse eine Reihe von Genen identifiziert werden, deren negative Regulation nach Transfektion mit siRNA EGR10 sehr gut mit den Erwartungen übereinstimmt, da sie direkt durch EGF stimuliert werden oder von der EGFR-Signalgebung abhängig sind (*Src homology 2 domain containing transforming protein 1/SHC1*, eines der primären Adaptermoleküle für die EGFR-Signalgebung ist ebenfalls reprimiert, vgl. Abb. 33). Es finden sich mehrere Gene, deren Produkte mit einer Veränderung adhäsiver und migratorischer Eigenschaften in Verbindung gebracht werden, so dass auf eine reduzierte Motilität oder Fähigkeit der U373 MG-Zellen zur Invasion geschlossen werden könnte. Eine solche Wirkung ließ sich jedoch in den *in vitro* durchgeführten Experimenten nicht nachweisen. Andererseits bestätigen die hier dargestellten Daten eine Reihe von Untersuchungen, die das Bild eines komplexen Netzwerks der Signalgebung zwischen EGFR und verschiedenen anderen Membranrezeptoren vermitteln. Möglicherweise kann ein durch die siRNA vermittelter Effekt in den hier untersuchten Zellen durch gegenläufige Regulationsmechanismen teilweise kompensiert werden. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass die in den Mikroarray-Untersuchungen gefundenen Änderungen in der Genexpression nur sehr gering

ausfielen, zudem müssen sie nicht unbedingt in einer veränderten Proteinmenge resultieren. Im ELISA konnte zwar eine Reduktion der IL-8 Proteinmenge um ca. 30 % nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), selbst dies hat aber unter Umständen keine Auswirkungen auf das Verhalten der Zellen in Kultur. Es lässt sich jedoch nicht ganz ausschließen, dass sich die verminderte Expression von migrationsfördernden (wie z.B. UPAR, TNC, PTHLH) und proangiogenetischen Faktoren (IL-8) unter *in vivo*-Bedingungen stärker inhibitorisch auf den Tumor auswirken könnte als das in Zellkultur der Fall ist.

#### **4.4.4 Validierung der Mikroarrays durch quantitative *real-time* PCR**

Zur Validierung der gefundenen Ergebnisse wurde die Expression von fünf exemplarisch ausgewählten Genen in der *real-time* PCR überprüft. Die dort gefundenen Werte stimmten bei vier von fünf Transkripten mit den Ergebnissen der Mikroarrays überein. Die negative Regulation von IQGAP ließ sich im PCR-Experiment dagegen nicht reproduzieren (vgl. 3.5.1, Abb. 32). Daher sollte dieses Ergebnis mit Vorsicht betrachtet werden. Die Ursache für den abweichenden Befund könnte zum einen ein falsch positives Ergebnis in der Array-Analyse sein, was bei den weniger stringent gewählten Analysekrterien denkbar wäre. Dagegen spricht, dass IQGAP auf den Affymetrix-Chips mit drei verschiedenen *Probe Sets* vertreten ist und jedes dieser *Probe Sets* in mindestens einem der drei unabhängigen Experimente negativ reguliert war. Es zeigte sich auch nie eine gegenläufige Aufregulation. Diesem dreimal reproduzierten Ergebnis steht ein weiteres unabhängiges Einzelerperiment gegenüber, da für die *real-time* PCR nicht eine bereits in den Array-Experimenten benutzte cDNA verwendet wurde. In diesem Fall könnte also das Ergebnis der PCR irreführend sein. Dass für die anderen vier Gene dieselbe Regulation wie in den Expressionsanalysen gefunden und das Ergebnis damit ein viertes mal reproduziert wurde, lässt dafür andererseits auf die Zuverlässigkeit der dort gewonnenen Daten schließen.



## **4.5 Ausblick**

Neuere *in vitro* Daten belegen eine mögliche Resistenz und ein heterogenes Ansprechen von Gliomzellen auf eine EGFR-Blockade (Li et al., 2003; Halatsch et al., 2004). Dies gibt vielleicht einen Hinweis darauf, warum trotz der starken Regulation des Rezeptors durch die siRNA und der durch die Genexpressionsanalyse nachgewiesenen spezifischen Änderung in der EGFR-abhängigen Transkription ein funktioneller Nachweis für eine Beeinträchtigung der von uns untersuchten Gliomzellen nicht erbracht werden konnte. Die gefundene Inhibition verschiedener untersuchter Parameter durch das *small molecule* AG1478 ist möglicherweise trotz dessen postulierter Selektivität für den EGFR auf unspezifische Effekte zurückzuführen. Dafür existieren mehrere Hinweise. Zum einen konnte für AG1478 eine unspezifische Hemmung des PDGFR ab Konzentrationen von mehr als 10  $\mu$ M nachgewiesen werden (Lipson et al., 1998). Zum anderen lassen sich aus Untersuchungen zu dem verwandten Molekül Gefitinib Rückschlüsse ziehen, für das ebenfalls eine Wirkung auf weitere Tyrosinkinase neben dem EGFR gefunden wurden (Cohen et al., 2004). Auch der von Li et al. beschriebene fehlende Einfluss von Gefitinib auf EGFR-nachgeschaltete Signalwege trotz völliger Blockade des Rezeptors konnte durch eine starke Erhöhung der eingesetzten Konzentration aufgehoben werden (Li et al., 2003). Möglicherweise waren auch hierfür unspezifische Effekte verantwortlich, zumal gezeigt werden konnte, dass eine Kompensation durch ErbB2 nicht an der Resistenz der Zellen gegenüber Gefitinib beteiligt war (Li et al., 2003).

Mehrere bisher durchgeführte klinische Studien zum Einsatz von EGFR-blockierenden Molekülen wie Gefitinib oder Cetuximab in der Tumorthherapie verliefen enttäuschend (Dancey, 2004). Als Grund hierfür gilt, neben der möglicherweise falschen Dosierung der Wirkstoffe und einer ungünstigen Kombination mit anderen Agenzien, vor allem die mangelnde Selektion der Patienten hinsichtlich der EGFR-Expression bzw. dessen Aktivierungszustands und der Abhängigkeit des Tumors von dieser Signalgebung (Dancey und Freidlin, 2003). Möglicherweise könnte durch ein Austesten weiterer Gliomzelllinien und durch eine Kombination von EGFR-spezifischer siRNA mit Inhibitoren für Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie oder für andere potentielle Kooperationspartner der EGFR-Signalgebung ein weniger maligner Phänotyp in diesen Tumoren induziert werden.

## **V. Zusammenfassung**

Die zu Beginn dieser Arbeit noch völlig neuartige Anwendung von siRNAs in Säugierzellen (Elbashir et al., 2001a) konnte in der vorliegenden Arbeit in humanen Gliomzellen etabliert und im folgenden zur spezifischen Regulation eines tumorrelevanten Gens genutzt werden. Als Zielgen wurde der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gewählt, dessen fehlregulierte Expression ein Hauptmerkmal der hochmalignen Glioblastome darstellt.

Die Applikation der siRNAs wurde zunächst anhand der Regulation des Reportergens eGFP und des Zytoskelett-Proteins  $\beta$ -Aktin untersucht und optimiert.

Im Anschluss wurde eine Reihe gegen den EGFR gerichteter siRNAs synthetisiert und die spezifische Wirksamkeit eines dieser Oligonukleotide (EGR10) durch die bis zu 90 %ige Reduktion sowohl der EGFR-mRNA als auch des EGFR-Proteins nachgewiesen.

Die Auswirkung dieses über einen Zeitraum von mindestens sechs Tagen anhaltenden *Knockdowns* des EGFR auf zwei etablierte Gliomzelllinien (U373 MG und LN18) wurde anhand verschiedener Parameter untersucht. Dabei konnte weder ein Einfluss auf das Proliferationsverhalten, noch auf migratorische Eigenschaften oder Tumorigenität der Zellen festgestellt werden. Der Aktivierungsstatus zweier EGFR-nachgeschalteter Hauptsignalwege, die MAPK-Kaskade und die PI(3)K-abhängige Aktivierung von PKB, wurde durch den Phosphorylierungszustand der beteiligten Kinasen (Erk1/2 bzw. PKB) überprüft. Auch hier konnte keine Verminderung der EGF-stimulierten Signaltransduktion nach Transfektion mit siRNA EGR10 nachgewiesen werden. Dagegen zeigte sich bei Einsatz des synthetischen EGFR-Inhibitors AG1478 ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Zellproliferation. Außerdem wurden auch Migration, Kolonienbildung und der Aktivierungszustand von Erk1/2 und PKB durch AG1478 negativ beeinflusst. Möglicherweise sind diese Ergebnisse auf eine unspezifische Wirkung dieses Inhibitors zurückzuführen, für den in den hier verwendeten Konzentrationsbereichen eine unspezifische Hemmung der Rezeptortyrosinkinase PDGFR nachgewiesen wurde (Lipson et al., 1998).

Zur eingehenderen Überprüfung der siRNA-vermittelten Wirkung auf die hier untersuchten Gliomzellen wurden Genexpressionsanalysen mit Mikroarrays durchgeführt.

Hierbei konnte zum einen gezeigt werden, dass der EGFR entsprechend den *real-time* PCR-Analysen mit einer Reduktion um ca. 80 % das am stärksten regulierte Transkript darstellte. Insgesamt wurden aber nur relativ wenige Gene und vergleichsweise geringe Änderungen in der Expression gefunden. In der Gruppe der herunterregulierten Gene fanden sich einige, deren Produkte bei der Adhäsion, Motilität, Migration und Invasion von Zellen eine Rolle spielen und so zur erhöhten Malignität von Tumoren beitragen können. Die Gruppe der aufregulierten Gene war sehr heterogen mit erhöhter Expression von z. B. anti-apoptischen, aber auch proliferationsfördernden Transkripten. Der geringe Einfluss des EGFR-*Knockdowns* auf die Genexpression steht im Einklang mit den fehlenden Effekten auf zellulärer Ebene.

Die mangelnde Wirkung der spezifischen, siRNA-vermittelten EGFR-Reduktion könnte mehrere Ursachen haben. Einerseits wäre denkbar, dass die nach siRNA-Behandlung noch vorhandene Restmenge an EGFR für die nachfolgende Signalvermittlung ausreichend ist. Andererseits könnte diese von anderen Mitgliedern der ErbB-Rezeptorfamilie (z. B. ErbB2) oder von anderen Tyrosinkinase (z. B. IGF1R) übernommen werden. Schließlich kann auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass die hier untersuchten Gliomzellen von der EGFR-Signalgebung weitgehend unabhängig sind und die Wegnahme dieses Rezeptors keinen negativen Einfluss auf deren Wachstumsverhalten hat. Die mit AG1478 erzielten Effekte wären dann auf eine unspezifische Wirkung dieses synthetischen Inhibitors auf andere Proteine zurückzuführen, eine Hypothese, die in weiteren Arbeiten überprüft werden muss.

## VI. Abkürzungen

abs	absolut
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS-ODN	Antisense-Oligodesoxynukleotid
AS-PTO	Antisense-Phosphorthioat-Oligonukleotid
ATP	Adenosintri-phosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFZ	Durchflusszytometrie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's PBS
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Erk	extrazellulär regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
EZ	Endothelzelle(n)
FACS	fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
f. c.	Endkonzentration
FCS	fötales Kälberserum
FGB	Fischhaut-Gelatine-Puffer
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
gt	Ziege
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde(n)

HRP	Meerrettich-Peroxidase
IC	Immunzytochemie
IGF(1R)	<i>insulin-like growth factor (receptor type 1)</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin-8
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MetOH	Methanol
miRNA	Mikro-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ms	Maus
MW	Molekulargewicht
NC	Nitrozellulose
NEA	nicht-essenzielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
nt	Nukleotide
p.a.	zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF(R)	<i>platelet derived growth factor (receptor)</i>
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
pg	Pikogramm
PI	Propidiumiodid
PI(3)K	Phosphatidyl-Inositol(3)-Kinase
PKB	Proteinkinase B
QRT-PCR	quantitative PCR in Echtzeit
rbt	Kaninchen
RhoX	Rhodamin X
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
(r)RNA	(ribosomale) Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase

---

s	Sekunde(n)
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small/short interfering RNA</i>
sog.	sogenannt
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
uPA(R)	Plasminogen-Aktivator, Urokinase-Typ (Rezeptor)
Upm	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
v	Volumenanteil
v. a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	Vergleiche
Vol.	Volumen
vs.	gegen(über)
w	Gewichtsanteil
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel

## **VII. Literatur**

- Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Pirak, M.E., Bellot, F., Schlessinger, J., Sela, M., 1988. Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against KB carcinoma in vitro and in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 80, 1605-1611.
- Agrawal, S., Kandimalla, E.R., 2000. Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition? *Mol Med Today* 6, 72-81.
- Aleman, R., Gomez-Manzano, C., Balague, C., Yung, W.K., Curiel, D.T., Kyritsis, A.P., Fueyo, J., 1999. Gene therapy for gliomas: molecular targets, adenoviral vectors, and oncolytic adenoviruses. *Exp Cell Res* 252, 1-12.
- Alper, O., De Santis, M.L., Stromberg, K., Hacker, N.F., Cho-Chung, Y.S., Salomon, D.S., 2000. Anti-sense suppression of epidermal growth factor receptor expression alters cellular proliferation, cell-adhesion and tumorigenicity in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 88, 566-574.
- Amarzguioui, M., Prydz, H., 2004. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 1050-1058.
- Andersson, U., Guo, D., Malmer, B., Bergenheim, A.T., Brannstrom, T., Hedman, H., Henriksson, R., 2004. Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol (Berl)*.
- Arteaga, C.L., 2001. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 19, 32S-40S.
- Bagnato, A., Rosano, L., Spinella, F., Di Castro, V., Tecce, R., Natali, P.G., 2004. Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res* 64, 1436-1443.
- Baker, C.H., Kedar, D., McCarty, M.F., Tsan, R., Weber, K.L., Bucana, C.D., Fidler, I.J., 2002. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling on tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of human carcinomas. *Am J Pathol* 161, 929-938.
- Barradas, M., Gonos, E.S., Zebedee, Z., Kolettas, E., Petropoulou, C., Delgado, M.D., Leon, J., Hara, E., Serrano, M., 2002. Identification of a candidate tumor-suppressor gene specifically activated during Ras-induced senescence. *Exp Cell Res* 273, 127-137.
- Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W.H., Jr., Mendelsohn, J., 1993. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* 85, 1327-1333.
- Baulcombe, D., 2002. RNA silencing. *Curr Biol* 12, R82-84.
- Baulida, J., Kraus, M.H., Alimandi, M., Di Fiore, P.P., Carpenter, G., 1996. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 271, 5251-5257.
- Beerli, R.R., Graus-Porta, D., Woods-Cook, K., Chen, X., Yarden, Y., Hynes, N.E., 1995. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol* 15, 6496-6505.

- Berens, M.E., Rief, M.D., Shapiro, J.R., Haskett, D., Giese, A., Joy, A., Coons, S.W., 1996. Proliferation and motility responses of primary and recurrent gliomas related to changes in epidermal growth factor receptor expression. *J Neurooncol* 27, 11-22.
- Bernhardt, G., Reile, H., Birnbock, H., Spruss, T., Schönenberger H., 1992. Standardized kinetic microassay to quantify differential chemosensitivity on the basis of proliferative activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 118, 35-43.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Bernstein, J.J., Woodard, C.A., 1995. Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurgery* 36, 124-132; discussion 132.
- Berry, P., Burchill, S., 2002. Endothelins may modulate invasion and proliferation of Ewing's sarcoma and neuroblastoma. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48, 322S-326S.
- Bertrand, J.R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A., Malvy, C., 2002. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1000-1004.
- Bhattacharya, A., Lakka, S.S., Mohanam, S., Boyd, D., Rao, J.S., 2001. Regulation of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene in different grades of human glioma cell lines. *Clin Cancer Res* 7, 267-276.
- Bianco, C., Tortora, G., Bianco, R., Caputo, R., Veneziani, B.M., Damiano, V., Troiani, T., Fontanini, G., Raben, D., Pepe, S., Bianco, A.R., Ciardiello, F., 2002. Enhancement of antitumor activity of ionizing radiation by combined treatment with the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Clin Cancer Res* 8, 3250-3258.
- Bianco, R., Shin, I., Ritter, C.A., Yakes, F.M., Basso, A., Rosen, N., Tsurutani, J., Dennis, P.A., Mills, G.B., Arteaga, C.L., 2003. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 22, 2812-2822.
- Bigner, S.H., Humphrey, P.A., Wong, A.J., Vogelstein, B., Mark, J., Friedman, H.S., Bigner, D.D., 1990. Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50, 8017-8022.
- Blackledge, G., Averbuch, S., 2004. Gefitinib ('Iressa', ZD1839) and new epidermal growth factor receptor inhibitors. *Br J Cancer* 90, 566-572.
- Bogdahn, U., Hau, P., Brawanski, A., Schlaier, J., Mehdorn M., Nabavi, A., Wurm, G., Pichler, J., Kunst, M., Goldbrunner, M., Stauder, G., Schlingensiepen, K.-H., 2004. TGF-beta2 suppression by the antisense oligonucleotide AP12009 as therapy for high-grad glioma: safety and efficacy results of phase I/II clinical studies. 2004 AACR 95<sup>th</sup> Annual Meeting (abstract).
- Bonner, J.A., Maihle, N.J., Folven, B.R., Christianson, T.J., Spain, K., 1994. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29, 243-247.
- Brader, K.R., Wolf, J.K., Chakrabarty, S., Price, J.E., 1998. Epidermal growth factor receptor (EGFR) antisense transfection reduces the expression of EGFR and suppresses the malignant phenotype of a human ovarian cancer cell line. *Oncol Rep* 5, 1269-1274.
- Breaker, R.R., Joyce, G.F., 1994. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol* 1, 223-229.



- Briggs, M.W., Sacks, D.B., 2003. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep* 4, 571-574.
- Bruns, C.J., Harbison, M.T., Davis, D.W., Portera, C.A., Tsan, R., McConkey, D.J., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Hicklin, D.J., Radinsky, R., 2000a. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res* 6, 1936-1948.
- Bruns, C.J., Solorzano, C.C., Harbison, M.T., Ozawa, S., Tsan, R., Fan, D., Abbruzzese, J., Traxler, P., Buchdunger, E., Radinsky, R., Fidler, I.J., 2000b. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 60, 2926-2935.
- Burke, P.M., Wiley, H.S., 1999. Human mammary epithelial cells rapidly exchange empty EGFR between surface and intracellular pools. *J Cell Physiol* 180, 448-460.
- Burrows, R.C., Wancio, D., Levitt, P., Lillien, L., 1997. Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGFR expression in the cortex. *Neuron* 19, 251-267.
- Busse, D., Doughty, R.S., Ramsey, T.T., Russell, W.E., Price, J.O., Flanagan, W.M., Shawver, L.K., Arteaga, C.L., 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. *J Biol Chem* 275, 6987-6995.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C., 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., Hannon, G.J., 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 2733-2742.
- Carpenter, A.E., Sabatini, D.M., 2004. Systematic genome-wide screens of gene function. *Nat Rev Genet* 5, 11-22.
- Carpenter, G., 1999. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol* 146, 697-702.
- Castro, M.G., Cowen, R., Williamson, I.K., David, A., Jimenez-Dalmaroni, M.J., Yuan, X., Bigliari, A., Williams, J.C., Hu, J., Lowenstein, P.R., 2003. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther* 98, 71-108.
- Chakrabarty, S., Rajagopal, S., Huang, S., 1995. Expression of antisense epidermal growth factor receptor RNA downmodulates the malignant behavior of human colon cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 13, 191-195.
- Chakravarti, A., Chakladar, A., Delaney, M.A., Latham, D.E., Loeffler, J.S., 2002. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res* 62, 4307-4315.
- Chen, P., Xie, H., Sekar, M.C., Gupta, K., Wells, A., 1994. Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *J Cell Biol* 127, 847-857.
- Chen, X., Yeung, T.K., Wang, Z., 2000. Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 757-763.

- Chintala, S.K., Gokaslan, Z.L., Go, Y., Sawaya, R., Nicolson, G.L., Rao, J.S., 1996. Role of extracellular matrix proteins in regulation of human glioma cell invasion in vitro. *Clin Exp Metastasis* 14, 358-366.
- Cho, Y.M., Lewis, D.A., Koltz, P.F., Richard, V., Gocken, T.A., Rosol, T.J., Konger, R.L., Spandau, D.F., Foley, J., 2004. Regulation of parathyroid hormone-related protein gene expression by epidermal growth factor-family ligands in primary human keratinocytes. *J Endocrinol* 181, 179-190.
- Ciardello, F., Bianco, R., Damiano, V., De Lorenzo, S., Pepe, S., De Placido, S., Fan, Z., Mendelsohn, J., Bianco, A.R., Tortora, G., 1999. Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res* 5, 909-916.
- Ciardello, F., Caputo, R., Bianco, R., Damiano, V., Pomatico, G., De Placido, S., Bianco, A.R., Tortora, G., 2000. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 6, 2053-2063.
- Ciardello, F., Caputo, R., Troiani, T., Borriello, G., Kandimalla, E.R., Agrawal, S., Mendelsohn, J., Bianco, A.R., Tortora, G., 2001. Antisense oligonucleotides targeting the epidermal growth factor receptor inhibit proliferation, induce apoptosis, and cooperate with cytotoxic drugs in human cancer cell lines. *Int J Cancer* 93, 172-178.
- Cohen, M.H., Williams, G.A., Sridhara, R., Chen, G., McGuinn, W.D., Jr., Morse, D., Abraham, S., Rahman, A., Liang, C., Lostritto, R., Baird, A., Pazdur, R., 2004. United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res* 10, 1212-1218.
- Cohen, S., Carpenter, G., King, L., Jr., 1980. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 255, 4834-4842.
- Conejo, R., de Alvaro, C., Benito, M., Cuadrado, A., Lorenzo, M., 2002. Insulin restores differentiation of Ras-transformed C2C12 myoblasts by inducing NF-kappaB through an AKT/P70S6K/p38-MAPK pathway. *Oncogene* 21, 3739-3753.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., et al., 1985. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230, 1132-1139.
- Couzin, J., 2002. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 298, 2296-2297.
- Dancey, J., 2004. Epidermal growth factor receptor inhibitors in clinical development. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 1003-1007.
- Dancey, J.E., Freidlin, B., 2003. Targeting epidermal growth factor receptor--are we missing the mark? *Lancet* 362, 62-64.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., Ullrich, A., 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.
- De Wever, O., Nguyen, Q.D., Van Hoorde, L., Bracke, M., Bruyneel, E., Gespach, C., Mareel, M., 2004. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *Faseb J* 18, 1016-1018.
- Dean, N.M., Bennett, C.F., 2003. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 22, 9087-9096.

- Denli, A.M., Hannon, G.J., 2003. RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci* 28, 196-201
- Ding, Y., Lawrence, C.E., 2001. Statistical prediction of single-stranded regions in RNA secondary structure and application to predicting effective antisense target sites and beyond. *Nucleic Acids Res* 29, 1034-1046.
- Doench, J.G., Petersen, C.P., Sharp, P.A., 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17, 438-442.
- Donato, G., Martinez Hoyos, J., Amorosi, A., Maltese, L., Lavano, A., Volpentesta, G., Signorelli, F., Pentimalli, F., Pallante, P., Ferraro, G., Tucci, L., Signorelli, C.D., Viglietto, G., Fusco, A., 2004. High mobility group A1 expression correlates with the histological grade of human glial tumors. *Oncol Rep* 11, 1209-1213.
- Dorsett, Y., Tuschl, T., 2004. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 3, 318-329.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., Waterfield, M.D., 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521-527.
- Egidy, G., Eberl, L.P., Valdenaire, O., Irmeler, M., Majdi, R., Diserens, A.C., Fontana, A., Janzer, R.C., Pinet, F., Juillerat-Jeanneret, L., 2000. The endothelin system in human glioblastoma. *Lab Invest* 80, 1681-1689.
- Ekstrand, A.J., James, C.D., Cavenee, W.K., Seliger, B., Pettersson, R.F., Collins, V.P., 1991. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 51, 2164-2172.
- El-Obeid, A., Bongcam-Rudloff, E., Sorby, M., Ostman, A., Nister, M., Westermark, B., 1997. Cell scattering and migration induced by autocrine transforming growth factor alpha in human glioma cells in vitro. *Cancer Res* 57, 5598-5604.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K., Tuschl, T., 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001b. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-6888.
- Eller, J.L., Longo, S.L., Hicklin, D.J., Canute, G.W., 2002. Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 51, 1005-1013; discussion 1013-1004.
- Engebraaten, O., Bjerkvig, R., Pedersen, P.H., Laerum, O.D., 1993. Effects of EGF, bFGF, NGF and PDGF(bb) on cell proliferative, migratory and invasive capacities of human brain-tumour biopsies in vitro. *Int J Cancer* 53, 209-214.
- Engelhard, H.H., Wolters, M., Criswell, P.S., 1995. Analysis of c-erbB2 protein content of human glioma cells and tumor tissue. *J Neurooncol* 23, 31-40.
- Erickson, S.L., O'Shea, K.S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L.H., Moore, M.W., 1997. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* 124, 4999-5011.

- Fan, Z., Masui, H., Altas, I., Mendelsohn, J., 1993. Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 53, 4322-4328.
- Fang, K., Chen, M.H., 1999. Transfection of anti-sense complementary DNA of human epidermal-growth-factor receptor attenuates the proliferation of human non-small-cell-lung-cancer cells. *Int J Cancer* 81, 471-478.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A., Ullrich, A., 2003. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans* 31, 1203-1208.
- Fowler, K.J., Walker, F., Alexander, W., Hibbs, M.L., Nice, E.C., Bohmer, R.M., Mann, G.B., Thumwood, C., Maglito, R., Danks, J.A., et al., 1995. A mutation in the epidermal growth factor receptor in waved-2 mice has a profound effect on receptor biochemistry that results in impaired lactation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1465-1469.
- Fox, S.B., Gatter, K.C., Harris, A.L., 1996. Tumour angiogenesis. *J Pathol* 179, 232-237.
- Frederick, L., Wang, X.Y., Eley, G., James, C.D., 2000. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 60, 1383-1387.
- Freelove, A.C., Zheng, R., 2002. The power of ribozyme technologies: the logical way ahead for molecular medicine and gene therapy? *Curr Opin Mol Ther* 4, 419-422.
- Fricker-Gates, R.A., Winkler, C., Kirik, D., Rosenblad, C., Carpenter, M.K., Bjorklund, A., 2000. EGF infusion stimulates the proliferation and migration of embryonic progenitor cells transplanted in the adult rat striatum. *Exp Neurol* 165, 237-247.
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Yung, W.K., Kyritsis, A.P., 1999. Targeting in gene therapy for gliomas. *Arch Neurol* 56, 445-448.
- Furman, C., Short, S.M., Subramanian, R.R., Zetter, B.R., Roberts, T.M., 2002. DEF-1/ASAP1 is a GTPase-activating protein (GAP) for ARF1 that enhances cell motility through a GAP-dependent mechanism. *J Biol Chem* 277, 7962-7969.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., Lemke, G., 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390-394.
- Giese, A., Westphal, M., 1996. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 39, 235-250; discussion 250-232.
- Gil, J., Esteban, M., 2000. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5, 107-114.
- Gilmore, A.P., Valentijn, A.J., Wang, P., Ranger, A.M., Bundred, N., O'Hare, M.J., Wakeling, A., Korsmeyer, S.J., Streuli, C.H., 2002. Activation of BAD by therapeutic inhibition of epidermal growth factor receptor and transactivation by insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem* 277, 27643-27650.
- Gohla, A., Harhammer, R., Schultz, G., 1998. The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem* 273, 4653-4659.
- Goldbrunner, R.H., Bernstein, J.J., Tonn, J.C., 1998. ECM-mediated glioma cell invasion. *Microsc Res Tech* 43, 250-257.

- Goldman, C.K., Kim, J., Wong, W.L., King, V., Brock, T., Gillespie, G.Y., 1993. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 4, 121-133.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., Hynes, N.E., 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* 16, 1647-1655.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Hynes, N.E., 1995. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 15, 1182-1191.
- Grimshaw, M.J., Hagemann, T., Ayhan, A., Gillett, C.E., Binder, C., Balkwill, F.R., 2004. A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer Res* 64, 2461-2468.
- Grishok, A., Tabara, H., Mello, C.C., 2000. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287, 2494-2497.
- Grunweller, A., Wyszko, E., Bieber, B., Jahnel, R., Erdmann, V.A., Kurreck, J., 2003. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 31, 3185-3193.
- Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., Ullrich, A., 2001. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 20, 1594-1600.
- Guerrero, J., Santibanez, J.F., Gonzalez, A., Martinez, J., 2004. EGF receptor transactivation by urokinase receptor stimulus through a mechanism involving Src and matrix metalloproteinases. *Exp Cell Res* 292, 201-208.
- Haapasalo, H., Hyytinen, E., Sallinen, P., Helin, H., Kallioniemi, O.P., Isola, J., 1996. c-erbB-2 in astrocytomas: infrequent overexpression by immunohistochemistry and absence of gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Br J Cancer* 73, 620-623.
- Haas-Kogan, D., Shalev, N., Wong, M., Mills, G., Yount, G., Stokoe, D., 1998. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* 8, 1195-1198.
- Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N., Ullrich, A., 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 184-189.
- Halatsch, M.E., Gehrke, E.E., Vougioukas, V.I., Botefur, I.C., F, A.B., Efferth, T., Gebhart, E., Domhof, S., Schmidt, U., Buchfelder, M., 2004. Inverse correlation of epidermal growth factor receptor messenger RNA induction and suppression of anchorage-independent growth by OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in glioblastoma multiforme cell lines. *J Neurosurg* 100, 523-533.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J., 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146-1150.

- Hanahan, D., Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T., Weber, K., 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114, 4557-4565.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Vandeburgh, K., Manninga, H., Scaringe, S.A., Weber, K., Tuschl, T., 2003. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 13, 83-105.
- Hazan, R.B., Norton, L., 1998. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 9078-9084.
- Herold-Mende, C., Mueller, M.M., Bonsanto, M.M., Schmitt, H.P., Kunze, S., Steiner, H.H., 2002. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer* 98, 362-369.
- Hiesiger, E.M., Hayes, R.L., Pierz, D.M., Budzilovich, G.N., 1993. Prognostic relevance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-neu/erbB2 expression in glioblastomas (GBMs). *J Neurooncol* 16, 93-104.
- Higuchi, M., Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Hayakawa, T., 1993. Expression of tenascin in human gliomas: its relation to histological malignancy, tumor dedifferentiation and angiogenesis. *Acta Neuropathol (Berl)* 85, 481-487.
- Hirata, A., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M., Ono, M., 2002. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 62, 2554-2560.
- Hohjoh, H., 2002. RNA interference (RNA(i)) induction with various types of synthetic oligonucleotide duplexes in cultured human cells. *FEBS Lett* 521, 195-199.
- Hoi Sang, U., Espiritu, O.D., Kelley, P.Y., Klauber, M.R., Hatton, J.D., 1995. The role of the epidermal growth factor receptor in human gliomas: I. The control of cell growth. *J Neurosurg* 82, 841-846.
- Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E., Prydz, H., 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30, 1757-1766.
- Holland, E.C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R.E., Fuller, G.N., 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 25, 55-57.
- Holth, L.T., Thorlacius, A.E., Reeves, R., 1997. Effects of epidermal growth factor and estrogen on the regulation of the HMG-I/Y gene in human mammary epithelial cell lines. *DNA Cell Biol* 16, 1299-1309.
- Hommel, J.D., Sears, R.M., Georgescu, D., Simmons, D.L., DiLeone, R.J., 2003. Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9, 1539-1544.
- Huang, S.M., Bock, J.M., Harari, P.M., 1999. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 59, 1935-1940.
- Hutvagner, G., Zamore, P.D., 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.

- Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Tada, M., Sawamura, Y., Diserens, A.C., Van Meir, E.G., 1999. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 9, 469-479.
- Ito, Y., Bustin, M., 2002. Immunohistochemical localization of the nucleosome-binding protein HMGN3 in mouse brain. *J Histochem Cytochem* 50, 1273-1275.
- Iwasaki, H., Eguchi, S., Ueno, H., Marumo, F., Hirata, Y., 1999. Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 140, 4659-4668.
- Janmaat, M.L., Giaccone, G., 2003. Small-molecule epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Oncologist* 8, 576-586.
- Janmaat, M.L., Kruyt, F.A., Rodriguez, J.A., Giaccone, G., 2003. Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res* 9, 2316-2326.
- Jensen, R.L., 1998. Growth factor-mediated angiogenesis in the malignant progression of glial tumors: a review. *Surg Neurol* 49, 189-195; discussion 196.
- Ji, J., Wernli, M., Klimkait, T., Erb, P., 2003. Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering RNAs. *FEBS Lett* 552, 247-252.
- Jo, M., Stolz, D.B., Esplen, J.E., Dorko, K., Michalopoulos, G.K., Strom, S.C., 2000. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem* 275, 8806-8811.
- Jo, M., Thomas, K.S., O'Donnell, D.M., Gonias, S.L., 2003. Epidermal growth factor receptor-dependent and -independent cell-signaling pathways originating from the urokinase receptor. *J Biol Chem* 278, 1642-1646.
- Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W., Burgess, A.W., 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284, 31-53.
- Kalinichenko, V.V., Major, M.L., Wang, X., Petrovic, V., Kuechle, J., Yoder, H.M., Dennewitz, M.B., Shin, B., Datta, A., Raychaudhuri, P., Costa, R.H., 2004. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev* 18, 830-850.
- Kalmes, A., Vesti, B.R., Daum, G., Abraham, J.A., Clowes, A.W., 2000. Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ Res* 87, 92-98.
- Kapoor, G.S., O'Rourke, D.M., 2003. Mitogenic signaling cascades in glial tumors. *Neurosurgery* 52, 1425-1434; discussion 1434-1425.
- Kassis, J., Lauffenburger, D.A., Turner, T., Wells, A., 2001. Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Semin Cancer Biol* 11, 105-117.
- Keely, S.J., Uribe, J.M., Barrett, K.E., 1998. Carbachol stimulates transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T84 cells. Implications for carbachol-stimulated chloride secretion. *J Biol Chem* 273, 27111-27117.
- Kjoller, L., 2002. The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility. *Biol Chem* 383, 5-19.

- Kleihues, P., Ohgaki, H., 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol* 1, 44-51.
- Kleihues, P., Sobin, L.H., 2000. World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 88, 2887.
- Koshikawa, K., Osada, H., Kozaki, K., Konishi, H., Masuda, A., Tatematsu, Y., Mitsudomi, T., Nakao, A., Takahashi, T., 2002. Significant up-regulation of a novel gene, CLCP1, in a highly metastatic lung cancer subline as well as in lung cancers in vivo. *Oncogene* 21, 2822-2828.
- Kowanetz, K., Husnjak, K., Holler, D., Kowanetz, M., Soubeyran, P., Hirsch, D., Schmidt, M.H., Pavelic, K., De Camilli, P., Randazzo, P.A., Dikic, I., 2004. CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of EGF receptors. *Mol Biol Cell*.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C., Aaronson, S.A., 1989. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9193-9197.
- Kretschmer-Kazemi Far, R., Sczakiel, G., 2003. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 31, 4417-4424.
- Kristt, D.A., Reedy, E., Yarden, Y., 1993. Receptor tyrosine kinase expression in astrocytic lesions: similar features in gliosis and glioma. *Neurosurgery* 33, 106-115.
- Kustikova, O., Kramerov, D., Grigorian, M., Berezin, V., Bock, E., Lukanidin, E., Tulchinsky, E., 1998. Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* 18, 7095-7105.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lai, J.C., Benimetskaya, L., Santella, R.M., Wang, Q., Miller, P.S., Stein, C.A., 2003. G3139 (oblimersen) may inhibit prostate cancer cell growth in a partially bis-CpG-dependent non-antisense manner. *Mol Cancer Ther* 2, 1031-1043.
- Lakka, S.S., Jasti, S.L., Kyritsis, A.P., Yung, W.K., Ali-Osman, F., Nicolson, G.L., Rao, J.S., 2000. Regulation of MMP-9 (type IV collagenase) production and invasiveness in gliomas by the extracellular signal-regulated kinase and jun amino-terminal kinase signaling cascades. *Clin Exp Metastasis* 18, 245-252.
- Lal, A., Glazer, C.A., Martinson, H.M., Friedman, H.S., Archer, G.E., Sampson, J.H., Riggins, G.J., 2002. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res* 62, 3335-3339.
- Lammering, G., Hewit, T.H., Valerie, K., Lin, P.S., Contessa, J.N., Schmidt-Ullrich, R.K., 2003. Anti-erbB receptor strategy as a gene therapeutic intervention to improve radiotherapy in malignant human tumours. *Int J Radiat Biol* 79, 561-568.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- Lebedeva, I., Stein, C.A., 2001. Antisense oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 403-419.
- Lee, R.C., Ambros, V., 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.



- Leung, T., Chen, X.Q., Tan, I., Manser, E., Lim, L., 1998. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* 18, 130-140.
- Levitzki, A., Gazit, A., 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267, 1782-1788.
- Li, B., Chang, C.M., Yuan, M., McKenna, W.G., Shu, H.K., 2003. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res* 63, 7443-7450.
- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A., Schlessinger, J., 1985. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 313, 144-147.
- Ling, J., Liu, Z., Wang, D., Gladson, C.L., 1999. Malignant astrocytoma cell attachment and migration to various matrix proteins is differentially sensitive to phosphoinositide 3-OH kinase inhibitors. *J Cell Biochem* 73, 533-544.
- Liotta, L.A., Rao, C.N., Wewer, U.M., 1986. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu Rev Biochem* 55, 1037-1057.
- Lipson, K.E., Pang, L., Huber, L.J., Chen, H., Tsai, J.M., Hirth, P., Gazit, A., Levitzki, A., McMahon, G., 1998. Inhibition of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptor signaling events after treatment of cells with specific synthetic inhibitors of tyrosine kinase phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 285, 844-852.
- Liu, B., Fang, M., Schmidt, M., Lu, Y., Mendelsohn, J., Fan, Z., 2000. Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *Br J Cancer* 82, 1991-1999.
- Liu, D., Aguirre Ghiso, J., Estrada, Y., Ossowski, L., 2002. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell* 1, 445-457.
- Louis, D.N., Pomeroy, S.L., Cairncross, J.G., 2002. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell* 1, 125-128.
- Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R., Humphrey, P.A., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Laerum, O.D., 1990. Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res* 50, 6039-6044.
- Madarame, J., Higashiyama, S., Kiyota, H., Madachi, A., Toki, F., Shimomura, T., Tani, N., Oishi, Y., Matsuura, N., 2003. Transactivation of epidermal growth factor receptor after heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor shedding in the migration of prostate cancer cells promoted by bombesin. *Prostate* 57, 187-195.
- Mäenpää, A., Kovanen, P.E., Paetau, A., Jaaskelainen, J., Timonen, T., 1997. Lymphocyte adhesion molecule ligands and extracellular matrix proteins in gliomas and normal brain: expression of VCAM-1 in gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 94, 216-225.
- Maher, E.A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavenee, W.K., DePinho, R.A., 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15, 1311-1333.

- Maity, A., Pore, N., Lee, J., Solomon, D., O'Rourke, D.M., 2000. Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res* 60, 5879-5886.
- Malliri, A., Symons, M., Hennigan, R.F., Hurlstone, A.F., Lamb, R.F., Wheeler, T., Ozanne, B.W., 1998. The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of rho-like GTPases, cytoskeletal rearrangements, motility, and in vitro invasion of A431 cells. *J Cell Biol* 143, 1087-1099.
- Malliri, A., van der Kammen, R.A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F., Collard, J.G., 2002. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* 417, 867-871.
- Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J., Kumar, R., 1998. Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene* 17, 999-1007.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., Tuschl, T., 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-574.
- Martinez-Lacaci, I., De Santis, M., Kannan, S., Bianco, C., Kim, N., Wallace-Jones, B., Wechselberger, C., Ebert, A.D., Salomon, D.S., 2001. Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor expression in Ha-ras transformed human mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 186, 233-242.
- Mataraza, J.M., Briggs, M.W., Li, Z., Entwistle, A., Ridley, A.J., Sacks, D.B., 2003. IQGAP1 promotes cell motility and invasion. *J Biol Chem* 278, 41237-41245.
- Mateer, S.C., Wang, N., Bloom, G.S., 2003. IQGAPs: integrators of the cytoskeleton, cell adhesion machinery, and signaling networks. *Cell Motil Cytoskeleton* 55, 147-155.
- McCarthy, S.A., Chen, D., Yang, B.S., Garcia Ramirez, J.J., Cherwinski, H., Chen, X.R., Klagsbrun, M., Hauser, C.A., Ostrowski, M.C., McMahon, M., 1997. Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1. *Mol Cell Biol* 17, 2401-2412.
- McKeever, P.E., Fligiel, S.E., Varani, J., Hudson, J.L., Smith, D., Castle, R.L., McCoy, J.P., 1986. Products of cells cultured from gliomas. IV. Extracellular matrix proteins of gliomas. *Int J Cancer* 37, 867-874.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., Burgering, B.M., 2000. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.
- Mendelsohn, J., 2001. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8, 3-9.
- Mendelsohn, J., Fan, Z., 1997. Epidermal growth factor receptor family and chemosensitization. *J Natl Cancer Inst* 89, 341-343.
- Miettinen, P.J., Berger, J.E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R.A., Werb, Z., Derynck, R., 1995. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376, 337-341.
- Milas, L., Mason, K., Hunter, N., Petersen, S., Yamakawa, M., Ang, K., Mendelsohn, J., Fan, Z., 2000. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 6, 701-708.
- Minard, M.E., Kim, L.S., Price, J.E., Gallick, G.E., 2004. The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression. *Breast Cancer Res Treat* 84, 21-32.

- Mishima, K., Higashiyama, S., Asai, A., Yamaoka, K., Nagashima, Y., Taniguchi, N., Kitanaka, C., Kirino, T., Kuchino, Y., 1998. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates mitogenic signaling and is highly expressed in human malignant gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 96, 322-328.
- Miyagishi, M., Hayashi, M., Taira, K., 2003. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 13, 1-7.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S., Yamada, K.M., 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 135, 1633-1642.
- Moroni, M.C., Willingham, M.C., Beguinot, L., 1992. EGF-R antisense RNA blocks expression of the epidermal growth factor receptor and suppresses the transforming phenotype of a human carcinoma cell line. *J Biol Chem* 267, 2714-2722.
- Moscattello, D.K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A.K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P.W., Biegel, J.A., Hayes, R.L., Wong, A.J., 1995. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 55, 5536-5539.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., Dreyfuss, G., 2002. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16, 720-728.
- Moyer, J.D., Barbacci, E.G., Iwata, K.K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., DiOrio, C., Doty, J., Morin, M.J., Moyer, M.P., Neveu, M., Pollack, V.A., Pustilnik, L.R., Reynolds, M.M., Sloan, D., Theleman, A., Miller, P., 1997. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* 57, 4838-4848.
- Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W.K., Huang, H.J., 1996. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 56, 5079-5086.
- Nagy, P., Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M., 2003. Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells. *Exp Cell Res* 285, 39-49.
- Nelson, P., Kiriakidou, M., Sharma, A., Maniataki, E., Mourelatos, Z., 2003. The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem Sci* 28, 534-540.
- Newby, J.C., Johnston, S.R., Smith, I.E., Dowsett, M., 1997. Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 3, 1643-1651.
- Nishikawa, R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K., Huang, H.J., 1994. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7727-7731.
- Noonberg, S.B., Benz, C.C., 2000. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* 59, 753-767.
- Nykanen, A., Haley, B., Zamore, P.D., 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.

- O-Charoenrat, P., Modjtahedi, H., Rhys-Evans, P., Court, W.J., Box, G.M., Eccles, S.A., 2000. Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 60, 1121-1128.
- O-Charoenrat, P., Rhys-Evans, P., Court, W.J., Box, G.M., Eccles, S.A., 1999. Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. *Clin Exp Metastasis* 17, 631-639.
- Ohnishi, T., Hiraga, S., Izumoto, S., Matsumura, H., Kanemura, Y., Arita, N., Hayakawa, T., 1998. Role of fibronectin-stimulated tumor cell migration in glioma invasion in vivo: clinical significance of fibronectin and fibronectin receptor expressed in human glioma tissues. *Clin Exp Metastasis* 16, 729-741.
- Olayioye, M.A., Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Rohrer, J., Gay, B., Hynes, N.E., 1998. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18, 5042-5051.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., Hynes, N.E., 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* 19, 3159-3167.
- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C., Fire, A., 2000. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* 6, 1077-1087.
- Pasquier, B., Pasquier, D., N'Golet, A., Panh, M.H., Couderc, P., 1980. Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas: clinicopathological study of two cases and review of literature. *Cancer* 45, 112-125.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degan, B., Muller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruvkun, G., 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.
- Paulus, W., Baur, I., Schuppan, D., Roggendorf, W., 1993. Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am J Pathol* 143, 154-163.
- Peng, D., Fan, Z., Lu, Y., DeBlasio, T., Scher, H., Mendelsohn, J., 1996. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res* 56, 3666-3669.
- Perrotte, P., Matsumoto, T., Inoue, K., Kuniyasu, H., Eve, B.Y., Hicklin, D.J., Radinsky, R., Dinney, C.P., 1999. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 5, 257-265.
- Perry, J.E., Grossmann, M.E., Tindall, D.J., 1998. Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line. *Prostate* 35, 117-124.
- Petit, A.M., Rak, J., Hung, M.C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B., Kerbel, R.S., 1997. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 151, 1523-1530.
- Pettersson, M., Bessonova, M., Gu, H.F., Groop, L.C., Jonsson, J.I., 2000. Characterization, chromosomal localization, and expression during hematopoietic differentiation of the gene encoding Arl6ip, ADP-ribosylation-like factor-6 interacting protein (ARL6). *Genomics* 68, 351-354.

- Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G., Shoyab, M., 1993. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1746-1750.
- Potgens, A.J., Westphal, H.R., de Waal, R.M., Ruiter, D.J., 1995. The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376, 57-70.
- Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S., Ullrich, A., 2001. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8, 11-31.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., Ullrich, A., 1999. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884-888.
- Price, J.T., Wilson, H.M., Haites, N.E., 1996. Epidermal growth factor (EGF) increases the in vitro invasion, motility and adhesion interactions of the primary renal carcinoma cell line, A704. *Eur J Cancer* 32A, 1977-1982.
- Pu, P., Liu, X., Liu, A., Cui, J., Zhang, Y., 2000. Inhibitory effect of antisense epidermal growth factor receptor RNA on the proliferation of rat C6 glioma cells in vitro and in vivo. *J Neurosurg* 92, 132-139.
- Raben, D., Bianco, C., Helfrich, B., Weng, E., Ciardiello, F., Harari, P., 2002. Interference with EGFR signaling: paradigm for improving radiation response in cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2, 461-471.
- Rao, J.S., Steck, P.A., Tofilon, P., Boyd, D., Ali-Osman, F., Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., Sawaya, R., 1994. Role of plasminogen activator and of 92-KDa type IV collagenase in glioblastoma invasion using an in vitro matrigel model. *J Neurooncol* 18, 129-138.
- Reeves, R., Beckerbauer, L.M., 2003. HMGA proteins as therapeutic drug targets. *Prog Cell Cycle Res* 5, 279-286.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., Bartel, D.P., 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16, 1616-1626.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., Khvorova, A., 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326-330.
- Rich, J.N., Reardon, D.A., Peery, T., Dowell, J.M., Quinn, J.A., Penne, K.L., Wikstrand, C.J., Van Duyn, L.B., Dancey, J.E., McLendon, R.E., Kao, J.C., Stenzel, T.T., Ahmed Rasheed, B.K., Tourt-Uhlig, S.E., Herndon, J.E., 2nd, Vredenburgh, J.J., Sampson, J.H., Friedman, A.H., Bigner, D.D., Friedman, H.S., 2004. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 22, 133-142.
- Rickman, D.S., Bobek, M.P., Misek, D.E., Kuick, R., Blaiwas, M., Kurnit, D.M., Taylor, J., Hanash, S.M., 2001. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 61, 6885-6891.
- Riedel, F., Gotte, K., Li, M., Hormann, K., Grandis, J.R., 2002. EGFR antisense treatment of human HNSCC cell lines down-regulates VEGF expression and endothelial cell migration. *Int J Oncol* 21, 11-16.

- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R., Birchmeier, C., 1997. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389, 725-730.
- Rosen, E.M., Goldberg, I.D., 1989. Protein factors which regulate cell motility. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 1079-1087.
- Rubenstein, M., Glick, R., Lichtor, T., Mirochnik, Y., Chou, P., Guinan, P., 2001. Treatment of the T98G glioblastoma cell line with antisense oligonucleotides directed toward mRNA encoding transforming growth factor- $\alpha$  and the epidermal growth factor receptor. *Med Oncol* 18, 121-130.
- Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A.V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D.L., Ihrig, M.M., McManus, M.T., Gertler, F.B., Scott, M.L., Van Parijs, L., 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33, 401-406.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., Normanno, N., 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19, 183-232.
- Sartor, C.I., 2000. Biological modifiers as potential radiosensitizers: targeting the epidermal growth factor receptor family. *Semin Oncol* 27, 15-20; discussion 92-100.
- Schafer, B., Gschwind, A., Ullrich, A., 2004. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 23, 991-999.
- Schlegel, J., Piontek, G., Budde, B., Neff, F., Kraus, A., 2000. The Akt/protein kinase B-dependent anti-apoptotic pathway and the mitogen-activated protein kinase cascade are alternatively activated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Lett* 158, 103-108.
- Schwarz, D. S., Tomari, Y., Zamore, P. D., 2004. The RNA-induced silencing complex is a Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease. *Curr Biol* 14, 787-791.
- Schwechheimer, K., Laufle, R.M., Schmahl, W., Knodlseder, M., Fischer, H., Hofler, H., 1994. Expression of neu/c-erbB-2 in human brain tumors. *Hum Pathol* 25, 772-780.
- Servadio, A., Koshy, B., Armstrong, D., Antalffy, B., Orr, H.T., Zoghbi, H.Y., 1995. Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. *Nat Genet* 10, 94-98.
- Seton-Rogers, S.E., Lu, Y., Hines, L.M., Koundinya, M., LaBaer, J., Muthuswamy, S.K., Brugge, J.S., 2004. Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1257-1262.
- Shankar, P.P., Wei, H., Davee, S.M., Funk, J.L., 2000. Parathyroid hormone-related protein is expressed by transformed and fetal human astrocytes and inhibits cell proliferation. *Brain Res* 868, 230-240.
- Shao, Z.M., Wu, J., Shen, Z.Z., Barsky, S.H., 1998. Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 58, 4851-4857.
- Shen, C., Buck, A.K., Liu, X., Winkler, M., Reske, S.N., 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett* 539, 111-114.
- Shen, X., Falzon, M., 2003. Parathyroid hormone-related protein upregulates integrin expression via an intracrine pathway in PC-3 prostate cancer cells. *Regul Pept* 113, 17-29.

- Shen, X., Qian, L., Falzon, M., 2004. PTH-related protein enhances MCF-7 breast cancer cell adhesion, migration, and invasion via an intracrine pathway. *Exp Cell Res* 294, 420-433.
- Shibata, T., Kawano, T., Nagayasu, H., Okumura, K., Arisue, M., Hamada, J., Takeichi, N., Hosokawa, M., 1996. Enhancing effects of epidermal growth factor on human squamous cell carcinoma motility and matrix degradation but not growth. *Tumour Biol* 17, 168-175.
- Shir, A., Levitzki, A., 2001. Gene therapy for glioblastoma: future perspective for delivery systems and molecular targets. *Cell Mol Neurobiol* 21, 645-656.
- Sibilia, M., Steinbach, J.P., Stingl, L., Aguzzi, A., Wagner, E.F., 1998. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *Embo J* 17, 719-731.
- Sibilia, M., Wagner, E.F., 1995. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269, 234-238.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., Schlaepfer, D.D., 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2, 249-256.
- Sirotnak, F.M., Zakowski, M.F., Miller, V.A., Scher, H.I., Kris, M.G., 2000. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 6, 4885-4892.
- Sonoda, Y., Ozawa, T., Aldape, K.D., Deen, D.F., Berger, M.S., Pieper, R.O., 2001. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res* 61, 6674-6678.
- Spencer, K.S., Graus-Porta, D., Leng, J., Hynes, N.E., Klemke, R.L., 2000. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 148, 385-397.
- Sporn, M.B., Todaro, G.J., 1980. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 303, 878-880.
- Stea, B., Falsey, R., Kislin, K., Patel, J., Glanzberg, H., Carey, S., Ambrad, A.A., Meuillet, E.J., Martinez, J.D., 2003. Time and dose-dependent radiosensitization of the glioblastoma multiforme U251 cells by the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa'). *Cancer Lett* 202, 43-51.
- Stein, P., Svoboda, P., Anger, M., Schultz, R.M., 2003. RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase. *Rna* 9, 187-192.
- Steinbach, J.P., Supra, P., Huang, H.J., Cavenee, W.K., Weller, M., 2002. CD95-mediated apoptosis of human glioma cells: modulation by epidermal growth factor receptor activity. *Brain Pathol* 12, 12-20.
- Stoscheck, C.M., Carpenter, G., 1984. Characterization of the metabolic turnover of epidermal growth factor receptor protein in A-431 cells. *J Cell Physiol* 120, 296-302.
- Sugawa, N., Ueda, S., Nakagawa, Y., Nishino, H., Nosaka, K., Iwashima, A., Kurimoto, M., 1998. An antisense EGFR oligodeoxynucleotide enveloped in Lipofectin induces growth inhibition in human malignant gliomas in vitro. *J Neurooncol* 39, 237-244.

- Sundberg, A.L., Almqvist, Y., Tolmachev, V., Carlsson, J., 2003. Treatment of cultured glioma cells with the EGFR-TKI gefitinib ("Iressa", ZD1839) increases the uptake of astatinated EGF despite the absence of gefitinib-mediated growth inhibition. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30, 727-729.
- Surowiak, P., Dziegiel, P., Matkowski, R., Sopol, M., Wojnar, A., Kornafel, J., Zabel, M., 2003. Prognostic value of immunocytochemical determination of parathyroid hormone-related peptide expression in cells of mammary ductal carcinoma. Analysis of 7 years of the disease course. *Virchows Arch* 442, 245-251.
- Swindle, C.S., Tran, K.T., Johnson, T.D., Banerjee, P., Mayes, A.M., Griffith, L., Wells, A., 2001. Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J Cell Biol* 154, 459-468.
- Taira, T., Maeda, J., Onishi, T., Kitaura, H., Yoshida, S., Kato, H., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S.M., Ariga, H., 1998. AMY-1, a novel C-MYC binding protein that stimulates transcription activity of C-MYC. *Genes Cells* 3, 549-565.
- Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C., et al., 1995. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230-234.
- Tian, X.X., Lam, P.Y., Chen, J., Pang, J.C., To, S.S., Di-Tomaso, E., Ng, H.K., 1998. Antisense epidermal growth factor receptor RNA transfection in human malignant glioma cells leads to inhibition of proliferation and induction of differentiation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24, 389-396.
- Tian, X.X., Pang, J.C., Zheng, J., Chen, J., To, S.S., Ng, H.K., 2002. Antisense epidermal growth factor receptor RNA transfection in human glioblastoma cells down-regulates telomerase activity and telomere length. *Br J Cancer* 86, 1328-1332.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F., Plasterk, R.H., 2002. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 36, 489-519.
- Tokumaru, S., Higashiyama, S., Endo, T., Nakagawa, T., Miyagawa, J.I., Yamamori, K., Hanakawa, Y., Ohmoto, H., Yoshino, K., Shirakata, Y., Matsuzawa, Y., Hashimoto, K., Taniguchi, N., 2000. Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J Cell Biol* 151, 209-220.
- Tomar, R.S., Matta, H., Chaudhary, P.M., 2003. Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene* 22, 5712-5715.
- Tortora, G., Caputo, R., Pomatico, G., Pepe, S., Bianco, A.R., Agrawal, S., Mendelsohn, J., Ciardiello, F., 1999. Cooperative inhibitory effect of novel mixed backbone oligonucleotide targeting protein kinase A in combination with docetaxel and anti-epidermal growth factor-receptor antibody on human breast cancer cell growth. *Clin Cancer Res* 5, 875-881.
- Troyer, K.L., Lee, D.C., 2001. Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 7-21.
- Tsai, C.C., Kao, H.Y., Mizutani, A., Banayo, E., Rajan, H., McKeown, M., Evans, R.M., 2004. Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4047-4052.



- Tsai, W., Morielli, A.D., Peralta, E.G., 1997. The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *Embo J* 16, 4597-4605.
- Tsatas, D., Kanagasundaram, V., Kaye, A., Novak, U., 2002. EGF receptor modifies cellular responses to hyaluronan in glioblastoma cell lines. *J Clin Neurosci* 9, 282-288.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., Sharp, P.A., 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13, 3191-3197.
- Tysnes, B.B., Haugland, H.K., Bjerkvig, R., 1997. Epidermal growth factor and laminin receptors contribute to migratory and invasive properties of gliomas. *Invasion Metastasis* 17, 270-280.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J., Yarden, Y., 1996. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16, 5276-5287.
- Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., Saigo, K., 2004. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32, 936-948.
- Unlu, A., Leake, R.E., 2003. The effect of EGFR-related tyrosine kinase activity inhibition on the growth and invasion mechanisms of prostate carcinoma cell lines. *Int J Biol Markers* 18, 139-146.
- Vacca, F., Bagnato, A., Catt, K.J., Tecce, R., 2000. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 60, 5310-5317.
- Vaingankar, S.M., Martins-Green, M., 1998. Thrombin activation of the 9E3/CEF4 chemokine involves tyrosine kinases including c-src and the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273, 5226-5234.
- van den Boom, J., Wolter, M., Kuick, R., Misek, D.E., Youkilis, A.S., Wechsler, D.S., Sommer, C., Reifemberger, G., Hanash, S.M., 2003. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 163, 1033-1043.
- Vickers, T.A., Koo, S., Bennett, C.F., Crooke, S.T., Dean, N.M., Baker, B.F., 2003. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem* 278, 7108-7118.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I., Martienssen, R.A., 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833-1837.
- Wang, S., Lee, R.J., Cauchon, G., Gorenstein, D.G., Low, P.S., 1995. Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cells with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3318-3322.
- Wang, X., Quail, E., Hung, N.J., Tan, Y., Ye, H., Costa, R.H., 2001. Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11468-11473.

- Wang, Z.H., Ding, M.X., Yuan, J.P., Jin, M.L., Hao, C.F., Chew-Cheng, S.B., Ng, H.K., Chew, E.C., 1999. Expression of bcl-2 and Bax in EGFR-antisense transfected and untransfected glioblastoma cells. *Anticancer Res* 19, 4167-4170.
- Watabe, T., Yoshida, K., Shindoh, M., Kaya, M., Fujikawa, K., Sato, H., Seiki, M., Ishii, S., Fujinaga, K., 1998. The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer* 77, 128-137.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B., Lough, T., 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.
- Wells, A., 1999. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 637-643.
- West, K.L., Castellini, M.A., Duncan, M.K., Bustin, M., 2004. Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Mol Cell Biol* 24, 3747-3756.
- Westermarck, B., Magnusson, A., Heldin, C.H., 1982. Effect of epidermal growth factor on membrane motility and cell locomotion in cultures of human clonal glioma cells. *J Neurosci Res* 8, 491-507.
- Westphal, M., Meima, L., Szonyi, E., Lofgren, J., Meissner, H., Hamel, W., Nikolics, K., Sliwkowski, M.X., 1997. Heregulins and the ErbB-2/3/4 receptors in gliomas. *J Neurooncol* 35, 335-346.
- Wick, W., Wagner, S., Kerkau, S., Dichgans, J., Tonn, J.C., Weller, M., 1998. BCL-2 promotes migration and invasiveness of human glioma cells. *FEBS Lett* 440, 419-424.
- Wiley, H.S., 2003. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* 284, 78-88.
- Wiley, H.S., Herbst, J.J., Walsh, B.J., Lauffenburger, D.A., Rosenfeld, M.G., Gill, G.N., 1991. The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 266, 11083-11094.
- Williams, B.R., 1999. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18, 6112-6120.
- Witters, L., Kumar, R., Mandal, M., Bennett, C.F., Miraglia, L., Lipton, A., 1999. Antisense oligonucleotides to the epidermal growth factor receptor. *Breast Cancer Res Treat* 53, 41-50.
- Wiznerowicz, M., Trono, D., 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77, 8957-8961.
- Wong, A.J., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Kinzler, K.W., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., 1987. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6899-6903.
- Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S., Vogelstein, B., 1992. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2965-2969.
- Woodburn, J.R., 1999. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 82, 241-250.
- Wright, J.H., Wang, X., Manning, G., LaMere, B.J., Le, P., Zhu, S., Khatry, D., Flanagan, P.M., Buckley, S.D., Whyte, D.B., Howlett, A.R., Bischoff, J.R., Lipson, K.E., Jallal, B., 2003. The STE20 kinase HGK is broadly expressed in human tumor cells and can modulate cellular transformation, invasion, and adhesion. *Mol Cell Biol* 23, 2068-2082.

- Wu, X., Fan, Z., Masui, H., Rosen, N., Mendelsohn, J., 1995. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* 95, 1897-1905.
- Wu, X., Rubin, M., Fan, Z., DeBlasio, T., Soos, T., Koff, A., Mendelsohn, J., 1996. Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 12, 1397-1403.
- Xia, H., Mao, Q., Paulson, H.L., Davidson, B.L., 2002. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 20, 1006-1010.
- Xie, H., Pallero, M.A., Gupta, K., Chang, P., Ware, M.F., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Lauffenburger, D.A., Murphy-Ullrich, J.E., Wells, A., 1998. EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J Cell Sci* 111 ( Pt 5), 615-624.
- Xu, Y., Zhang, H.Y., Thormeyer, D., Larsson, O., Du, Q., Elmen, J., Wahlestedt, C., Liang, Z., 2003. Effective small interfering RNAs and phosphorothioate antisense DNAs have different preferences for target sites in the luciferase mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 712-717.
- Yang, D., Lu, H., Erickson, J.W., 2000. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* 10, 1191-1200.
- Yarden, Y., Sliwkowski, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-137.
- Yue, S., Serra, H.G., Zoghbi, H.Y., Orr, H.T., 2001. The spinocerebellar ataxia type 1 protein, ataxin-1, has RNA-binding activity that is inversely affected by the length of its polyglutamine tract. *Hum Mol Genet* 10, 25-30.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zhang, M., Zhang, X., Bai, C.X., Chen, J., Wei, M.Q., 2004. Inhibition of epidermal growth factor receptor expression by RNA interference in A549 cells. *Acta Pharmacol Sin* 25, 61-67.
- Zhang, Y., Jeong Lee, H., Boado, R.J., Pardridge, W.M., 2002a. Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells. *J Gene Med* 4, 183-194.
- Zhang, Y., Zhu, C., Pardridge, W.M., 2002b. Antisense gene therapy of brain cancer with an artificial virus gene delivery system. *Mol Ther* 6, 67-72.
- Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, S.E., 2003. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.

## **VIII. Anhang**

### **Publikationen**

Huber, R., Sacher, M., Vollmann, A., Huber, H., Rose, D., 2000. Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea. *Syst Appl Microbiol.* 2000 Oct;23(3):305-14.

Vollmann, A., Vornlocher, H.-P., Apfel, R., Stempfl, T., Bogdahn, U., 2004. Specific knockdown of epidermal growth factor receptor by siRNAs has no inhibitory effect on human glioma cell lines. (Manuskript in Vorbereitung).

### **Posterpräsentationen**

Huber, R., Sacher, M., Vollmann, A., Huber, H., Rose, D., 2000. Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea. Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Jahrestagung, 25.-28.3., Oldenburg, Germany.

Vollmann, A., Vornlocher, H.-P., Geick, A., Apfel, R., Giegerich, G., Bogdahn, U., 2003. RNAi mediated effective inhibition of EGFP and EGF-R gene expression in malignant glioma. AACR 94<sup>th</sup> Annual Meeting.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. U. Bogdahn für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können und sein beständiges Interesse am Fortschritt der Untersuchungen. Seine Begeisterung für die neuro-onkologische Forschung war stets Ansporn und Motivation.

Prof. Dr. Charalampos Aslanidis danke ich sehr für seine Bereitschaft, das Erstgutachten zu übernehmen und für das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse.

Dr. R. Kreutzer, Dr. S. Limmer, Dr. J. Soutscheck, Dr. H.-P. Vornlocher und allen Mitarbeitern der Alnylam Europe AG danke ich besonders für die unkomplizierte und anregende Zusammenarbeit, das große Interesse und die beständige Gesprächsbereitschaft.

Vielen Dank an Dr. Rainer Apfel für das Begleiten meiner Arbeit trotz der entstandenen thematischen und räumlichen Entfernung.

Anett Dörfelt, Silvia Eberhardt, Kristin Hergert, Matthias Hornberg, Annette Lohmeier, André Müller, Xiomara Pedre Villareal, Jutta Schipka und allen anderen Kolleginnen und Kollegen aus der neurologischen Forschungsgruppe und aus dem H3 danke ich ganz herzlich für das gute Arbeitsklima und die immer selbstverständlich entgegengebrachte Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank geht außerdem an Dr. G. Brockhoff für die Einführung in die Durchflusszytometrie und an Dr. B. Becker für viele Tips bei PCR- und Array-Fragen und an ihn speziell für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Dr. T. Stempfll für die Durchführung der Mikroarray-Analysen und die Hilfe bei der Interpretation der Daten.

Dr. T. Spruss danke ich für die Zusammenarbeit bei den *in-vivo*-Untersuchungen, Dr. G. Bernhardt für die vielen Anregungen bei der Quantifizierung von eGFP und Zellmasse.

Nicht zuletzt ein spezieller Dank an Jürgen und an meine Eltern für ihre beständige Unterstützung, Aufmunterung und große Geduld.

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig  
und ohne unzulässige Hilfe angefertigt

---

Arabel Vollmann