

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Susanne Kleber

aus: Achern

Tag der mündlichen Prüfung

**γ -Bestrahlung führt zu CD95-abhängiger Invasivität in
apoptoseresistenten Glioblastomzellen**

**Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth G. Pollerberg
Prof. Dr. Peter H. Kramer**

*„Nicht Kunst und Wissenschaft
allein, Geduld will bei dem Werke
sein.“*

Johann Wolfgang von Goethe

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ana Martin-Villalba für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit. Die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen waren für das voranbringen meiner Arbeit immer sehr wertvoll und hilfreich. Auch die finanzielle Unterstützung, ermöglichte es mir internationale Kongresse zu besuchen. Aber auch für das freundschaftliche Verhältnis über die vergangenen Jahre möchte ich mich bei ihr bedanken.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Peter H. Kramer für die Möglichkeit in seinem Labor meine Arbeit anzufertigen und für die ständige wissenschaftliche Unterstützung. Zusätzlich möchte ich ihm für die Finanzierung meiner Doktorandenstelle danken, die diese Arbeit erst ermöglichte.

Ein besonderer Dank gilt Frau Alexandra Beisel für ihre hervorragende technische Unterstützung im Labor und für die vielen unterhaltsamen Gespräche nebenbei.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Cecilia Zuliani, für die jahrelange sehr gute Zusammenarbeit im Labor. Sie ist mir jederzeit mit helfenden Tips und Trick zur Seite gestanden. Mein Dank gilt natürlich auch den restlichen Mitgliedern unserer kleinen Neurogruppe: Nina, Stefan, Elisabeth, Steffi und Benedikt. Unsere wöchentlichen Gruppentreffen sowie die enge und gute Zusammenarbeit waren absolut wertvoll und hilfreich für das voranbringen meines Projektes. Der Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter H. Kramer für die wissenschaftliche und technische Unterstützung.

Mein sehr persönlicher Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern Fritz und Erika Kleber, die mich mit Rat und Tat speziell im letzten Sommer immer unterstützten und für die Verköstigungen wenn wir zu Besuch waren, die alle Sorgen vergessen ließen. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen! Meinen Geschwistern danke ich ebenfalls für das gute Verhältnis das wir alle zueinander haben.

Zum Abschluss danke ich von ganzem Herzen meinem Mann Daniel Deckers sein Verständnis und seine Liebe haben mein Leben noch lebenswerter gemacht und er hat mich speziell in der Endphase meiner Promotion unterstützt wo er nur konnte! Danke!

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungen	1
II. Zusammenfassung	4
Summary	6
III. Einleitung	7
1. Apoptose	7
1.1 Definition von Apoptose	7
1.2 Das Todesrezeptor/-liganden System	7
1.2.1 Die CD95/CD95L-Signalkaskade	11
1.2.2 Inhibierung der Apoptose-Kaskade	12
1.2.3 Caspasen	14
1.3 Apoptose im Zentralen Nervensystem	15
2. Glioblastome	18
2.1 Epidemiologie und Pathophysiologie von Glioblastomen	18
2.2 Zellmigration	20
2.3 Zellinvasion	21
2.4 Signalmoleküle des Migrations-/Invasionsprozesses	22
2.4.1 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	22
2.5 Effektormoleküle oberhalb der MMPs	24
2.5.1 ILK-Struktur und Signalkaskade	24
2.5.2 Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK3)	26
2.5.3 β-Catenin	27
3. Ziel der Arbeit	28

IV. Material und Methoden	29
1. Material	29
1.1. Zelllinien	29
1.2 Chemikalien und Reagenzien	29
1.3 Antikörper	32
1.4 Kits	34
1.5 Plasmide und Vektoren	34
1.6 Primer	35
1.7 siRNA-Sequenzen	35
2. Puffer und Lösungen	36
2.1 Zellkultur	36
2.2 Zelltransfektion	37
2.3 Durchflusszytometrie	38
2.4 Immunocytochemie	38
2.5 Proteinextraktion	39
2.6 Western Blot	39
2.7 Ausstattung und Geräte	41
3. Methoden	42
3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	42
3.2 Spheroidkulturen	42
3.3 Kollagen-Invasions-Assay	43
3.4 Migrationassay	43
3.5 γ -Bestrahlung von Zellen	44
3.6 Apoptoseassay	45

3.7 Antikörperfärbung für das Durchflusszytometer FACS)	45
3.8 Immunozytochemie	46
3.9 Transfektion von Zellen	46
3.9.1 Lipofectamine 2000	46
3.9.2 Kalzium-Phosphat-Methode	47
3.10 Produktion des LZ-CD95L	47
3.11 Lentivirus Produktion	47
3.12 Titerbestimmung	48
3.13 Infektion eukaryotischer Zellen mit lentiviralen Konstrukten	49
3.14 Proteinextraktion	49
3.15 Proteinbestimmung	50
3.16 Gelelektrophorese und Immunoblot	51
3.17 RNA-Isolierung mit dem Qiagen Mini-Kit	51
3.18 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	52
3.19 Real-Time PCR (Polymerase Kettenreaktion)	53
V. Ergebnisse	56
1. Die Expression und Funktion des CD95/CD95L-Systems in Glioblastomen	56
1.1 Glioblastom Zelllinien zeigen unterschiedliche Sensitivitäten gegen CD95-vermittelter Apoptose	56
1.2 Die Expression des CD95 und CD95L in Glioblastomzellen	58
1.3 CD95L induziert Migration/Invasion resistenter Glioblastomzelllinien	59
1.4 Die Stimulierung des CD95-Rezeptors führt zu einem Anstieg der Expression der Matrix MMP-9 und -2	60

1.5 Welche Moleküle sind an dem CD95-induzierten Migrationsprozess beteiligt?	62
1.6 ILK verstärkt die Migration/Invasion der Zellen durch die Hemmung von GSK3β	63
1.7 AKT ist mitverantwortlich für die Hemmung von GSK3β	66
1.8 Die Inhibierung von ERK hat keinen Einfluss auf die CD95-induzierte Migration	67
1.9 Der Migrationseffekt ist unabhängig von Caspasen	68
1.10. Die Aktivierung von β-Catenin als Folge der Inhibierung von GSK3β	70
1.11 PED/PEA-15 - ein mögliches Bindeglied zwischen CD95 und ILK?	72
2. Primäre Glioblastom Zelllinien	73
2.1 Expression des CD95-Rezeptors und die Sensitivität für CD95-induzierte Apoptose in Astrozytom- und Oligodendrogliomzelllinien	74
2.2 CD95-Expression und Apoptosesensitivität in primäre Glioblastomzelllinien (WHO IV)	76
2.3 Primäre Glioblastomzellen zeigen nach Stimulation des CD95-Rezeptors einen Anstieg in der Expression von MMPs	78
2.4 Primäre Glioblastomzellen zeigen eine erhöhte Migration nach CD95-Stimulierung	79
2.5 Expression des CD95/CD95L-System in primärem Tumorgewebe	80
2.6 Klinische Relevanz des CD95/CD95L-Systems nach γ-Bestrahlung	82
2.7 γ-Bestrahlung führt zur Transkription der MMP-9 und -2	83
2.8 γ-Bestrahlung verstärkt die Migration resistenter, etablierter Glioblastomzellen	85

2.9 γ-Bestrahlung in primären Glioblastomzelllinien erhöht die	
Migration	85
VI. Diskussion	87
1. Migration/Invasions Modelle	87
2. Die Expression des CD95 und CD95L in Glioblastomas	89
3. Signalkaskade der CD95L-induzierten Invasion/Migration	92
4. γ-Bestrahlung und Chemotherapie führen zu einer	
Hochregulierung des CD95/CD95L Systems	96
VII. Referenzliste	99
VIII. Publikationsverzeichnis	118
IX. Erklärung	119

I. Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
¹³⁷ Cs	Cäsium
AIF	Apoptosis-inducing factor
AK	Antikörper
AP-1	Activator protein-1
Apaf-1	Apoptosis-activating factor1
CD95	CD95 Rezeptor
CD95L	CD95 Ligand
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DIL	Death-inducing ligand
DISC	Death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
ERK	Extracellular signal-regulated protein
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	foetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLICE	FADD-like ICE
FLIP	FLICE-inhibitory proteins
GFP	Green fluorescence protein
<i>gld</i>	Generalized lymphoproliferation
GSK3	Glycogen synthase kinase-3
Gy	Grey
h	Stunden
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HRPO	Horse radish peroxidase
IB	Immunoblot

ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
IF	Immunofluorescence
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunohistochemistry
ILK	Integrin-linked kinase
kDa	Kilodalton
Lef	lymphoid enhancing factor
<i>lpr</i>	Lymphoproliferative
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
min	Minutes
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCH	Neurochirurgie Heidelberg
NF- κ B	Nuclear factor-kappaB
NGF	Nerve growth factor
P/S	Pencillin/streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute
RT	Reverse Transkription
RT	Room temperature
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulphate-polyacrylamid-gel electrophoresis
sec	Second
Tcf	T-cell factor
TFs	Transcription factors
TNF	Tumor necrosis factor
TNF-R	Tumor necrosis factor receptor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

TRIS	Tri-(hydroxymethyl-)aminoethan
ZNS	zentrales Nervensystem

II. Zusammenfassung

Hirntumore, wie das Glioblastoma multiforme (GBM), zählen zu den häufigsten und bösartigsten Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS). Trotz sich weiterentwickelnder Diagnosemöglichkeiten ist die Überlebensrate sehr gering. Weniger als 3% der Patienten überleben die ersten 5 Jahre nach der Diagnose. Der klinische Verlauf bösartiger Glioblastome ist von der Invasion isolierter Tumorzellen in das normale Gehirngewebe abhängig. Diese Zellen entkommen der operativen Entfernung des Tumors. Sie sind Ziel der postoperativen Strahlen- und Chemotherapie. Diese postoperativen Therapieformen induzieren Apoptose durch Induktion der Expression der Todesrezeptoren und ihrer Liganden, wie beispielsweise des CD95-(Fas/Apo-1) Todessystems. In den letzten 20 Jahren wurden immer wieder neue Therapieformen entwickelt, die oftmals aber einen gegenteiligen Effekt erzielten. So führten beispielsweise die Antiangiogenese Medikamente zu einem verstärkten Auswachsen der Zellen aus dem Glioblastom (Lamszus et al., 2003). Ein weiteres Problem ist die zunehmende Resistenz der Glioblastome gegenüber apoptoseinduzierenden Therapien.

Das Anliegen dieser Studie war den Mechanismus der Invasion genauer zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass die Stimulierung des CD95-Rezeptors einen Anstieg der Migration/Invasion in apoptoseresistenten etablierten und Glioblastomzellen auslöste. Diese Zunahme konnte sowohl mit exogenen Stimuli (α -Apo-1 Antikörper bzw. LZ-CD95L) als auch durch die Hochregulierung des endogenen CD95/CD95L-Systems nach γ -Bestrahlung beobachtet werden. Der CD95-vermittelte Anstieg konnte durch einen neutralisierenden Antikörper gegen CD95L blockiert werden. Die Tendenz der Zellen zu migrieren, anstatt durch Apoptose zu sterben, steigt mit dem Malignitätsgrad der Glioblastome an. Der Signalweg der CD95-vermittelten Migration läuft über die Aktivierung der PI3Kinase (PI3K), der Integrin-Linked-Kinase (ILK), der Inhibierung von GSK3 β und der Expression der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Caspasen sind an diesem Signalweg nicht beteiligt. Das

direkte Verbindungsglied unterhalb des CD95-Rezeptors konnte in dieser Studie nicht detektiert werden. Das „phosphoprotein enriched in diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes-15-kDalton“ (PED/PEA-15) wurde als möglicher Kandidat untersucht. Jedoch konnte nach dem Ausschalten der PED/PEA-15-Expression keine Veränderung in der Hemmung von GSK3 β detektiert werden.

Vor diesem Hintergrund sollten die postoperativen Therapieformen sehr gut überlegt und die Auswahl durch vorherige Tests des entnommen Tumors auf seine Reaktion gegenüber CD95-Stimulierung getroffen werden.

Summary

Gliomas account for more than 50% of all brain tumors and are by far the most common primary brain tumors in adults. Despite development of new diagnostic technologies, the survival rate is extremely low. Only 3% of the patients are still alive five years after diagnosis. The clinical outcome of malignant gliomas depends on the invasion of isolated tumor cells in the normal brain tissue. Migrating cells can escape the surgical ablation of the tumor and are then the prime targets of post-surgical radio- and adjuvant chemotherapy. Chemotherapeutic agents and irradiation act primarily by inducing apoptosis. Induction of apoptosis often involves activation of the CD95 (Apo-1/Fas) death receptor/CD95L (ligand) system. Nevertheless, most malignant glioma cells are resistant to CD95-induced apoptosis. Here we show that triggering of CD95 increases migration/invasion in apoptosis-resistant human long-term and primary glioma cultures. The tendency of glioma tumor cell lines to migrate rather than to die by apoptosis increases with the degree of malignancy. CD95 mediates migration via the PI3K/ILK/GSK3 β /MMP pathway in a caspase-independent manner. Furthermore, we tried to figure out the linker molecule downstream of CD95. A possible candidate was “phosphoprotein enriched in diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes-15-kDalton” (PED/PEA-15). Knockdown experiments excluded PED/PEA-15 as linker molecule in the signaling pathway of migration mediated through the CD95/CD95L-System. Most importantly, γ -irradiation also increased migration of cells resistant to CD95-induced death. Irradiation-mediated migration could be blocked by neutralization of CD95L. Thus, the reaction of a glioma to CD95 stimulation should dictate subsequent therapy options.

III. Einleitung

1. Apoptose

1.1 Definition von Apoptose

Programmierter Zelltod, der auch als Apoptose bezeichnet wird, wurde zum ersten Mal Mitte des 19. Jahrhunderts von C. Vogt beobachtet. Er erkannte, dass Zellen während der Embryonalentwicklung von Amphibien einen vorhersagbaren „programmierten“ Tod sterben (Vogt, 1842). 1951 konnte der Embryologe Glucksman die Regression fetaler Strukturen auf den Tod einzelner Zellen zurückführen (Los et al., 1999; Vaux and Korsmeyer, 1999). Der Begriff Apoptose wurde 1972 von Kerr als eine weitere Form des Zelltodes neben der bereits existierenden Nekrose eingeführt (Kerr et al., 1972). Es wurde sehr schnell deutlich, dass Apoptose nicht nur in der Entwicklung eine große Rolle spielt (Los et al., 1999; Vaux and Korsmeyer, 1999), sondern auch für die Erhaltung der Gewebshomöostase wichtig ist. Des Weiteren werden durch virale Infektion oder Mutation geschädigte Zellen mittels Apoptose entfernt.

Nekrose ist eine passive Form des Zelltodes, die einen frühen Verlust der Membranintegrität, eine abnormale Organellmorphologie, ein Anschwellen der Zellen (Onkose) und ein Zerreißen der Lysosomen mit sich bringt; eine inflammatorische Reaktion mit Gewebsschädigung ist die Folge. Diese Form des Zelltodes kann durch viele Signale ausgelöst werden (Hale et al., 1996). Apoptose scheint dagegen nur in bestimmten Zellen aufzutreten. Es handelt sich hierbei um eine aktive Form des Zelltodes, bei der die zelleigene DNA abgebaut wird (Kerr et al., 1972; Majno and Joris, 1995). Die charakteristischen Merkmale dieser Form des Zelltodes sind die Chromatinkondensierung, die Fragmentierung des Zellkerns, die Erhaltung der

Membranintegrität und die Abnahme des Zellvolumens. Durch den Verlust der Membranstabilität kommt es zu Ausstülpungen der Zelle (Zeiose). Dies führt letztlich zur Abschnürung membranumschlossener Teile der Zelle, die als apoptotische Körperchen bezeichnet werden. *In vivo* werden diese apoptotischen Körperchen, die Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche exponieren, von Phagozyten oder anderen benachbarten Zellen erkannt, aufgenommen und abgebaut (Savill et al., 1993). Biochemische Vorgänge während der Apoptose sind die Aktivierung von Endonukleasen, DNA Degradierung und die Aktivierung der Cysteinproteinasen, genannt Caspasen (Saraste and Pulkki, 2000).

Apoptose wird jedoch auch unter pathologischen Bedingungen beobachtet. Hierbei werden die Zellen nicht unbedingt getötet, sondern es wird ihnen die Möglichkeit gegeben, den Schaden zu reparieren. Zahlreiche Stimuli können Apoptose induzieren wie z.B. Glutamatoxizität, freie Radikale, Ca^{2+} -Anstieg sowie Zytokine und Entzündungsreaktionen (Lu et al., 2000). Die Antwort der Zelle ist von der Schwere des Stimulus sowie des Zellstadiums abhängig. (Bredesen, 1995; Bredesen, 1996). Auch bei einer Vielzahl humaner Erkrankungen spielt Apoptose eine große Rolle, wie z.B. Herzerkrankungen, Krebs, AIDS, neurodegenerative Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen.

Trotz der gegensätzlichen Charakteristika von Nekrose und Apoptose gibt es Hinweise dafür, dass beide Prozesse miteinander gekoppelt sein können. So kann die Blockade eines apoptotischen Signalweges zum Zelltod über einen nekrotischen Weg führen (Vercammen et al., 1998).

1.2 Das Todesrezeptor/-liganden System

Die wachsende Familie der Todesrezeptoren gehört zur „tumor necrosis factor“ (TNF)/nerve growth factor (NGF) Rezeptor Superfamilie (Bhardwaj and Aggarwal, 2003). Diese ist charakterisiert durch das Vorhandensein einer extrazellulären zysteinreichen (zwei bis sechs

Zysteinreste) Sequenz (Smith et al., 1994). Ebenfalls charakteristisch ist die Anwesenheit einer intrazellulären Todesdomäne (engl.: death domain, DD), die für die Übertragung des apoptotischen Signals essentiell ist (Itoh and Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993). Bisher sind acht Mitglieder dieser Familie bekannt, nämlich CD95 (DR2, APO-1 und Fas) (Kischkel et al., 1995; Nagata, 1997), TNFR-1 (DR1, p60, p55 and CD120a) (Schall et al., 1990; Trauth et al., 1989), APO-3 (DR3, TRAMP, WSL-1 oder LARD), TRAIL-R1 (DR4, oder Apo-2), TRAIL-R2 (DR5, TRICK2 oder KILLER), DR6 (Ashkenazi and Dixit, 1999; Schulze-Osthoff et al., 1998), Ectodysplaslin A Rezeptor (EDAR), der "nerven growth receptor" (NGFR) (French and Tschopp, 2003; Wajant, 2003) und der vom Vogel stammende CAR1 (Chinnaiyan et al., 1996; Kitson et al., 1996; Marsters et al., 1996; Pan et al., 1997a; Pan et al., 1997b; Pan et al., 1998; Screaton et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997). Unter ihnen ist CD95 (Fas, Apo-1 oder DR2) der am besten charakterisierte Todesrezeptor (Krammer, 2000; Schmitz et al., 2000). Die Todesrezeptoren werden durch ihre natürlichen Liganden aktiviert. Diese Liganden gehören zur TNF-Familie, sie sind Typ II-Transmembranproteine, von denen eine lösliche Form durch die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen generiert werden kann (Kayagaki et al., 1995; Tanaka et al., 1998). Der CD95 Ligand (CD95L, APO-1L, FasL), bindet an CD95 und ist ein stark glykolysiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 40kDa (Suda et al., 1997; Takahashi et al., 1994) TNF- α bindet an TNFR1; Apo-3 Ligand (TWEAK) bindet an DR3 und TRAIL (Apo-2 Ligand) bindet an TRAIL-R1 (Chicheportiche et al., 1997; Marsters et al., 1996; Pan et al., 1997b; Sheridan et al., 1997; Suda et al., 1997; Takahashi et al., 1994; Wiley et al., 1995). Die so genannten Decoyrezeptoren („Köder-Rezeptoren“) gehören ebenfalls zur Familie der Todesrezeptoren, enthalten aber keine Todesdomäne (Pitti et al., 1998; Yu et al., 1999) und können somit keine Signalkomplexe bilden. (Comerford and Nibbs, 2005). Bis zum heutigen Tag sind vier Decoyrezeptoren charakterisiert worden: TRAIL-R3 (DcR-1, LIT, TRID) (Mongkolsapaya et al., 1998; Pan et al., 1997a), TRAIL-R4 (DcR-2, TRUNDD) (Degli-Esposti et al., 1997; Pan et

al., 1998) OPG (Simonet et al., 1997) und DcR-3 (TR6) (Yu et al., 1999). Zuletzt genannter bindet sowohl CD95L als auch LIGHT (Pitti et al., 1998; Yu et al., 1999) (Abb.III.1).

Der CD95L ist ein Typ II-Transmembranprotein, sein N-Terminus ist im Zytoplasma lokalisiert während sein C-Terminus in den extrazellulären Raum ragt. Die extrazelluläre Region besteht aus 150 Aminosäuren und ist hoch konserviert zwischen den Mitgliedern der TNF-Familie, während die Länge und Sequenz der zytoplasmatischen Region sehr variabel ist. Membrangebundener CD95L wie auch TNF können durch eine proteolytische Spaltung eine lösliche Form des Proteins erzeugen (Nagata, 1997). Die lösliche Form des humanen CD95L ist funktionell, während der murine CD95L sehr stark an Aktivität verliert, wenn er in der löslichen Form vorliegt (Krammer, 2000). Die funktionellen, löslichen Formen von TNF und CD95L liegen als Trimere vor (Nagata, 1997). Jedoch wird von mehreren Gruppen ein Bereich in der zysteinreichen Domäne verschiedener Rezeptoren beschrieben, wie z.B. beim CD95-Rezeptor, mit der die Rezeptoren nach ihrer Stimulation interagieren und Trimere bilden (Papoff et al., 1999; Papoff, 2000). Dieser Bereich wird als PLAD (engl.: pre-ligand binding assembly domain) bezeichnet. Die Bindung des Todesliganden an seinen Rezeptor kann entweder zu einer Konformationsänderungen der bereits bestehenden Trimere führen mit der konsequenten Anhäufung der intrazellulären Todesdomäne, oder sie bilden aus den Trimeren Multimere.

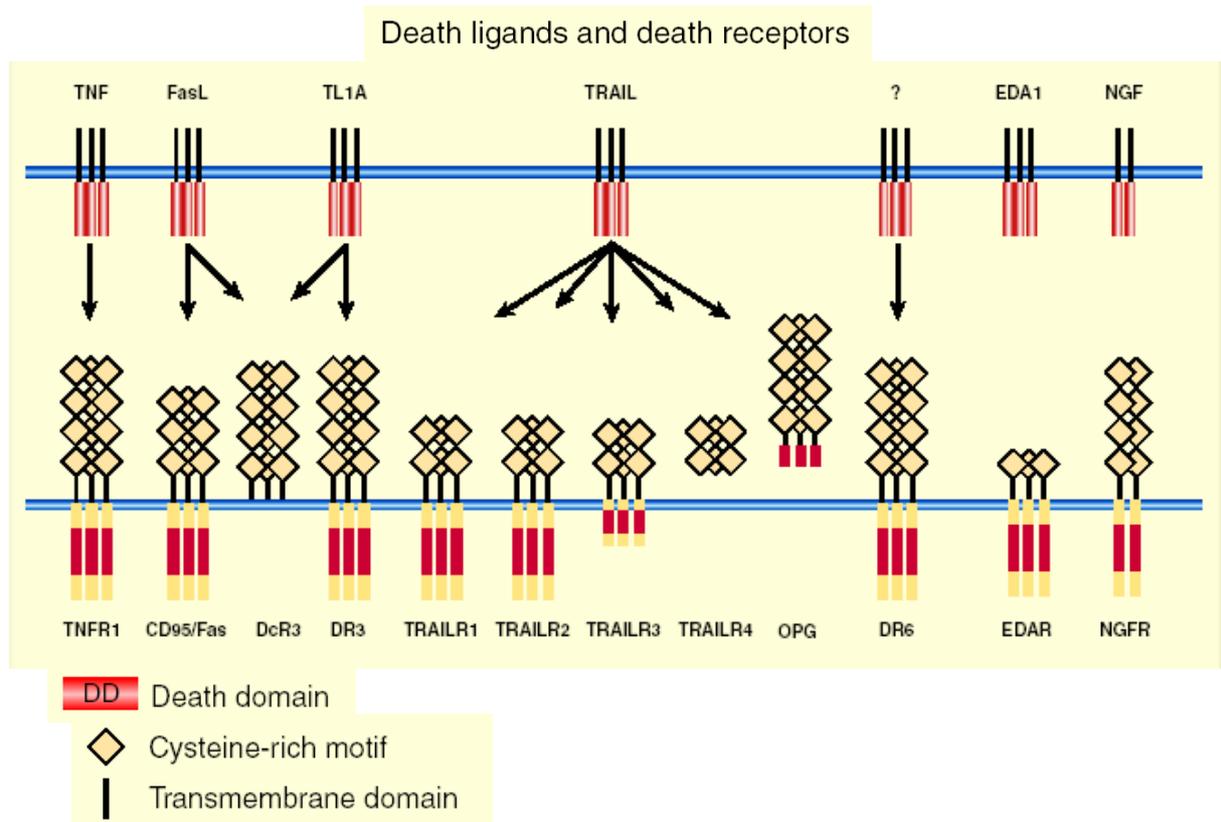


Abb.III.1: Schematische Darstellung der Todesrezeptoren und ihrer Liganden. Die Liganden sind im oberen Teil des Bildes zu sehen und die Rezeptoren im unteren Teil (Lavrik et al., 2005).

1.2.1 Die CD95/CD95L-Signalkaskade

Bindet der CD95L an seinen Rezeptor, CD95, wird eine Signalkaskade ausgelöst. Unstimulierte CD95-Rezeptoren liegen als prä-assozierte Komplexe vor (Siegel et al., 2000). Durch die Stimulierung des Rezeptors oligomerisiert er und bildet Mikroaggregate, die gegenüber Natriumdodecylsulfat stabil sind (Boldin et al., 1995; Kischkel et al., 1995). Aktivierter CD95 rekrutiert das Adaptermolekül FADD (engl.: Fas-associated death domain, MORT1) (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). FADD enthält wie der CD95-Rezeptor eine Todesdomäne (engl.: death domain; DD), mit der es mit dem Rezeptor interagiert, sowie eine Todeseffektordomäne (engl.: Death effector domain; DED). In einem nächsten Schritt werden zusätzliche Moleküle in den todesinduzierenden Signalkomplex (engl.: Death-inducing signaling complex, DISC) rekrutiert: Zwei Isoformen der Caspase-8, Caspase-8/a

(FLICE/Mach- α 1/Mch5 β) und Caspase-8/b (Mach- β 2) (Boldin et al., 1995; Muzio et al., 1996; Scaffidi et al., 1997), Caspase-10 (Kischkel et al., 1995; Sprick et al., 2002; Stegh and Peter, 2001) sowie das zelluläre „FLICE-inhibitory protein“ (FLIP_{L/S}) (Peter and Kramer, 2003). Die beiden Hauptbestandteile des DISC sind FADD und Caspase-8. Die Procaspase-8 ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, in bestimmten Zelltypen befindet sie sich auch in den Mitochondrien (Stegh et al., 2000; Stegh et al., 2002). Die zwei aufeinanderfolgenden DEDs (Tandem-DED) der Caspase-8 werden für die Bindung an FADD und somit für die Rekrutierung an den DISC benötigt. Procaspase-8 wird auf DISC-Ebene autoproteolytisch in die p10- und zwei p18-Untereinheiten gespalten, die als Heterotetramer schließlich die aktive Caspase-8 bilden. Aktive Caspase-8 spaltet und aktiviert nachfolgende Effektor-Caspasen, um den Apoptose-Prozess der Zelle weiter zu führen (Medema et al., 1997b; Salvesen and Dixit, 1999; Scaffidi et al., 1998). Ein weiterer Bestandteil des DISC ist das Molekül CAP3 (Kischkel et al., 1995). CAP3 besitzt wie Caspase-8 ein Tandem-DED am N-Terminus und einen bislang nicht charakterisierten C-Terminus. Über die Identität und Funktion von CAP3 liegen unterschiedliche Hypothesen vor. CAP3 könnte eine Procaspase-8 Prodomäne darstellen oder eine kurze Splicevariante der Procaspase-8 sein vergleichbar mit c-FLIP_S oder FLIP_L, die die CD95-Signalkaskade hemmen (Muzio et al., 1996; Sprick et al., 2002). Eine Alternative könnte sein dass CAP3 als Kofaktor für die Aktivierung der Procaspase-8 verantwortlich ist (Medema et al., 1997a; Yang et al., 1998). Die neuesten Studien zeigen dass CAP3 am DISC als Zwischenprodukt der Procaspase-8a-Spaltung erzeugt wird (Golks et al., 2005b). Wie bereits erwähnt, wird auch Caspase-10 über homotypische Interaktionen mit der DED von FADD an den DISC gebunden und bildet aktive Heterotetramere (Kischkel et al., 1995; Sprick et al., 2002). Jedoch sind die Ergebnisse, dass Caspase-10 in Abwesenheit von Caspase-8 Zelltod induzieren kann, in der Literatur kontrovers diskutiert.

1.2.2 Hemmung der Apoptose-Kaskade

Die durch Todesrezeptoren vermittelte Apoptose kann zum einen auf Rezeptorebene z.B. durch Glykosylierung (Keppler et al., 1999) und zum anderen durch das Eingreifen in den Signalweg unterhalb des Rezeptors moduliert werden. So können entweder sogenannte IAPs (engl.: Inhibitors of apoptosis proteins) Caspasen direkt inhibieren (Deveraux and Reed, 1999), oder anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder inhibieren auf mitochondrialer Ebene den Signalweg. (Scaffidi et al., 1998). Am DISC wird die todesrezeptorvermittelte Apoptose durch „sFLICE-inhibitory proteins“ (FLIP_S) reguliert. Diese Proteine werden als „virale FLICE-inhibitory proteins“ (v-FLIPs) bezeichnet (Thome et al., 1997). Das humane Homolog zu den v-FLIPs ist c-FLIP/Casper/I-FLICE/FLAME-1/CASH/CLARP/MRIT/Usurpin (Goltsev et al., 1997; Rasper et al., 1998; Srinivasula et al., 1997) und hat eine starke Sequenzhomologie zu Caspase-8. c-FLIP hat zahlreiche Splicevarianten auf mRNA- (messengerRNA) Ebene, jedoch nur drei Isoformen auf Proteinebene, c-FLIP-long (FLIP_L), c-FLIP-short (FLIP_S) (Irmeler et al., 1997; Scaffidi et al., 1999) und c-FLIP_R (Golks et al., 2005a). c-Flip_S und c-Flip_R werden abhängig vom Stimulus zum DISC rekrutiert, dadurch kann Caspase-8 nicht weiter an den DISC angelagert werden. Die Funktion von c-Flip_L wird kontrovers diskutiert: Einerseits wird es als anti-apoptotisches Molekül charakterisiert, das wie c-Flip_S mit dem DISC interagiert und somit die Apoptosekaskade inhibiert. Andererseits wird c-Flip_L aber auch mit der Prozessierung der Caspase-8 in Verbindung gebracht (Chang et al., 2002; Micheau et al., 2002).

Ein weiteres Protein mit DED, das mit dem DISC interagieren kann ist „Phosphoprotein enriched in Diabetes/Phosphoprotein enriched in Astrocytes-15-kDalton“ (PED/PEA-15-kDa). Es wird hauptsächlich in Astrozyten exprimiert und schützt diese vor TNF- α -induzierter Apoptose. Die Hemmung der Apoptose erfolgt einerseits durch die Unterbindung der FADD-Caspase-8-Bindung, so dass die Formierung des TNF-R DISC verhindert wird.

Andererseits kann PED/PEA-15 die Aktivierung verschiedener Stresskinasen blockieren, die durch den Entzug von Wachstumsfaktoren, Wasserstoffperoxid und Anisomycin aktiviert werden. Notwendig dafür ist die Interaktion von PED/PEA-15 und ERK1/2. PED wird zum einen von der „Calcium-Calmodulin Kinase II“ (CaMKII) und zum anderen von der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert. Studien haben gezeigt, dass nur das doppelt phosphorylierte Molekül zum DISC rekrutiert werden und somit Apoptose hemmen kann (Xiao et al., 2002).

1.2.3 Caspasen

Der letzte Abschnitt des Todesprogrammes wird von einer Armee von Caspasen ausgeführt. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die nach einer wenig spezifischen Sequenz von vier Aminosäuren spalten. Die Sequenz muß jedoch unbedingt ein Aspartat in der Position P1 aufweisen (Earnshaw et al., 1999). In Säugetieren sind 14 verschiedene Caspasen bekannt, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie und Substratspezifität in drei Familien unterteilt werden können (Nicholson, 1999). Caspasen spielen im Apoptoseprozess eine entscheidende Rolle. Sie werden als inaktive Pro-Formen (Zymogene) synthetisiert und durch proteolytische Spaltung nach definierten Aspartatresten aktiviert. Dies führt zur Freisetzung einer großen und einer kleinen Untereinheit. Die große Untereinheit enthält das aktive Zentrum, das aus zwei kleinen Untereinheiten in Form eines $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers aufgebaut ist (Abb.III.1) (Blanchard et al., 1999; Mittl et al., 1997; Rotonda et al., 1996; Wilson et al., 1994). Die einzelnen Caspasen erfüllen unterschiedliche Rollen bei der Einleitung und Durchführung der Apoptose. Man unterscheidet zwischen Effektor-Caspasen und Initiator-Caspasen. Zu den Effektor-Caspasen gehören Caspase-3, -6 und -7. Sie spalten den Großteil der an der Apoptose beteiligten Proteine, auch die, die an der charakteristischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen beteiligt sind (Earnshaw et al., 1999; Slee et al., 1999).

Die Initiator-Caspasen, zu denen Caspase-8, -9 und -10 gehören, sind für die Übertragung früher apoptotischer Signale verantwortlich. Apoptose spielt jedoch nicht nur eine wichtige Rolle im Immunsystem bei der Beseitigung beschädigter Zellen, sondern auch bei der Embryonalentwicklung. So konnten Studien in *knockout*-Mäusen zeigen, dass die Aktivität von Caspasen bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) absolut notwendig ist (Los et al., 1999;Zheng et al., 1999). Kuida und seine Kollegen zeigten, dass bei Mäusen mit defektem *caspase-9* bzw. *caspase-3* Gen massive Missbildungen des ZNS auftreten (Kuida et al., 1996;Kuida et al., 1998).

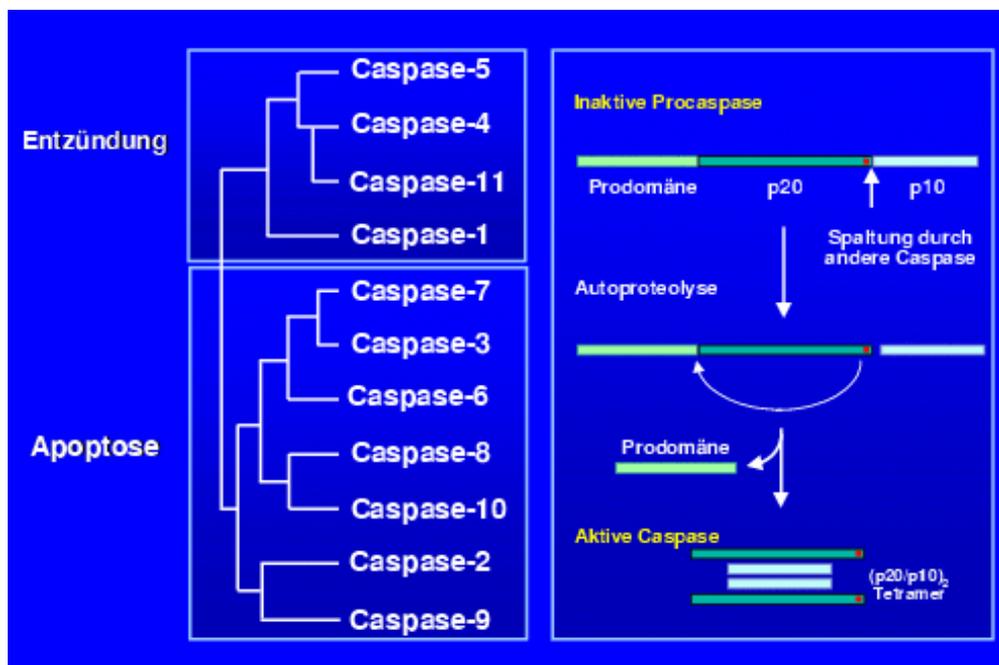


Abb. III.2 Schema der Caspasen und der Caspase-Prozessierung (Klaus Schulze-Osthoff, 2002).

1.3 Apoptose im Zentralen Nervensystem

Apoptose spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des ZNS, und beeinflusst dort sowohl die Morphologie als auch die Feinstruktur. Während der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems ist Apoptose ein ständiger Prozess, der in einer Vielzahl von

Neuronen (Motor-, Sensor-, Interneuronen etc.) beobachtet werden kann und in allen Vertebraten stattfindet. Dabei scheint es sich um eine Art Adaptationsmechanismus zu handeln (Oppenheim, 1991). Eine allgemeine Erklärung dieses Phänomens könnte sein, dass das Überleben von Neuronen von spezifischen neurotrophen Faktoren, den so genannten Neurotrophinen, abhängig ist. Diese werden von bestimmten Zellen freigesetzt und haben einen stimulierenden Effekt auf sich entwickelnde Neuronen. Außerdem können auch benachbarte Neuronen einen stimulierenden Einfluss auf die sich entwickelnden Neuronen nehmen. (Raff et al., 1994). Folglich ist das Überleben junger Neuronen von einer komplexen Interaktion verschiedener Faktoren abhängig. Jedes Ungleichgewicht der Faktoren kann zum Zelltod führen. Der Vorteil dieses Mechanismus ist, dass, obwohl viele Typen von Neuronen im Überschuss produziert werden, nur eine kleine Menge das nötige neurotrophe Signal zum Überleben empfängt, während der Rest abstirbt und dadurch die Neuronen-Ziel-Innervierung erleichtert.

Studien verschiedener *knockout*-Mäuse zeigen eindeutig das Vorkommen und die Relevanz von Apoptose in der neuronalen Entwicklung von Vertebraten. Durch die Inaktivierung verschiedener regulatorischer oder direkt beteiligter Moleküle des apoptotischen Signalwegs kommt es zur embryonalen oder perinatalen Lethalität (Honarpour et al., 2000; Kuida et al., 1996; Kuida et al., 1998). Interessanterweise ist das ZNS in diesen *knockout*-Tieren am stärksten betroffen. So weisen beispielsweise Mäuse, bei denen entweder das Gen der *caspase-3* bzw. der *caspase-9* ausgeschaltet wurde, massive Missbildungen des ZNS auf. Die morphologischen Fehlentwicklungen sind bereits am Embryonaltag (E) 10.5 zu erkennen (Kuida et al., 1996; Kuida et al., 1998). Bei diesen Tieren liegt aufgrund der fehlenden Caspaseaktivität ein Überschuss an neuroepithelialen Vorläuferzellen vor, was letztlich zu einer Exencephalie führt (Abb.III.3 rechtes Bild). Die Tiere sterben 1-3 Wochen nach der Geburt.

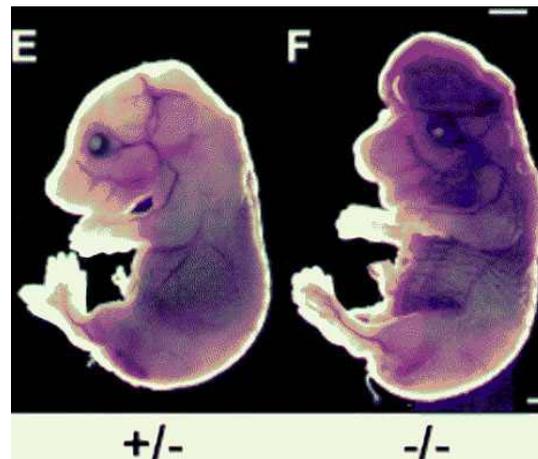


Abb. III.3 Exencephalie in Caspase-9^{-/-}-Mäusen. (Kuida et al., 1998)

Jedoch nicht nur Caspase-9^{-/-} und Caspase-3^{-/-} *knockout*-Tiere zeigen massive Schädigungen des ZNS, auch Apaf-1^{-/-} *knockout*-Mäuse (Honarpour et al., 2000) sterben in der Regel direkt nach der Geburt. Der Grund hierfür ist ähnlich wie bei caspasedefizienten Tieren die Anhäufung neuroepithelialer Vorläuferzellen, die unter normalen Bedingungen durch Apoptose absterben. Diese Akkumulation führt letztlich auch zu einer Ausstülpung des Gehirns. Überraschenderweise überleben 5% der Apaf-1^{-/-} Mäuse. Im Gegensatz zu den letalen Mutanten zeigen sie keine pathologischen Veränderungen des ZNS. Jedoch tragen die Männchen einen Defekt in der Spermatogenese.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde klar, dass der gleiche Apoptosemechanismus, der eine entscheidende Funktion während der Entwicklung hat, unter pathologischen Bedingungen im adulten ZNS reaktiviert werden kann und dort zum Verlust von Neuronen führt, wie z.B. bei der globalen oder fokalen zerebralen Ischämie (Choi, 1996; Martin-Villalba et al., 1999; Martin-Villalba et al., 2001), die zu einer Hochregulierung der Todesrezeptoren CD95 und TNF-R1 und TNF-R2 sowie deren Liganden führt. Durch den Einsatz neutralisierender Antikörper gegen CD95L und TNF- α bzw. die Verwendung entsprechender *knockout*-Tiere (*gld*, *tnf*^{-/-} und *gld/tnf*^{-/-}), konnte der Schaden erheblich reduziert werden sowie eine deutliche Verbesserung der motorischen Aktivität der behandelten Tiere bzw. *knockout*-Tiere im

Vergleich zu den Kontrolltieren erreicht werden (Martin-Villalba et al., 2001). Aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer und Huntington (Mattson et al., 2000), wo eine extrem hohe Caspaseaktivität beobachtet werden kann, deren Ursache noch nicht aufgeklärt werden konnte, sowie auch bei Gehirntrauma und Rückenmarksverletzung (Demjen et al., 2004; Mattson et al., 2000; Raghupathi et al., 2000) spielt Apoptose eine wichtige Rolle.

Liegt also zuviel Apoptose vor, kommt es zum Verlust von Neuronen und dadurch zu einer irreversiblen Schädigung des ZNS.

2. Glioblastome

Ein Übermaß an Apoptose führt im ZNS zum irreversiblen Verlust von Neuronen. Dieses Phänomen begleitet neurodegenerative Erkrankungen sowie akute Verletzungen des ZNS.

Tritt jedoch das andere Phänomen auf, nämlich zu wenig Apoptose, so ist dies die Grundlage für die Entwicklung von Krebs. Im ZNS entwickeln sich dadurch sehr maligne Hirntumore, die eine hohe Resistenz gegenüber den gängigen Therapiemöglichkeiten aufweisen. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Erkrankungen, wird die Apoptose-Maschinerie nicht reaktiviert, sondern sie ist in einigen Zellen partiell oder komplett verloren gegangen, was zu einem unkontrollierten Wachstum führt, das letztlich in einem Hirntumor enden kann.

2.1 Epidemiologie und Pathophysiologie von Glioblastomen

Gliome machen 50% aller Hirntumore aus. Meist sind es primäre Hirntumore in Erwachsenen (Kleihues et al., 2002). Sie zählen zu den häufigsten und bösartigsten Hirntumoren. Man unterscheidet histopathologisch zwischen Astrozytomen, Oligodendrozytomen und Glioblastomen, denen zum einen eine Transformation von Astrozyten, Oligodendrozyten und

Gliazellen zu Grunde liegt. Der häufigste (65%) und histologisch bösartigste Typ ist jedoch das Glioblastom multiforme (GBM) (Abb.III.4).

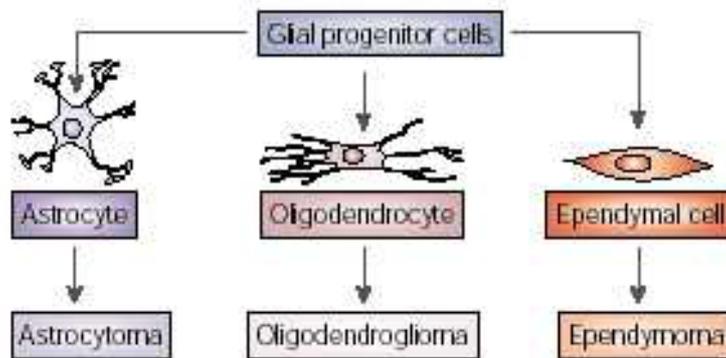


Abb. III.4 Gliazellen und Gliome (Rao, 2003).

GBMs können als primäre Tumore neu entstehen oder sich aus anaplastischen Astrozytomen entwickeln und werden dann als sekundäre GBMs bezeichnet (Benjamin et al., 2003; Kleihues and Ohgaki, 1999; Mischel and Cloughesy, 2003). Trotz moderner Techniken im Diagnosebereich und sich immer neu entwickelnder Therapien ist die Überlebensrate immer noch sehr gering. Weniger als 3% der Patienten sind 5 Jahre nach ihrer Diagnose noch am Leben. Problematisch sind vor allem die vom Haupttumor abwandernden Zellen, die in gesundes Gehirngewebe einwandern. So sind zum Zeitpunkt der Diagnose und letztendlich der Operation bereits eine Vielzahl von Zellen aus dem Haupttumor in das gesunde Gehirngewebe eingewandert. Dandy und seine Kollegen erkannten bereits 1928 (Demuth and Berens, 2004) den invasiven Charakter dieses Tumortyps und führte Hemispherektomien an Patienten durch. Trotz dieses Fortschritts traten spätestens 3 Monate nach der Operation neue Tumore auf. Deshalb wurde dieses Verfahren nicht weiter angewendet. In den letzten 20 Jahren konnten keine wesentlichen Fortschritte bei der Entwicklung einer erfolgreichen Therapie erzielt werden. Auch Medikamente wie z.B. Metalloproteinase-Inhibitoren oder Angiogenese-Inhibitoren können die Überlebensrate nicht erhöhen (Tonn and Goldbrunner, 2003). Im Gegenteil, so führen beispielsweise antiangiogenese-Medikamente zu einem

verstärkten Auswandern der Zellen aus dem Glioblastom, was letztlich eine Gliomatosis cerebri verursacht (Lamszus et al., 2003). Die Therapie des Glioblastoms erfolgt standardmäßig mit Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie. Entscheidend für den Behandlungserfolg ist dabei, wie gut es dem Neurochirurgen gelingt, das Tumorgewebe während der Operation zu entfernen. Da es praktisch unmöglich ist, ein Glioblastom vollständig zu entfernen, folgt der Operation in aller Regel eine Strahlentherapie. Sie soll die schnell wachsenden Zellen zerstören und das umliegende gesunde Gewebe weitmöglichst schonen. Der Nutzen der Chemotherapie bei der Behandlung des Glioblastom wird unter Experten kontrovers diskutiert.

2.2 Zellmigration

Die Migration im Allgemeinen und im speziellen Fall die Tumormigration ist ein sehr komplexer und dynamischer Prozess, der multiple biologische Vorgänge einschließt. Dieser Vorgang kann in drei voneinander unabhängige, koordinierte biologische Abläufe unterteilt werden: 1. Die Zelladhäsion an viele verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM), die im Fall von Krebs Modifikationen in ihrer Zusammensetzung aufweist (Bellail et al., 2004; Belot et al., 2001; Giese et al., 1994; Gladson, 1999). 2. Die Eigenbewegung der Zelle, die die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts involviert (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Ridley, 2001), die hauptsächlich durch Modifizierungen der Integrin-ECM-Interaktionen hervorgerufen wird (Palecek et al., 1997; Suetsugu and Takenawa, 2003) 3. Die Invasion, die zur Degradierung der Matrixproteine durch proteolytische Enzyme, die vom Tumor freigesetzt werden, in erster Linie Serinproteasen, Cathepsine und Metalloproteinasen (Belien et al., 1999; Wehrle-Haller and Imhof, 2003), herbeigeführt wird. Damit eine Zelle wandern kann, muss sich ihr Zellkörper sowie ihre Form und Steifheit verändern, um mit der sie umgebenden ECM zu interagieren, die zum einen eine mechanische Barriere und zum

anderen eine Basis für die wandernden Zellen darstellt. Die ECM spielt in der Embryogenese und in der Entwicklung von Krebs eine wichtige Rolle. Alle nativen ECM-Proteine des Gehirns (Fibronectin, Laminin, Kollagen, Vitronectin und Tenascin) sind am perivaskulären Spalt lokalisiert, an welchem die invadierenden Gliomzellen bevorzugt entlang wandern. Studien zeigten, dass sich die Zusammensetzung der ECM bei invasiven Tumoren verändert (Giese et al., 1994; Rutka et al., 1988). Die molekulare Beschaffenheit der ECM in GBMs wurde von Gladson und Bellail ausführlich beschrieben (Bellail et al., 2004; Gladson, 1999).

Die Interaktionen zwischen Gliomzellen und den Bestandteilen der ECM werden durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Adhäsionsmoleküle werden nach ihrem funktionellen Verhalten klassifiziert, die durch die Aminosäuresequenz, den Rezeptor und den Liganden vermittelt werden. Sie können mindestens in vier Gruppen unterteilt werden: Integrine, Cadherine, Lektine und die Immunglobulin-Superfamilie (Juliano, 2002). Die Zellen interagieren mit der ECM über einen Adhäsionskomplex, der während der Migration wirksam wird. Dieser Komplex ist ein makromolekulares Gebilde, das aus Integrin-Rezeptoren und sowohl ECM als auch intrazellulären Elementen besteht (Belot et al., 2001; Bigner et al., 1995; Kurpad et al., 1995; Parsons et al., 2000; Petit and Thiery, 2000; Riva et al., 1999). Zu den bekanntesten intrazellulären Proteinen, die den dynamischen Adhäsionskomplex regulieren, zählen FAK (engl., focale adhesions kinase), Paxillin, Zyxin, Vinculin und Tensin (Belot et al., 2001; Bigner et al., 1995; Goldmann, 2002; Kurpad et al., 1995; Parsons et al., 2000; Petit and Thiery, 2000; Riva et al., 1999; Schaller, 2001). FAK ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die durch die integrinvermittelte Adhäsion an die ECM aktiviert wird. (Cary and Guan, 1999).

Diese Kinase ist am Migrationsprozess *in vitro* und *in vivo* beteiligt (Hauck et al., 2002). Deshalb kann in Gliomen mit Migrationstop eine reduzierte FAK-Aktivität nachgewiesen werden, so dass die FAK-Expression mit der Invasivität verschiedener Tumorarten gleichgesetzt werden kann (Obara et al., 2002). Zagzag und seine Kollegen konnten

nachweisen, dass invasive Gliomzellen eine Überexpression von FAK aufweisen (Zagzag et al., 2000b; Zagzag et al., 2000a).

2.3 Zellinvasion

Die Invasion beinhaltet die Degradierung der ECM durch zahlreiche Proteinasen. Durch diesen Vorgang entsteht eine intrazelluläre Lücke, die es invadierenden Zellen ermöglicht in das Gewebe einzuwandern. Dies geschieht mittels eines aktiven Mechanismus, der mit einer Rezeptorabnahme und der Reorganisation des Zytoskeletts einhergeht (Rao, 2003). Beteiligt am Prozess der Degradierung der ECM-Komponenten sind Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die in Gliomen überexprimiert werden. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass MMP-Inhibitoren einen deutlichen Rückgang der Invasivität in Gliomzellen hervorrufen (Tonn and Goldbrunner, 2003).

Ein weiteres Molekül mit Proteinaseaktivität, das mit einer verstärkten Invasion in Verbindung gebracht werden kann, ist Cathepsin-B, eine Cysteinprotease. Dieses lysosomale Enzym wird von Zellen freigesetzt. Cathepsin-B ist in Gliomzellen an der Oberfläche lokalisiert, wo es mit den angrenzenden Matrixproteinen interagieren kann (Demchik et al., 1999). Eine Überexpression von Cathepsin wurde sowohl in Biopsien von Gliompatienten als auch in Gliomzelllinien nachgewiesen (Rempel et al., 1994; Sivaparvathi et al., 1995). Mohaman und seine Kollegen bestätigten diese Beobachtungen in ihren Studien, wo sie durch eine Verringerung der Expression von Cathepsin-B in humanen Gliomzellen eine abgeschwächte Invasivität im Matrigel-Assay und in Kultur feststellen konnten (Mohanam et al., 2001). Einen ähnlichen Effekt hat die Arbeitsgruppe um Levicar beobachtet. Durch das Herabsetzen der Expression von L-Cathepsin wurde ein Rückgang der Invasivität und eine erhöhte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli herbeigeführt (Levicar et al., 2003).

2.4 Signalmoleküle des Migrations-/Invasionsprozesses

2.4.1 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Die Familie der MMPs besteht aus proteolytischen Enzymen, die in der Lage sind alle Moleküle der ECM zu degradieren (Woessner, Jr., 1991). Deshalb haben sie im Zusammenhang mit der Entstehung bösartiger Tumore und deren Metastasierung eine Schlüsselfunktion. Sie werden bei der Wundheilung aktiviert, um die ECM umzugestalten, Interaktionen mit der Zellmatrix zu knüpfen, inflammatorische Zellen zu rekrutieren, Zytokine zu aktivieren und die Angiogenese zu regulieren (Kahari and Saarialho-Kere, 1997; Sivak and Fini, 2002; Visse and Nagase, 2003). Die Familie der MMPs beinhaltet mehr als 25 Mitglieder, die aufgrund ihrer Struktur und Substratspezifität in verschiedene Gruppen unterteilt werden können: Erstens die Kollagenasen (MMP-1, -8, und -13), zweitens die Gelatinasen (MMP-2 und -9), drittens die Stromelysinen (MMP-3 und -10), viertens die Matrilysine (MMP-7 und -26) und fünftens die membrangebundenen MMPs (MMP-14 bis -17 und -24) (Gabison et al., 2005). Die erhöhte Expression der MMPs korreliert sehr stark mit der Tumorinvasion und der Metastasenbildung bösartiger Tumore. Zwei MMPs stehen in direktem Zusammenhang mit dem Metastasepotential einer Zelle: die 72kDa MMP-2 (Gelatinase A) und die 92kDa MMP-9 (Gelatinase B). Beide degradieren Kollagene, die Bestandteil der Basalmembran sind (Murphy et al., 1989). Allgemein gesprochen ist auch in anderen Krebsarten, die Metastasen ausbilden, ein erhöhter Grad an Gelatinase A und B im Vergleich zu nicht-metastasierende Zellen vorhanden (Liotta et al., 1980). In der Regel werden die Gelatinasen als inaktive Proenzyme exprimiert. Diese Expression ist von Wachstumsfaktoren und Zytokinen abhängig. Die enzymatische Aktivität wird durch extrazelluläre Faktoren reguliert und basiert hauptsächlich auf dem Verhältnis zwischen Proenzym-Aktivierung und -Inhibierung durch die Gewebeinhibitoren der MMPs (engl.,

tissue inhibitors of MMPs, TIMPs) von denen bisher vier bekannt sind (TIMP-1-4). TIMP-1, -2 und -4 sind lösliche Proteine während TIMP-3 mit der Matrix assoziiert ist. TIMP-1 und -2 fungieren als Inhibitoren aller aktiven MMPs, dagegen inhibieren TIMP-3 und -4 nur bestimmte MMPs. Des Weiteren formt TIMP-1 mit der pro-MMP-9 einen spezifischen Komplex. Dieser verhindert die Aktivierung der pro-MMP-9. TIMP-2 bildet ebenfalls einen Komplex mit der MMP-2 aus (Fassina et al., 2000). Neben der Inhibierung der MMPs haben TIMPs noch weitere Funktionen, wie z.B. das Induzieren oder das Hemmen von Apoptose in verschiedenen Zelltypen. Obwohl beide Proteasen strukturell und katalytisch ähnliche Eigenschaften aufweisen, ist ihre Genexpression unterschiedlich reguliert. Dies wird durch bestimmte regulatorische Elemente in der Promotorsequenz verursacht. Für die MMP-9 mRNA liegt diese regulatorische Region 670 Basenpaare vor dem Translationsstart, sie enthält Bindungsstellen für AP-1, NF κ B, PEA3 und SP1.

Es ist bereits von Troussard und ihren Kollegen (1999) beschrieben, dass GSK3 β durch die ILK (engl., Integrin Linked Kinase) phosphoryliert also inhibiert wird. Indirekt kommt es durch die Inhibierung von GSK3 β zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Troussard et al., 1999). AP-1 bindet an den Promotor der MMP-9 und induziert letztlich die Expression des Proteins (Troussard et al., 2000b).

2.5 Effektormoleküle oberhalb der MMPs

2.5.1 ILK-Struktur und Signalkaskade

Die ILK wurde 1996 im Yeast-Two-Hybrid System detektiert. Es ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die mit der β 1- und β 3-Integrin-Untereinheit interagiert (Hannigan et al., 1996). ILK besitzt definierte Domänen, wie die Kinase-Domäne, die Phosphoinositol-3-Phosphat (PIP3)-Domäne und am N-Terminus die Ankyrin-Wiederholungen (Abb.III.5).

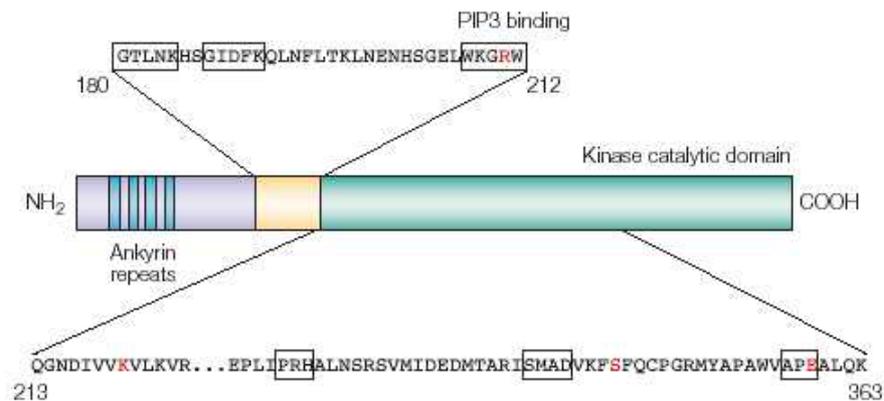


Abb. III.5 Schematische Darstellung der ILK (Hannigan et al., 2005).

ILK reguliert beispielweise das ECM-abhängige Zellwachstum und Überleben, die Zellentwicklung (Persad and Dedhar, 2003; Wu and Dedhar, 2001), die epithelial-Mesenchymaletransition (EMT), die Migration und Invasion (Oloumi et al., 2004), die Zellbewegung und -kontraktion, die Angiogenese (Friedrich et al., 2004; Vouret-Craviari et al., 2004) und die Tumorangio-genese (Kaneko et al., 2004; Tan et al., 2004).

Die ILK-Aktivität wird durch einen PI3K-abhängigen Mechanismus stimuliert, der durch die Adhäsion an die ECM und die Bildung von Multiproteinkomplexen, sowie durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren und Chemokinen reguliert wird. Ist diese Kinase einmal aktiviert, ist sie in der Lage, zahlreiche zelluläre Funktionen und Phänotypen zu beeinflussen, abhängig vom Zelltyp und der Zell- bzw. Gewebsumgebung. In normalen Zellen ist ILK nur vorübergehend aktiviert. Dagegen wird es in Krebszellen überexprimiert oder ist konstitutiv aktiv.

Die zahlreichen Signalwege der ILK sind in Abbildung III.6 schematisch dargestellt. Der Fokus soll jedoch auf den mittleren Teil des Schemas gerichtet sein. ILK ist in der Lage, AKT zu phosphorylieren. Dieses Überlebenssignal hemmt die Aktivität der Caspase-3 oder aktiviert den nuklearen Faktor- κ B (NF- κ B), der wiederum das Protein COX-2 (Cyclooxygenase-2) stimulieren kann, das bei der Krebsentwicklung wie z.B. der Invasion

oder Angiogenese eingreift. Des weiteren führt die Aktivierung von ILK zur Inhibierung von GSK3 β , was wiederum die Transkriptionsfaktoren AP-1 und β -Catenin/TCF stimuliert und letztlich zur Aktivierung der MMP-9 und Cyclin D1 führt. Eine Überexpression von ILK stimuliert die Expression des E-Cadherin-Suppressors SNAI1, das zum epithelial-mesenchymalen Übergang der Zelle führt und die Invasion sowie auch die Metastasierung vereinfacht.

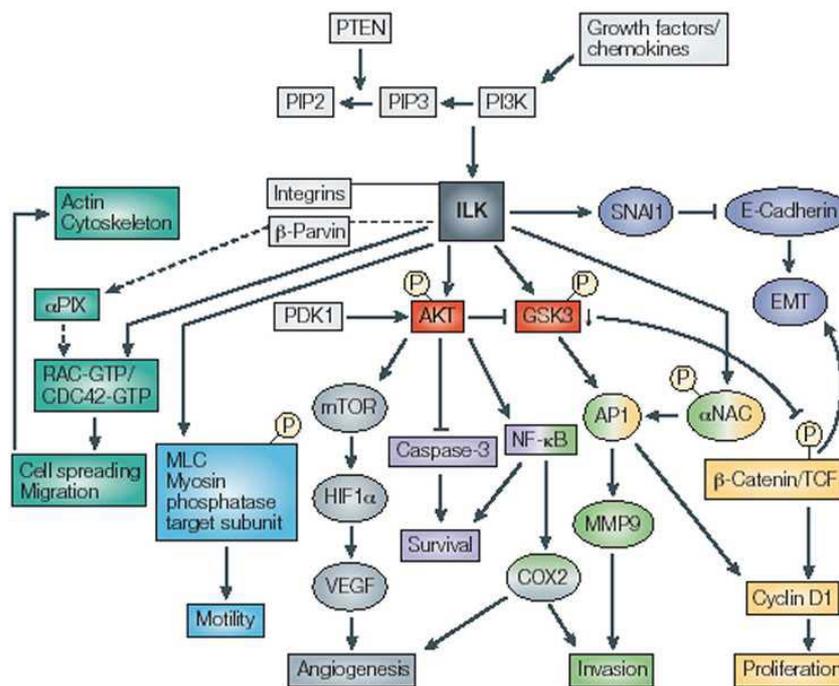


Abb.III.6 ILK-vermittelte Signalkaskaden (Hannigan et al., 2005)

2.5.2 Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK3)

Die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK3) ist eine multifunktionelle Serin-/Threonin Kinase, die in Eukaryoten ubiquitär exprimiert wird (Embi et al., 1980; Woodgett, 1990). Biochemisch gesehen hat GSK3 eine sehr hohe basale Aktivität. Reguliert wird die Kinaseaktivität einerseits durch Phosphorylierung unterschiedlicher Aminosäurereste und andererseits durch die Bildung von Proteinkomplexen bzw. durch die Lokalisierung in der Zelle. Es liegen zwei

Isoformen der GSK3 vor: GSK3 α und GSK3 β . GSK3 β wird hauptsächlich im ZNS exprimiert, wo es für Neuronen spezifisch ist. GSK3 β ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. der Wnt-Signalkaskade, der Mikrotubulodynamik, der Axon-Dendriten-Polarität, der Astrozyten-Migration sowie dem Migrationsprozess von Glioblastomzellen (Doble and Woodgett, 2003; Etienne-Manneville and Hall, 2003; Jiang et al., 2005; Troussard et al., 1999; Troussard et al., 2000a).

2.5.3 β -Catenin

β -Catenin ist ein 92kDa Protein, das neben seiner Schlüsselfunktion im Wnt-Signalweg, zusammen mit α -Catenin und γ -Catenin, als eines der ersten Proteine isoliert werden konnte, das mit dem zytoplasmatischen Teil von Typ I-Cadherinen interagiert. Diese werden durch die Bindung von α - und β -Catenin an das Aktin-Zytoskelett gebunden. Somit ist β -Catenin an der Zell-Zell-Adhäsion der Plasmamembran beteiligt und für die epitheliale Architektur verantwortlich. Geht diese Interaktion verloren, wie z.B. bei der Carzinogenese verschiedenster Krebsarten, führt dies zu einem invasiveren Phänotyp.

In der Wnt-Signalkaskade wird die Stabilität des zytoplasmatischen β -Catenins durch einen Multiproteinkomplex reguliert. Dieser Multiproteinkomplex besteht aus dem Tumorsuppressor APC (engl., adenomatous polyposis coli), Axin, sowie den beiden Kinase CKI I (engl., casein kinasen I) und GSK3 β , die ein Set an konservierten Serin-/Threonin-Resten am N-Terminus von β -Catenin phosphorylieren. Dadurch erhält β -Catenin eine Markierung, die von der Ubiquitin-Ligase erkannt wird und zum Abbau im Proteasom führt. Nach der Rezeptorstimulierung löst sich Axin aus dem Multiproteinkomplex, wandert an die Zellmembran und interagiert mit dem Rezeptor Lrp5/6 oder dem Bindungsmolekül Dishevelled. Dadurch kommt es zur Inhibierung von GSK3 β , so dass β -Catenin nicht mehr

für den proteasomalen Abbau markiert werden kann und deshalb im Zytoplasma akkumuliert. Anschließend wandert es in den Nukleus, wo es an die Familie der T-cell factor/lymphoid enhancing factor- (Tcf/Lef) Transkriptionsfaktoren bindet und die Transkription verschiedener Gene aktiviert.

3. Ziel der Arbeit

Mit dieser Arbeit soll die Funktion des vorhandenen Todesrezeptors CD95 in Glioblastomzelllinien untersucht werden, die resistent gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose sind. Wie sich die Stimulierung des CD95-Rezeptors auf die Migrationssignalkaskade in Glioblastomzellen auswirkt, wird im ersten Teil der Arbeit mit etablierten Glioblastomzelllinien untersucht. Nach der Überprüfung der Sensitivität gegenüber CD95-induzierter Apoptose und der Expression des CD95 und CD95L wird eine resistente Zelllinie (T98G) und eine sensitive Zelllinie (LN18) mit vergleichbarer CD95-Oberflächenexpression für die folgenden Versuche eingesetzt.

Die Migration wird mit zwei *in vitro* Modellen untersucht, zum einen dem zweidimensionalen Boydenassay und zum anderen das dreidimensionale Spheroidmodell.

Spezifische Inhibitoren sowie lentivirale Konstrukte werden im Migrationsassay für die Untersuchung der Signalkaskade unterhalb des CD95 eingesetzt.

Im zweiten Teil der Arbeit soll ein physiologischeres Modell zum Einsatz kommen. Es werden parallel etablierte Zelllinien mit Zelllinien von Glioblastompatienten aus der Kopfklinik Heidelberg verglichen. Zuerst werden die Zelllinien der Glioblastompatienten auf die Expression und Funktion des CD95/CD95L-System getestet, anschließend werden die Zellen ausgewählt, die einen resistenten Phänotyp gegen CD95-vermittelte Apoptose zeigen, entsprechend der T98G-Zellen. Um der Studie eine klinische Relevanz zukommen zu lassen, werden im letzten Abschnitt die Folgen der therapeutischen Bestrahlung auf das Migrationsverhalten untersucht. Therapeutische Bestrahlung induziert die Expression des CD95/CD95L-Systems. Unsere Hypothese ist, dass die Hochregulierung dieses Systems in apoptoseresistenten Zellen zum Anstieg der Migration/Invasion führt.

IV. Material und Methoden

1. Material

1.1. Zelllinien

Name	Zelltyp	Quelle
LN18	Glioblastom (human)	Roth, DKFZ Heidelberg
T18G	Glioblastom (human)	Roth, DKFZ Heidelberg
A172	Glioblastom (human)	ECACC European collection of cell cultures
SH-SY5Y	Neuroblastom (human)	Prof. Beyreuter, ZMBH Heidelberg
NCH	Zelllinien kultiviert von Hirntumorpatienten	Dr. Christel Herold-Mende Universitätsklinik Heidelberg Abteilung Neurochirurgie, Deutschland

1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie

10x Minimal Essential Medium (MEM)

25% Ammoniak

96% Ethanol

Aceton

Acrylamid 30%

Quelle

Gibco, Deutschland

J.T. Baker

Riedel de Haen, Deutschland

Riedel de Haen, Deutschland

Roth, Deutschland

Ammoniumpersulfat	Merck, Deutschland
B27 Supplements	Gibco, Deutschland
Borsäure	Merck, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Deutschland
BSA	Sigma, Deutschland
Chloroquine	Sigma, Deutschland
DMEM	Gibco, Deutschland
ECL	Perkin Elmer
EDTA	Sigam, Deutschland
ERK-Inhibitor (PD 98059)	Calbiochem
Ethanol absolut	Riedel de Haen, Deutschland
Fish skin gelatin	Sigma, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Deutschland
Gelatine	Merck, Deutschland
Glycerol	Roth, Deutschland
Hanks's Balanced Salts (HBSS)	Gibco, Deutschland
HCl	Merck, Deutschland
HEPES	Sigma, Deutschland
ILK-Inhibitor (KP-SD1)	s.Dedhar (Canada)
Kaliumchlorid	Merck, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Kollagen (Vitrogen)	Nutacon
Leucin Zipper (LZ)-CD95L	Inna Lavrik, Dagmar Ries, Cecilia Zuliani
L-Glutamin	Gibco, Deutschland
Magermilchpulver	Roth, Deutschland

Magnesiumchlorid	Merck, Deutschland
Methanol	Riedel de Haen, Deutschland
NaCl	Merck, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Natriumpyruvat	Gibco, Deutschland
Natrium-Tetraborat (Borax)	Sigma, Deutschland
Non essential amino acids	Gibco, Deutschland
NP-40	Roche, Deutschland
Oligonukleotide	MWG, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Deutschland
Penicillin/Streptavidin	Gibco, Deutschland
PI3 Kinase Inhibitor (LY 294002)	Cell Signaling, Beverly, MA
PI3Kinase-Inhibitor (LY 290059)	Calbiochem
PMSF	Sigma, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma, Deutschland
Polypren	Sigma, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma, Deutschland
Protease inhibitor (complete)	Roche, Deutschland
Retinsäure	Sigma, Deutschland
RPMI	Gibco, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deutschland
TEMED	Sigma, Deutschland
Tris-Base	Sigma, Deutschland
Triton X-100	Merck, Deutschland

Trypsin/EDTA	Gibco, Deutschland
Tween 20	Merck, Deutschland
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂	Acros, Deutschland
X-Omat films	Kodak, Deutschland

1.3 Antikörper

monoklonale Antikörper:

Antikörper	Firma	Verdünnung
Anti-APO-1 (IgG3)	Trauth et al., 1989	5µg IP
Anti-GSK3β (monoclonal)	Santa Cruz, Deutschland	1:1000 IB
Anti-human-CD95L NOK-1 (Fas-L, Apo-1-L) (monoclonal)	Pharmingen, Deutschland	2-10µg (blocking experiments)
Anti-phospho-ERK (monoclonal)	Santa Cruz, Deutschland	1:1000 IB
Anti-phospho-GSK3α/β Tyr279 (monoclonal)	Affinity Bioreagents, Deutschland	1:1000 IB
Anti-PED (monoclonal)	Dr. Herve Chneiweiss, College de France, Paris, Frankreich	1:2000 IB
FII23c (IgG3) Isotyp	Trauth et al., 1989	5µg IP
Hamster IgG Isotyp Kontrolle	Pharmingen, Deutschland	2-5µg (blocking experiments)

Polyklonale Antikörper:

Antikörper	Firma	Verdünnung
Anti-AKT (polyclonal)	Cell Signaling, Beverly, MA	1:1000 IB
Anti-Caspase-8 (C15) (IgG2b)	(Scaffidi et al., 1997)	1:10 IB
Anti-cleaved Caspase-3 Asp 175 (polyclonal)	Cell Signaling, Beverly, MA	1:500 IB
Anti-ERK2 (polyclonal)	Santa Cruz, Deutschland	1:1000 IB
Anti-phospho- GSK3 α/β Ser-9 (polyclonal)	Cell Signaling, Beverly, MA	1:1000 IB
Anti-phospho-AKT Ser 473 (polyclonal)	Cell Signaling, Beverly, MA	1:1000 IB

Zweitantikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung
Anti-IgG2b HRP (Ziege polyclonal)	Southern Biotechnology, Birmingham, USA	1:20000 IB
Anti-Mouse-HRP	Santa Cruz, Deutschland	1:5000-1:10000 IB
Anti-Mouse-Rhodamine	Dianova, Deutschland	1:200 IF
Anti-Rabbit-HRP	Santa Cruz, Deutschland	1:5000-1:10000 IB
Anti-Rabbit-Rhodamine	Dianova, Deutschland	1:200 IF
Goat-anti-mouse-PE	Dianova, Deutschland	1:300 FACS

1.4 Kits

BCA Bestimmung der Proteinkonzentration	Pierce, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Nucleobond Giga Kit	Macherey und Nagel, Deutschland
Nucleobond Maxi Kit	Macherey und Nagel, Deutschland
PCR Core Kit	Eurogentec, Deutschland
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Deutschland
RT-PCR Kit	Applied Biosystems, Deutschland

1.5 Plasmide und Vektoren

Plasmid	Quelle
pEIGW	Till Wenger
pEIGW-SK Forw.	Stefan Klussmann
pEIGW-SK Forw. GSK-3 β S9A (#276)	Stefan Klussmann
pcDNA 3.1 hCD95L wt	Labor Prof.Dr.P-H. Krammer

1.6 Primer

Gen	Primer	Sequenz
B-actin	forward	5'- ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC GA-3'
	reverse	5'- CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'
	Probe	5'- ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT-3'
MMP-2	forward	5'- GGA CAC ACT AAA GAA GAT GCA GAA GT-3'
	Reverse	5'- CGC ATG GTC TCG ATG GTA TTC-3'
	Probe	5'- AGT GCC CCA GCA AGG TGA TCT TGA CC-3'
MMP-9	forward	5'- GAT CCA AAA CTA CTC GGA AGA CTT G-3'
	reverse	5'- GAA GGC GCG GGC AAA-3'
	Probe	5'- CGC GGG CGG TGA TTG ACG AC-3'
CD95	forward	5'- ACT GTG ACC CTT GCA CCA AAT-3'
	reverse	5'- GCC ACC CCA AGT TAG ATC TGG-3'
	Probe	5'- AAT CAT CAA GGA ATG CAC ACT CAC CAG CA-3'
CD95L	forward	5'- AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC-3'
	reverse	5'- AAA GCA GGA CAA TTC CAT AGG TG-3'
	Probe	5'- TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG G-3'

1.7 siRNA-Sequenzen

PED	Sense-Sequenz	5'- GCG AAA AGA GUG AGG AGA Utt-3'
	Antisense-Sequenz	5'- AUC UCC UCA CUC UUU UCG Ctg-3'
Kontroll siRNA	Sense-Sequenz	5'- CCU GCA GUA CUU CAA GCG GdTdT-3'
	Antisense-Sequenz	5',- dTdTGCA CGUbcAU GAA GUU CGC C-3,

2. Puffer und Lösungen

2.1 Zellkultur

DMEM 10% FCS für 293T Zellen

FCS	50ml
L-Glutamine (200mM)	5ml
Penicillin/Streptavidin	5ml
HEPES	5ml
DMEM	add 500ml
steril filtrieren	

MEM-F12 (1:1)

MEM	217.5ml
F12	217.5ml
FCS	50ml
Non essential AA	5ml
L-Glutamine (200mM)	5ml
Penicillin/Streptavidin	5ml
steril filtrieren	

DMEM 10% FCS für LN18 und T98G

Penicillin/Streptavidin	5ml
FCS	50ml
DMEM	Add 500ml
steril filtrieren	

DMEM 10% für A172-Zellen

Penicillin/Streptavidin	5ml
L-Glutamine (200mM)	5ml
FCS	50ml
DMEM	add 500ml
steril filtrieren	

Kollagengel (2mg/ml)

Kollagen (3mg/ml)	8ml
10x MEM	1ml
0,1M NaOH	1ml
auf Eis pipettieren	

Kollagenlösung (50µg/ml)

Kollagen (3mg/ml)	100µl
NaHCO ₃ (5,5%)	6ml
steril filtrieren	

Gelatine 0.1%

Gelatine	0.1g
dH ₂ O	100ml

2.2 ZelltransfektionHBS

NaCl (5M)	11.24ml
HEPES (1M)	20ml
Na ₂ HPO ₄ (100mM)	3ml
dH ₂ O	165.76ml
pH	7.10-7.13
steril filtrieren	

CaCl (2.5M)

CaCl	5.55g
dH ₂ O	add 20ml
steril filtrieren	

2.3 Durchflusszytometrie

Nicoletti-Puffer

Natriumcitrat	0.1% (w/v)
Triton-X-100	0.1% (w/v)
Propidiumiodid	50µg/ml

PBS 2%FCS

PBS	50ml
FCS	1ml

FACS-Fix

PBS	500ml
1% PFA Endkonzentration	

2.4 Immunozytochemie

10x PBS

NaCl	80g
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	11.5g
KH ₂ PO ₄	2g
KCl	2g
H ₂ O	add 1000ml

PBS/Triton-X-100

PBS (1x)	100ml
Triton-X-100	200µl

Blockierlösung

FCS	20g
BSA	20g
Fischhaut Gelatine	2g
PBS	add 1000ml

2.5 Proteinextraktion

0.2% SDS

SDS (10%)	2ml
dH ₂ O	100ml

Für die Proteinextraktion werden frische Proteinaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren zugesetzt.

2.6 Western Blot

PBS/Tween

PBS (1x)	1000ml
Tween 20	1ml

Lauf-Puffer

Tris-Base	20g
Glycin	60.55g
SDS	300g
H ₂ O	add 2000ml

Transfer Puffer

Tris	6g
Glycin	28.8g
Methanol	400ml
H ₂ O	add 2000ml

Lower Tris Puffer (4x)

Tris Base	181.7g
10% SDS	40ml
HCl	135ml
H ₂ O	add 1000ml

Upper Tris Puffer (4x)

Tris Base	60.6g
10% SDS	4ml
H ₂ O	add 1000ml

Probenpuffer

TrisHCl (1M) pH 6.8	12.5ml
Glycerol	20ml
β-Mercaptoethanol	10ml
10% SDS	40ml
Bromphenol blau	5mg
H ₂ O	add 100ml

Stripping Puffer

β-Mercaptoethanol	234μl
10% SDS	6ml
TrisCl (1M) pH 6.8	3.75ml
H ₂ O	add 50ml

Laufgel 10ml

Reagenz	10%	12%	15%
dH ₂ O	4.1	3.5	2.5
Lower Tris	2.5	2.5	2.5
Acrylamid 30%	3.4	4	5
Temed	10	10	10
APS 10%	100	100	100

Sammelgel 10ml

Reagenz	Volumen
dH ₂ O	6.35
Upper Tris	2.5
Acrylamid 30%	1.15
Temed	10
APS 10%	100

2.7 Ausstattung und Geräte

Autoradiografie Kassette	Rego, Deutschland
Elektrophorese Power Supply Consort 865	Renner
FACS Calibur	Beckton Dickinson, Deutschland
Film-Entwicklungsmaschine Curix 160	Agfa-Gevaert
Mikroskop	Olympus, Deutschland
SDS Page Apparatur	Biorad, Deutschland
Stericult Incubator	Forma Scienfitic, Deutschland
Sterile Werkbank	Heraeus, Deutschland
Steritop Filter	Millipore, Deutschland
Tischzentrifuge, Zellzentrifuge	Heraeus, Deutschland
Ultrazentrifuge	Sorvall

3. Methoden

3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung höherer Zellen erfordert sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien, Hefen oder Pilzen zu vermeiden. Deshalb führt man alle Arbeiten mit Zellen und Zelllinien an speziell dafür vorgesehenen sterilen Arbeitsplätzen durch. Die zusätzliche Verwendung von gammabestrahlten Zellkulturmaterialien wie Kulturschalen, Kulturflaschen, Pipetten und Zentrifugenröhrchen ist ein weiterer Schutz vor Kontaminationen.

Die Zellen werden in folgenden Medien kultiviert:

DMEM, 10% FCS, 1% PS: LN18, T98G, A172, 293T, NCH

MEM-F12 10%FCS, 1% non-essential Aminoacids, 1% L-Glutamin, 1% PS: SH-SY5Y

Die Zellen werden im CO₂-Inkubator bei 90% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO₂ gehalten.

3.2 Spheroidkulturen

Spheroide sind Anhäufungen von Krebszellen mit deren Hilfe das Migration- und Invasionsverhalten beobachtet werden kann. Die Herstellung von Spheroide erfolgt durch die „hängende Tropfen Methode“ (engl., hanging drop). Dabei werden die Glioblastom Zelllinien T98G und LN18 verwendet. Die Zellen werden nach Entfernen des Mediums mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauerzählkammer wird die Zellzahl ermittelt. $2 \times 10^4 - 3,5 \times 10^4$ Zellen pro 20µl werden in einem Tropfen kopfüber hängend an den Deckel einer Petrischale (Ø 10cm) pipettiert. Die Petrischale wird mit 10ml dH₂O gefüllt damit die Tropfen nicht austrocknen. Nach 24-48 h bilden sich Zellaggregate, die in 10ml Medium in eine mit 2% Agar beschichtete Petrischale überführt werden. Diese bilden innerhalb der nächsten 24-48 h dichte Spheroide, die dann im Kollagen-Invasions-Assay eingesetzt werden können.

3.3 Kollagen-Invasions-Assay

Im Kollagen-Invasions-Assay kann in einer dreidimensionalen Matrix das Invasions- und Migrationsverhalten von Tumoren und Sphroiden untersucht und verfolgt werden. Dazu wird ein Gel aus Kollagen wie folgt hergestellt. Eine kalte Kollagenlösung (Vitrogen[®] 3mg/ml, TypI) wird mit kaltem 10fach konzentriertem MEM und kalter 0,1M Natronlauge zu einer Endkonzentration von 2,4 mg/ml vermischt. Nach Einstellen des pH-Wertes wird die Kollagenlösung auf eine 96 Lochplatte verteilt (0,1ml/well). Ein bis zwei Spheroid(e) werden in jedem Loch platziert, anschließend kommen die Platten in einen Brutschrank, damit das Kollagen polymerisieren kann, was zwischen 30 und 60 Minuten in Anspruch nimmt. Im folgenden Schritt werden die Gele mit der gleichen Menge an Medium überschichtet und die Platten kommen in den CO₂-Inkubator bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit.

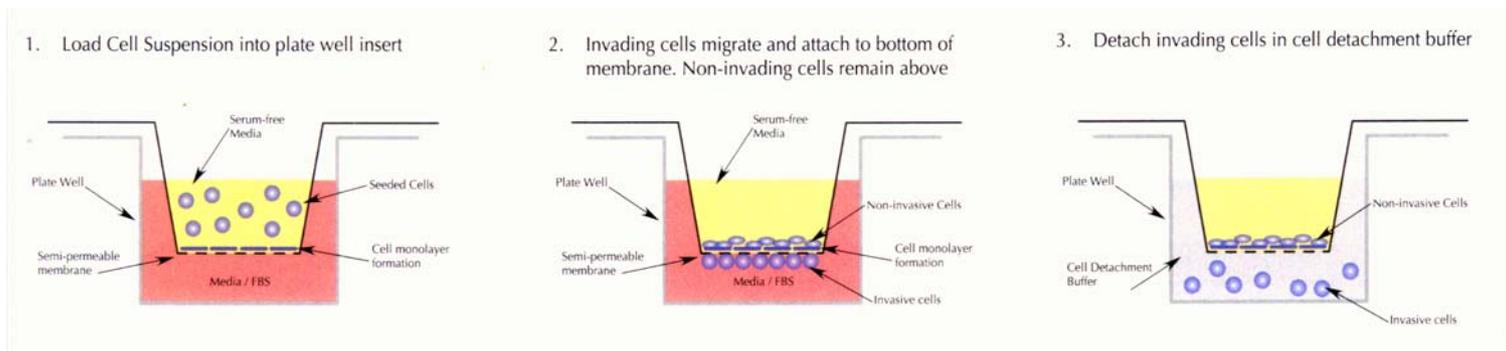
Die Zellinvasion wird über eine Zeitspanne von 1-5 Tagen verfolgt. Die Spherioide werden in dieser Zeit mit unterschiedlichen Reagenzien behandelt. Um sicher zu gehen, dass die Substanz das Spheroid erreicht, beginnt die Behandlung bereits eine Stunde vor der Kultivierung in der dreidimensionalen Matrix. Die Substanz wird dann ebenfalls dem Medium zugesetzt. Als Reagenzien werden eingesetzt: LZ-CD95L (1µl/ml); Nok1 (50ng) und anti-Apo-1 (2µg/ml). Die Spherioide werden über ein Zeitintervall von 48 h beobachtet.

3.4 Nachweisverfahren der Zellmigration

Um das Migrationverhalten der etablierten Glioblastomzelllinien LN18 und T98G, sowie der aus Patientenmaterial gewonnenen Glioblastomzelllinien NCH im zweidimensionalen Raum zu studieren, werden die Zellen auf Kollagen beschichteten „Boyden-Chambers“ ausplattiert. Neben Kollagen verwendet man auch Matrigel oder Bestandteile wie Fibronectin, die die extrazelluläre Matrix simulieren sollen. Die „Boyden-Chambers“ sind „Transwells“, die eine 8µm porige Membran besitzen und in eine 24-Lochplatte eingesetzt werden, allerdings müssen sie zuerst beschichtet werden. Dazu wird eine Kollagenlösung (50µg/ml) mit

Carbonatpuffer hergestellt und auf die „Transwells“ verteilt. Zum Polymerisieren kommen die Platten über Nacht bei 37°C in den CO₂-Inkubator. Nach dieser Inkubation wird das restliche Kollagen abgesaugt, die Einsätze zweimal kurz mit HBSS gewaschen bevor die Zellen ausplattiert werden. Pro Einsatz werden 5×10^4 Zellen ausplattiert, nach 4 h werden die Zellen mit den gleichen Reagenzien und der gleichen Konzentration wie beim Invasions-Assay behandelt. Die Migration wird über einen Zeitraum von 48 h verfolgt. Die migrierten Zellen sammeln sich am Boden der 24-Lochplatte und können in der Neubauerkammer gezählt werden. Die Zellzahl wird als totale Zahl migrierter Zellen dargestellt.

Abb. IV.1 Schematische Darstellung des Migrationsassay (Chemicon Katalog 2005)



3.5 γ -Bestrahlung von Zellen

Die Glioblastomzelllinien T98G und A172 sowie die aus Patientenmaterial gewonnenen Glioblastomzelllinien NCH 89, 125 und 270 werden mit unterschiedlichen γ -Strahlendosen (1, 3 und 10 Grey) bei RT behandelt. Die Strahlenquelle ist ein Gammacell 1000D Atomic Energy/Canada, Ltd., ON (¹³⁷Cs 10,23 Grey/min). Direkt nach der Bestrahlung wird jeweils die Hälfte jedes Ansatzes mit Nok1 (10 μ g) behandelt. Die Zellen werden nach 24 h auf Migrationsplatten ausplattiert bzw. für die RNA Extraktion gesammelt.

3.6 Nachweisverfahren zur Apoptosemessung

Der Apoptosassay detektiert kondensierte DNA, wie sie klassisch im Fall von Apoptose auftritt. Um Apoptose auszulösen werden die einzelnen Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen von LZ-CD95L (5ng/ml), anti-Apo-1 (2µg/ml bzw. 0.1µg/ml + ProteinA) und Staurosporin (1µM) behandelt. Nach 24 und 48 h werden die Zellen abgelöst und mit 70% Ethanol für mindestens eine Stunde bei -20°C fixiert. Die Zellen können in Ethanol monatelang gelagert werden. Die fixierten Zellen werden abzentrifugiert (3.000rpm) und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend, werden die Zellen in Propidiumiodidlösung resuspendiert und für mindestens eine Stunde oder über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die gefärbten Zellen werden am Durchflusszytometer in der Fluoreszenz 3 (FL3) gemessen. Staurosporin ist ein zytotoxisches Reagenz das Apoptose auslöst und somit als Positivkontrolle fungiert. Um sicher zu gehen, dass der Effekt des LZ-CD95L spezifisch ist, wird ein neutralisierender Antikörper gegen CD95L verwendet (Nok1, 50ng). Dieser wird mit dem LZ-CD95L präinkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben.

3.7 Antikörperfärbung für das Durchflusszytometer (engl., Fluorescence activated cell sorter FACS)

Circa 1×10^5 Zellen werden abgelöst und abzentrifugiert, das Pellet wird einmal mit PBS/2%FCS gewaschen und in selbigem in 100µl aufgenommen. Die Zellen werden mit dem Antikörper (anti-Apo-1, 1:100) für 15-20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS/2%FCS gewaschen und wiederum in 100µl PBS/2%FCS aufgenommen. Im letzten Färbeschritt werden 3µl des Zweitantikörpers (anti-goat-PE) zu den 100µl Zellsuspension pipettiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nun folgt noch ein dreifacher Waschschrift bevor die Zellen im FACS gemessen werden können. Als Färbekontrollen werden zum einen ungefärbte Zellen für die Einstellung des FACS- Gerätes und zum anderen eine Probe, die nur mit dem zweiten Antikörper gefärbt wird, verwendet.

3.8 Immunozytochemie

5×10^4 T98G-Zellen werden auf Zwei-Loch-Objekträger ausplattiert. Nach entsprechender Behandlung werden die Zellen mit 4%-iger Paraformaldehydlösung für 15 Minuten fixiert. Anschließend wird dreimal mit mit PBS gewaschen. Nach 10 minütiger Behandlung mit 50mM Amoniumacetat und 5 minütiger Permeabilisierung mit 0,2% Triton-X-100/PBS wird nochmals dreimal mit PBS gewaschen. Die Blockierung erfolgt mit Blockierungslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Der erste Antikörper kann direkt im Anschluß in 10% Blockierlösung/PBS auf die Zellen gegeben und eine Stunde bei RT inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird der zweite Antikörper in PBS für 45 Minuten bei RT inkubiert. Der zweite Antikörper ist an ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so dass die Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit und dreimaligem waschen direkt mit Mowiol eingedeckt und bei -20°C gelagert werden.

3.9 Transfektion von Zellen

3.9.1 Lipofectamine™2000

Mit Hilfe des Lipofectamine™2.000 Transfektions-Kits der Firma Invitrogen werden die eukaryotischen Zelllinien (LN18 und T98G) transient transfiziert.

Die Zellen werden am Vortag so ausplattiert, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 90-95% konfluent sind. Die Zellen werden in serum- und antibiotikum-freien Medium transfiziert.

Das DNA (μg): Lipofectamine™2.000 (μl) Verhältnis sollte für die Komplexbildung 1:2 oder 1:3 sein, um $0,5-2 \times 10^5$ Zellen in einer 24 Lochplatte zu transfizieren, benötigt man $0,8-1\mu\text{g}$ DNA und $2-3\mu\text{l}$ Lipofectamine™2.000. Ein Mediumwechsel nach der Transfektion ist nicht erforderlich. Die Transfektionseffizienz kann 24 bzw. 48 h später überprüft werden.

3.9.2 Kalzium-Phosphat-Methode

293T Zellen werden einen Tag vor der Transfektion auf 80-90% Konfluenz gesplittet. 2x HBS wird abgetaut und anschließend wird der HBS/DNA/CaCl₂ Komplex vorbereitet. Pro 10cm Petrischale wird ein Volumen von 1ml benötigt, dieses setzt sich 1:1 aus der DNA (10µg), 2M CaCl₂ (61µl) und dH₂O zu einem Teil und zum zweiten Teil aus 0,5ml HBS zusammen. Das CaCl₂/DNA Gemisch wird unter starker Blasenbildung mit HBS gemischt. Das DNA-Gemisch wird in die Zellkulturflaschen zu DMEM-FCS-25µM Chloroquine gegeben und über Nacht inkubiert. Die Transfektionseffizienz wird nach 24-48 h überprüft.

3.10 Produktion des LZ-CD95L

293T Zellen werden (6-8 x 10⁶ Zellen) auf Gelatine (0,1%, 20 Minuten) beschichtete (T150) Zellkulturflaschen ausplattiert. Am folgenden Tag werden sie mit der Kalzium-Phosphat-Methode transfiziert, unter Verwendung von 45µg DNA (15µg 409-LZCD95, 15µg 409-CrmA, 15µg 409-BV-p35). Die Zellen werden für 72 h bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert. Nach dieser Zeit wird der Überstand, der den LZ-CD95L enthält, gesammelt, steril filtriert und in Aliquots bei -80°C gelagert. Die Standardisierung erfolgt zum einen durch die Messung der Todesaktivität des LZ-CD95L sowie im Western Blot durch die Phosphorylierung von GSK3β.

3.11 Lentivirus Produktion (erfolgt unter S2-Bedingungen)

293T Zellen werden (6-8 x 10⁶ Zellen) auf Gelatine (0,1%, 20 Minuten) beschichtete (T150) Zellkulturflaschen ausplattiert. Am folgenden Tag werden sie mit der Kalzium-Phosphat-Methode, unter Verwendung von 40µg Transfer Vektor, 26µg pCMVΔR89.1 Hilfsplasmid und 14µg pDM.2 Hüllplasmid, transfiziert. Das DNA-Gemisch wird in die Zellkulturflaschen zu DMEM/FCS Chloroquine (25µM) gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wird das Medium durch frisches Medium ersetzt.

Der Überstand, der den Virus enthält wird nach 48 bzw. 72 h gesammelt, steril filtriert (0,22µm) und mit Hilfe der Ultrazentrifugation (2 h 20 Minuten, 20.000rpm, SW28 Beckman Rotor) ankonzentriert. Das Pellet wird in 60µl PBS/1%BSA resuspendiert in ein 1,5ml Reaktionsröhrchen überführt und unter ständigem Rotieren über Nacht bei 4°C vollständig gelöst. Die Suspension wird bei -80°C in Aliquots tiefgefroren und kann jetzt für die Titerbestimmung eingesetzt werden.

Die Transfektionseffizienz wird nach 48-72 h, im FACS überprüft. Dazu werden die Zellen mit PBS abgelöst 250µl Zellsuspension werden mit 250µl FACS-Fix gemischt und können dann sofort gemessen werden. Die Absorption des Green Fluoreszenz Protein (GFP) wird in der Fluoreszenz 1 gemessen.

3.12 Titerbestimmung

Eine Titerbestimmung des Überstandes ist notwendig, um die Konzentration an viralen Partikeln zu bestimmen. 293T Zellen werden auf 24-Lochplatten ausplattiert (5×10^4 Zellen), am nächsten Tag werden die Zellen in einem Loch gezählt um die Ausgangszellzahl vor der Titerbestimmung zu bestimmen. Der gefrorene Überstand wird abgetaut und 1:100 in Medium verdünnt. Von dieser 1:100 Verdünnung werden 1µl, 10µl und 100µl pro 1ml Medium auf die einzelnen Löcher der 24-Lochplatte pipettiert. Die Zellen werden mit dem Virusüberstand 72 h inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit löst man die Zellen mit Trypsin ab. Nach der Zentrifugation (3.000rpm, 5 Minuten) wird das Pellet in FACS-Fix aufgenommen und mit dem FACS der Prozentsatz der infizierten Zellen bestimmt.

Die Prozentzahl der positiven Zellen wird mit der Ausgangszellzahl unter Berücksichtigung der Verdünnung multipliziert. Bsp.: 1×10^5 Zellen Ausgangszellzahl, 12% GFP positiv, 1:100.000 Verdünnung.

$X = 1 \times 10^5 \times 0,12 \times 10^5$ X entspricht in diesem Beispiel der Anzahl von Viruspartikeln /ml.

Hat man die Viruspartikel/ml bestimmt, kann nun das Volumen bestimmt werden, dass für eine Zellinfektion eingesetzt werden soll.

3.13 Infektion eukaryotischer Zellen mit lentiviralen Konstrukten

Die Infektion der Zellen läuft prinzipiell genau wie die Titerbestimmung ab, der Unterschied besteht lediglich in der definierten Menge an Viruspartikeln, die auf die Zellen gegeben wird. Mit einer sogenannten MOI (engl., multiplicity of infectious particles) werden die Zellen infiziert, die MOI kann von Zelllinie zu Zelllinie sehr unterschiedlich sein und muß deshalb für jede einzeln ausgetestet werden. Eine MOI 5 bedeutet, dass fünf Viruspartikel eine Zelle infizieren. Aufgrund des zuvor bestimmten Virustiters kann nun das genaue Volumen berechnet werden, das einer MOI von 5 entspricht.

Die Zelllinien werden mit dem lentiviralen Vektor pEIGW und einer MOI von 5 infiziert. Der Austausch der eGFP-Sequenz zwischen dem EF1 α -Promotor und dem WPRE-Element durch eine IRES2-eGFP-Kassette wurde in dem ipWPTS-eGFP-Vektor (bereitgestellt von D.Trono, Genf, Schweiz) vorgenommen. Ein rekombinanter lentiviraler Vektor pEIGW-HA-GSK3 β S9A wird unter Verwendung von pcDNA3.1 HA-GSK3 β S9A (bereitgestellt von Trevor C. Dale) konstruiert. Dieser Vektor enthält eine konstitutiv-aktive Mutante von GSK3 β , die eine Serin-Alanin Substitution am Rest 9 enthält (GSK3 β S9A). Unsere Infektionsmethode basiert auf weit verbreiteten Methoden (Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1998). Das Transgen wird in allen infizierten Zellen über die Expression des GFP Proteins mit Hilfe des FACS Gerätes nachgewiesen, dabei waren 80-90% der Zellen infiziert.

3.14 Proteinextraktion

Nach entsprechender Behandlung werden die Zellen aus dem Inkubator genommen, auf Eis zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in einem geeigneten Volumen

Lysepuffer (0,2% SDS mit frisch zugesetzten Phosphatase- und Proteinaseinhibitoren) von der Petrischale abgekratzt. Das Lysat wird noch zusätzlich mit einer Spritze und einer dünnen Nadel (0,4) homogenisiert, anschließend wird die Proteinkonzentration des Lysats bestimmt.

3.15 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung nach dem BCA (bichinoninische Säure) Pierce Assay ist eine detergenzverträgliche Rezeptur, die auf der BCA als Farbdetektierung beruht und eine Quantifizierung von Proteinen ermöglicht. Diese Methode kombiniert die etablierte und gut bekannte Biuret Reaktion, wo Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischer Lösung reduziert wird (Abb.IV.2), mit der hochsensitiven und selektiven Farbdetektierung von Cu^{1+} durch die Herstellung einer BCA-haltigen Lösung. Die violette Färbung des Reaktionsprodukts wird durch die Chelatbildung zweier BCA Moleküle mit einem Cu^{1+} hervorgerufen (Abb.IV.2) und ermöglichen somit Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration.

Abb. IV.2 Proteinreaktion mit Cu^{2+} zu Cu^{1+} : BCA reagiert mit Cu^{1+} um einen intensiven violetten Farbkomplex bei 562nm zu bilden (Pierce Katalog, 2005).

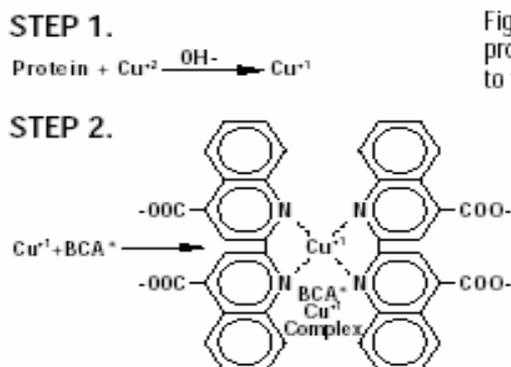
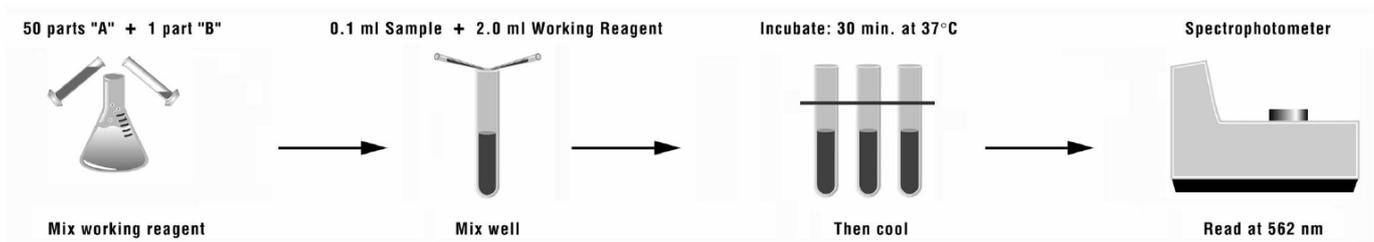


Figure 4: Proteins react with alkaline copper II to produce copper I. BCA then reacts with copper I to form an intense purple color at 562 nm.

Dieser wasserlösliche Komplex besitzt eine starke Absorption bei 562nm, die mit ansteigender Proteinkonzentration (20-2.000µg/ml) nahezu linear ist.

In der folgenden Abbildung ist der Ablauf der Konzentrationsbestimmung schematisch dargestellt. Die Lösungen A und B werden im Verhältnis 1:50 gemischt und anschließend werden 0,1 ml der Probe mit 2,0 ml der Arbeitslösung gemischt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert (Abb.IV.3), um eine verstärkte Farbreaktion zu erzielen kann der Inkubationsschritt bei 60°C durchgeführt werden, dies empfiehlt sich bei geringen Proteinkonzentrationen.

Abb. IV.3 Schematischer Ablauf der Prozedur (Pierce Katalog, 2005).



3.16 Gelelektrophorese und Immunoblot

Proteine werden mit 10%igen und 15%igen SDS-PAGE (sodium-dodecylsulfat polyacrylamid gels) aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Nitrozellulosemembranen werden mit folgenden Antikörpern geblottet: anti-ERK (1:1.000), anti-phospho-ERK (1:1.000), anti-GSK3β (1:1.000), anti-phospho-GSK3β (Ser-9 1:1.000), anti-AKT (1:1.000), anti-phospho-AKT (Ser-473; 1:1.000), anti-Caspase-8 (C15; 1:10), anti-aktives β-Catenin (1:1.000) and β-Catenin (1:2.000). Immunreaktive Proteine werden mit Peroxidase konjugierten Zweitantikörpern anti-Kaninchen oder anti-Maus (je 1:5.000 – 1:10.000) markiert und mit Hilfe des Chemilumineszenz Verfahrens (ECL) durch die Exposition auf einen X-Omat Film detektiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.17 RNA-Isolierung mit dem Qiagen Mini-Kit

Zellen werden in 600µl RLT Puffer geerntet und mit einer Spritze homogenisiert. Nachdem die RNA an die Membran einer RNeasy Mini-Säule gebunden wurde, wird sie von dieser nach mehreren Waschschritten mit RNase freiem Wasser (20µl) eluiert. Als letzter Schritt wird die RNA-Konzentration im Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen und anschließend bestimmt.

3.18 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkription gekoppelt an eine Polymerase Kettenreaktion hat die Studien zur Expression von Genen revolutioniert. Es ist nun möglich das RNA Transkript jedes Gens zu detektieren, ungeachtet des Ausgangsmaterials oder der Menge an spezifischer mRNA. Bei der RT-PCR Methode wird von der RNA-Matritze eine komplementäre DNA-Kopie (cDNA) erzeugt. Das Enzym, das diesen Vorgang katalysiert ist die retrovirale reverse Transkriptase. Die zu untersuchende DNA-Sequenz wird dann entweder mit der konventionellen PCR-Methode amplifiziert und das Produkt auf einem Agarosegel detektiert oder mit der sensitiveren Real-Time PCR, bei der die PCR-Produkte durch entstehende Fluoreszenz nach jedem Zyklus gemessen werden.

RT-Mix:	MgCl ₂	4µl
	PCR Puffer	2µl
	Rnase Inhibitor	1µl
	OligodT	1µl
	dNTP	1µl
	H ₂ O +RNA (1µg)	10µl

Reaktion: 3 Minuten 65°C
5 Minuten Eis (4°C)
1 µl Reverse Transkriptase zu jedem Ansatz pipettieren
PCR-Programm 45 Minuten 42°C
5 Minuten 95°C

3.19 Real-Time PCR (Polymerase Kettenreaktion)

Bei der Real-Time PCR werden wie bei der konventionellen PCR-Methode DNA-Abschnitte vervielfältigt. Zusätzlich werden jedoch schon während des Laufs PCR-Produkte durch Messung entstehender Fluoreszenz nachgewiesen. Post-PCR-Prozesse, die bei der konventionellen PCR-Methode zum Nachweis des PCR-Produkts notwendig sind, entfallen daher. So kann auf eine Gelelektrophorese verzichtet werden. Kontaminationen, die bei der herkömmlichen PCR ein großes Problem darstellen, werden in diesem geschlossenen System wesentlich reduziert. Darüber hinaus ist das Verfahren schneller („Echtzeit“) und liefert sowohl qualitative als auch quantitative Ergebnisse.

Anfang der 90er Jahre kam die Fluoreszenzdetektion vor allem mit der Einführung neuer DNA-Sequenzierungstechniken in das molekularbiologische Labor. Holland und seine Kollegen etablierten den 5'Nuclease PCR Assay unter Ausnutzung der 5'-Exonucleaseaktivität der Taq Polymerase zur Detektion der sequenzspezifischen Amplifikation. Dies war jedoch im Post-PCR-Prozess ein sehr aufwendiges Verfahren. So wurden ³²P-markierte Sonden verwendet und Sondenfragmente von intakten Sonden mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Erst durch die Entwicklung von Lee und seinen Kollegen 1993 bei Applied Biosystems fluorogene Sonden in den Assay einzusetzen, konnte der Abbau der Sonden ohne aufwendige Post-PCR-Prozesse nachgewiesen werden. Der sogenannte TaqMan™PCR Assay basiert auf dem ursprünglichen 5'-Nuclease-Assay und macht sich zunächst ebenfalls die 5'-3'- Exonucleaseaktivität der AmpliTaq Polymerase zu

Nutze (Abb.9). Die hierfür spezielle fluorogene TaqMan Sonde ist ein einzelsträngiges Oligonukleotid, das am 5'-Ende mit einem fluoreszenz Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und durch einen Phosphatrest zusätzlich blockiert ist (Abb.IV.4). Fluorophor und Quencher liegen 3 bis 30 Basenpaare auseinander. Im Zuge einer Amplifikation wird diese Sonde durch eine mit der Taq Polymerase assoziierte doppelstranspezifische Nukleaseaktivität hydrolysiert, so dass die Minderung der Fluoreszenz durch die räumliche Trennung vom Quencher aufgehoben wird. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz des Reporters also mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist absolut sequenzspezifisch, da nicht 100%ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase aktiviert wird. Die Veränderungen der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe wird mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequenz Detektors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus gemessen.

80x PCR-Mix (1ml):	PCR Puffer	200µl
	MgCl ₂	400ml
	dNTP	160µl
	HGS Polymerase	10µl
	Uracil-N-Glykosylase	20µl
	H ₂ O	210µl

Pipettierschema:

Reagenzien	Actin	CD95	CD95L	MMP-9	MMP-2
for. Primer	5,3	5,3	0,88	0,88	5,3
rev. Primer	15,8	5,3	15,8	5,3	15,8
Probe-Taq	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
PCR Mix	43,8	43,8	43,8	43,8	43,8
H ₂ O	14,9	24,4	20,3	29,8	14,9
cDNA	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4

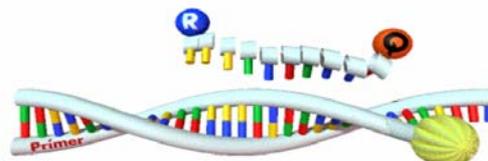
Abb. IV.4 Einfluss der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase auf eine Fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan™PCR (Dr. T. A. Schild; Appl. Biosystems, Deutschland)



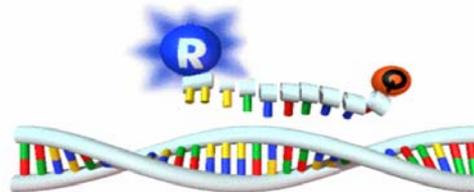
1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer (Abbildung zeigt die Anlagerung des Forward Primers)



2. Primer-Extension und Sondenhydrolyse



3. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt



4. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle wächst das Reporter-Signal

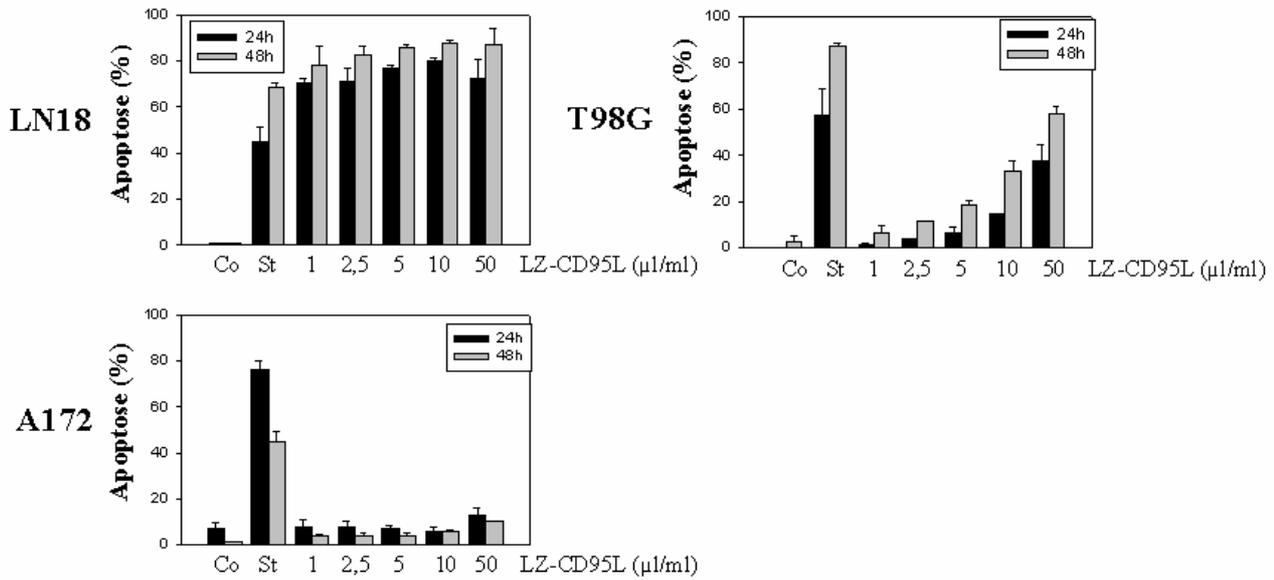
V. Ergebnisse

1. Die Expression und Funktion des CD95/CD95L-Systems in Glioblastomen

1.1 Glioblastom Zelllinien zeigen unterschiedliche Sensitivitäten gegen CD95-vermittelte Apoptose

Zunächst wird die Sensitivität verschiedener Glioblastomzelllinien gegen CD95-vermittelten Tod untersucht. Hierzu werden die etablierten humanen Glioblastomzelllinien LN18, T98G und A172 getestet. Der Zelltod wird nach dem Nicolettiprotokoll mit fluoreszenzaktiviertem Zellsorter (FACS) analysiert. Die verschiedenen Glioblastomzelllinien zeigen nach der Behandlung mit LZ-CD95L eine unterschiedliche Apoptoserate. Die LN18-Zellen sind im Vergleich zu den T98G-Zellen und den A172-Zellen sehr sensitiv, sie sterben bereits bei einer geringen Dosis des LZ-CD95L (50% vs. 2%; LN18 vs. T98G, bei 1µl/ml LZ-CD95L) nach 24 h. Dagegen ist die Sensitivität der T98G-Zellen stark reduziert (40% vs. 80%, T98G vs. LN18, bei 50µl/ml nach 24 h). Die A172 sind komplett resistent (Abb.V.1.1a). Der durch LZ-CD95L-induzierte Zelltod kann mit einem neutralisierenden Antikörper gegen CD95L (Nok1) gehemmt werden. Dies bestätigt, dass der zuvor induzierte Zelltod CD95-spezifisch ist (Abb.V.1.1b).

a)



b)

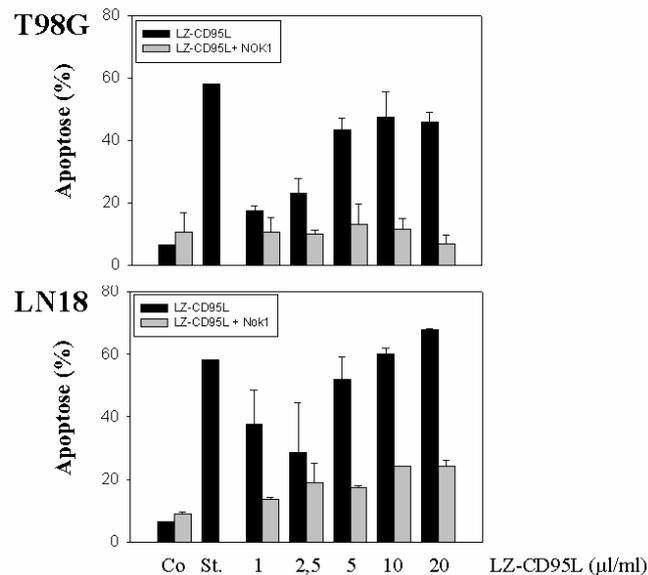


Abb. V.1.1 CD95-induzierte Apoptose in Glioblastomzellen: a) Die Glioblastomzelllinien LN18, T98G und A172 werden mit den angegebenen Konzentrationen LZ-CD95L behandelt. Als Positivkontrolle werden die Zellen mit Staurosporin (1µM) (St.) behandelt. Nach 24h und 48h wird die DNA-Fragmentierung mittels FACS analysiert. b) Blockierung der CD95-induzierten Apoptose mit dem neutralisierenden Antikörper Nok-1 (50ng), Apoptose wird mittels FACS analysiert.

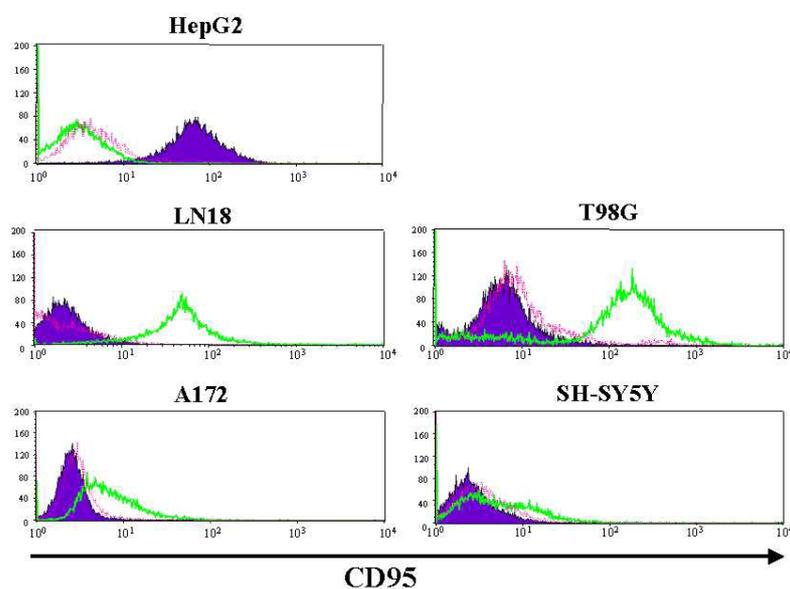
Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente und angegeben als Mittelwert \pm S.D.

1.2 Die Expression von CD95 und CD95L in Glioblastomzellen

Die Rezeptorexpression wird mittels FACS analysiert. Als Kontrollen werden die Hepatomzelllinie HepG2, mit einer bekanntermaßen hohen Expression des CD95 an der Zelloberfläche und die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, mit einer niedrigen CD95-Oberflächenexpression, eingesetzt. Die LN18- und T98G-Zellen zeigen eine vergleichbare CD95-Expression (Abb.V.1.2a). Die A172 hingegen zeigen eine sehr geringe CD95-Oberflächenexpression. Dementsprechend ist die Resistenz der A172-Zellen gegen CD95-induzierten Tod auf die geringe CD95-Expression zurückzuführen. Dies ist jedoch nicht der Fall bei den LN18- und T98G-Zellen, die mit vergleichbarer CD95-Expression unterschiedlich sensitiv sind. Auf mRNA-Niveau ist ein deutlicher Unterschied in der Rezeptorexpression der drei Glioblastomzelllinien zu erkennen. Die LN18 und A172 zeigen im Vergleich zu den T98G eine 2- bis 3-fach höhere Expression. Das gleiche trifft auch für die Expression des CD95L zu, der bei den LN18 und A172 eine 30- bis 40-fach höhere Expression verglichen mit den T98G zeigt. (Abb.V.1.2b).

Aufgrund der geringen Rezeptorexpression der A172 werden sie für die weiteren Versuche nicht berücksichtigt.

a)



b)

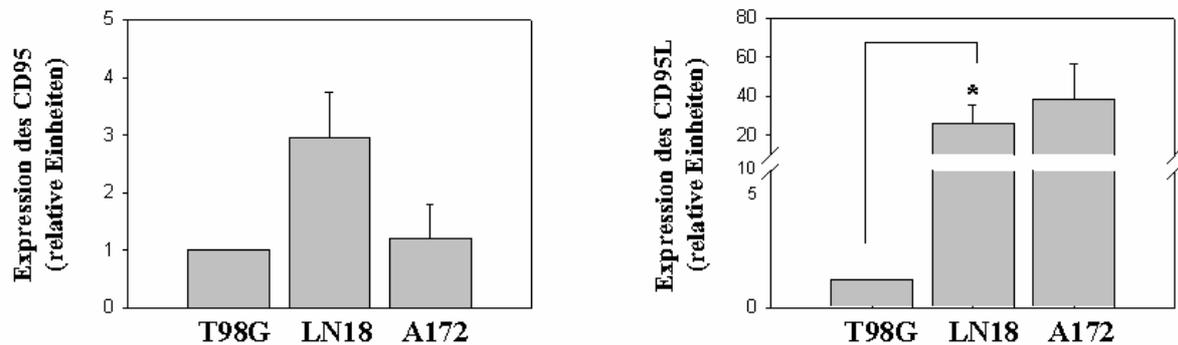


Abb. V.1.2 Expression von CD95 und CD95L in Glioblastom- und Neuroblastomzelllinien: a) Die Oberflächenexpression des CD95-Rezeptors in Glioblastomzelllinien LN18, T98G und A172 in einer Neuroblastomzelllinie (SH-SY5Y) sowie als Positivkontrolle in der Hepatomzelllinie (HepG2), wird mittels FACS analysiert. b) Real-Time PCR für CD95 und CD95L in Glioblastomzelllinien (A172, T98G und LN18). Die Expression in der Zelllinie wird als 1 standardisiert und die Werte der anderen Zelllinien relativ dazu dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte angegeben \pm S.E., * $p < 0.05$; t-Test und repräsentieren drei unabhängige Experimente.

1.3 CD95L induziert Migration/Invasion resistenter Glioblastomzelllinien

Aufgrund der unterschiedlichen Apoptoseresistenz der Glioblastomzelllinien T98G und LN18, wird im nächsten Schritt das Migrationsverhalten dieser Zellen untersucht. Ein physiologisches Modell sind Spheroidkulturen, die in einem Kollagengel ausplattiert werden. Solche Kulturen werden von T98G- und LN18-Zellen erzeugt. Die Behandlung mit LZ-CD95L (1 μ l/ml) erfolgt über 48 h und wird mittels Zeitraffer-Mikroskop verfolgt. Die Zugabe des LZ-CD95L erhöht die dreidimensionale Invasion der T98G-Zellen in das Kollagengel aber nicht die der LN18-Zellen (Abb.V.1.3a und b)

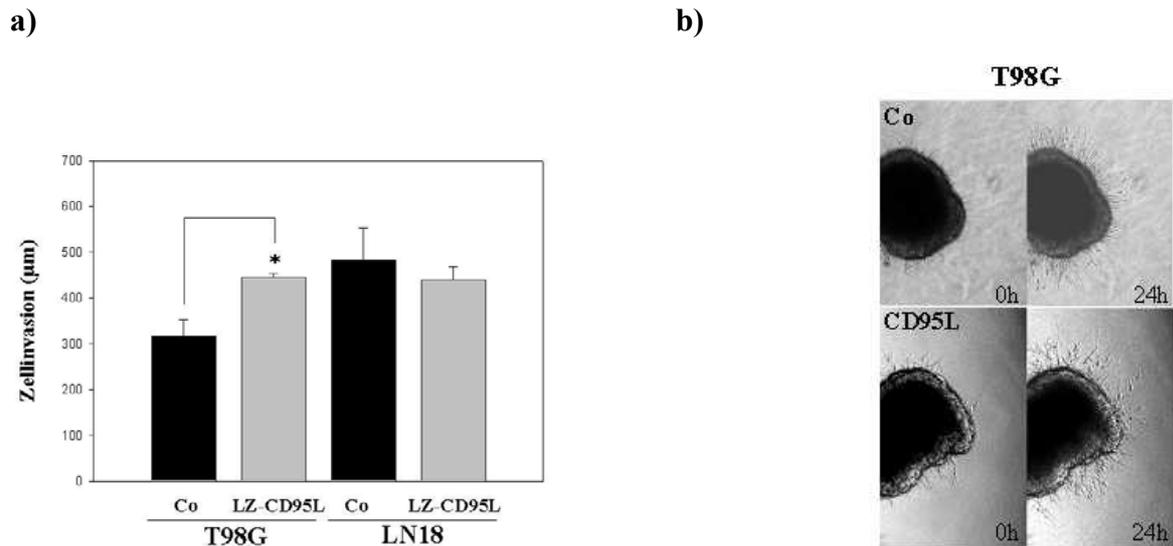


Abb. V.1.3 CD95L induziert die Invasion der T98G-Zelllinie: a) Spheroidkulturen werden in eine dreidimensionale Kollagenmatrix eingebettet und mit LZ-CD95L, behandelt. Die Invasion der Zellen wird vom Rand des Spheroids gemessen; pro Behandlung werden 3 Spheroide ausgewertet, pro Spheroid mindestens 10 Zellen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte angegeben als \pm S.D.,* $p < 0.05$, t-Test). b) Repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen der Spheroide (T98G) 0 h und 24 h nach der Behandlung.

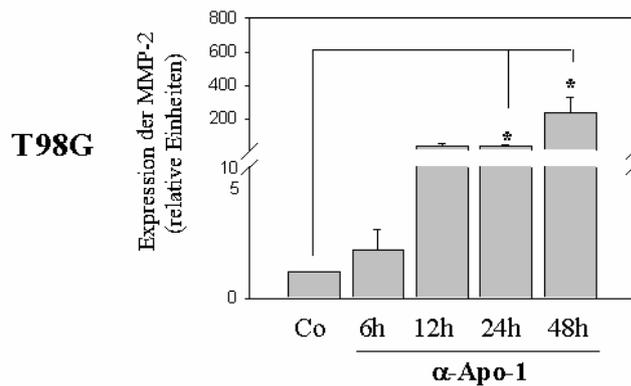
1.4 Die Stimulierung des CD95-Rezeptors führt zu einem Anstieg der Expression der Matrix Metalloproteinasen-2 und -9.

MMPs sind bekanntermaßen an der Umsetzung von Migration/Invasion beteiligt. Dementsprechend ist es naheliegend, deren Regulation nach Stimulierung des CD95-Rezeptors zu untersuchen. Unter den MMPs sind MMP-2 und MMP-9 für die Lyse von Kollagen zuständig (Gelatinasen).

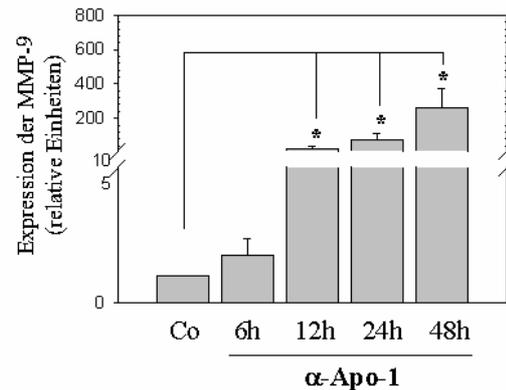
Die semi-sensitiven T98G-Zellen werden mit anti-CD95-Antikörper (α -Apo-1) über einen Zeitraum von 48 h behandelt. Mit zunehmender Inkubationszeit kann ein Anstieg der MMP-2-mRNA detektiert werden, der nach 48 h eine 300-fach höhere Expression gegenüber unbehandelten Zellen aufweist (Abb.V.1.4a). Ein ebenfalls starker zeitabhängiger Anstieg ist

für die MMP-9-mRNA detektierbar. Er erreicht nach 48 h einen 350-fachen Anstieg im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb.V.1.4b). In den LN18-Zellen konnte weder ein Anstieg der MMP-9 noch der MMP-2 beobachtet werden (Abb.V.1.4c und d).

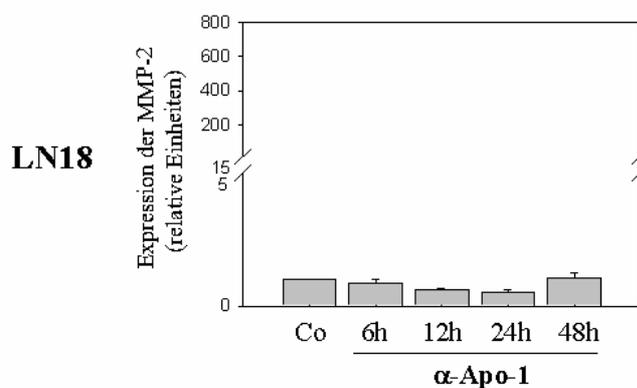
a)



b)



c)



d)

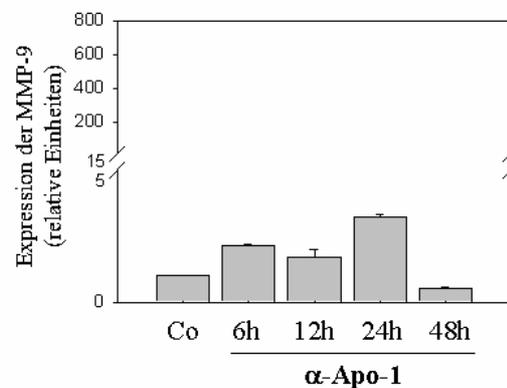


Abb. V.1.4 Die Stimulierung des CD95-Rezeptors erhöht die Expression der MMP-2 und -9, in Zellen, die gegen CD95-induzierten Tod resistent sind: Die Glioblastomzellen werden über Nacht auf Petrischalen (1×10^6 Zellen) ausplattiert und anschließend mit α -Apo-1 Antikörper ($1 \mu\text{g/ml}$) für die angegebene Zeit inkubiert. MMP-2 und MMP-9 werden mittels spezifischer Real-Time PCR detektiert. Alle Grafiken zeigen die Ergebnisse drei unabhängiger Experimente, die als Mittelwerte angegeben sind \pm S.E., * $p < 0.05$, t-Test).

1.5 Welche Moleküle sind an dem CD95-induzierten Migrationsprozess beteiligt?

Moleküle, die unterhalb des CD95-Rezeptors liegen und einen direkten Einfluss auf die Transkription der MMPs haben könnten, sollen im folgenden Abschnitt genauer untersucht werden. Ein möglicher Kandidat, der zur Hochregulation der MMPs führen kann, ist die Integrin-linked-Kinase (ILK). Um die Beteiligung von ILK an CD95-induzierter Migration zu analysieren, werden T98G-Zellen auf Migrationsplatten (Boyden-Kammern) ausplattiert. CD95 wird entweder mit α -Apo-1 Antikörper oder LZ-CD95L stimuliert in An- bzw. Abwesenheit des ILK-Inhibitors (KP-SD1). Die durch α -Apo-1 Antikörper bzw. LZ-CD95L induzierte Migration der T98G-Zellen kann mit KP-SD1 auf die basale Migrationsaktivität reduziert werden. KP-SD1 alleine hat keinen Effekt auf das Migrationsverhalten der Zellen (Abb. V.1.5).

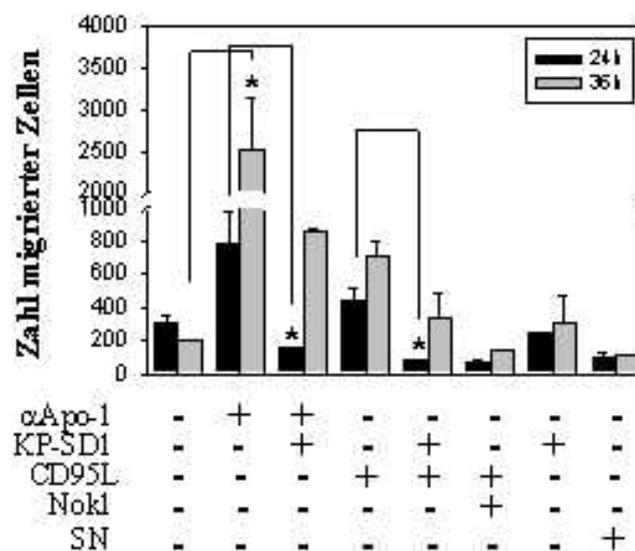


Abb. V. 1.5 Die Inhibierung von ILK kann den Migrationsstimulus des CD95L aufheben: T98G-Zellen werden mit α -Apo-1 Antikörper (2 μ g/ml), KP-SD1 (10 μ M), LZ-CD95L (CD95L, 1 μ l/ml), LZ-CD95L/Nok1 (CD95L/Nok1, 50ng/ μ l) oder Überstand (SN, 1 μ l/ml) über 24 h bzw. 36 h behandelt. Die Zellzahl der migrierten Zellen wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Grafik ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente und die Ergebnisse sind Mittelwerte angegeben als \pm S.E., * p<0.05, t-Test).

1.6 ILK verstärkt die Migration/Invasion der Zellen durch die Hemmung von GSK3 β

Als nachgeschaltetes Molekül in der ILK-Signalkaskade steht GSK3 β . Zuerst wird die Phosphorylierung des Serin-9-Restes auf Proteinebene im Western Blot untersucht. Dazu werden die Zellen einer Kinetik unterzogen, um anschließend die Hemmung von GSK3 β auf Proteinebene zu überprüfen.

Die basale Phosphorylierung von GSK3 β ist bei T98G- wesentlich höher als bei LN18-Zellen. Bei den T98G-Zellen sieht man zwei „Wellen“ der Phosphorylierung. Die erste ist nach kurzer Stimulierung von 5 Minuten detektierbar, und die zweite beginnt nach 15-minütiger Stimulierung und bleibt dann langanhaltend stabil (Abb.V.1.6a). Während bei den LN18-Zellen eine kurzzeitige Zunahme nach 5 bzw. 10 Minuten zu erkennen ist, die anschließend wieder abfällt (Abb.V.1.6a).

Um die funktionelle Bedeutung der Hemmung von GSK3 β zu untersuchen, werden Zellen stabil mit einer konstitutiv aktiven Form von GSK3 β (GSKS9A; mT98G) transfiziert. Dieses Konstrukt enthält eine IRES-GFP-Kassette, so dass die Expression des Konstrukts jederzeit überprüft werden kann. Als Kontrolle werden vektorinfizierte Zellen verwendet (pEIGW, vT98G).

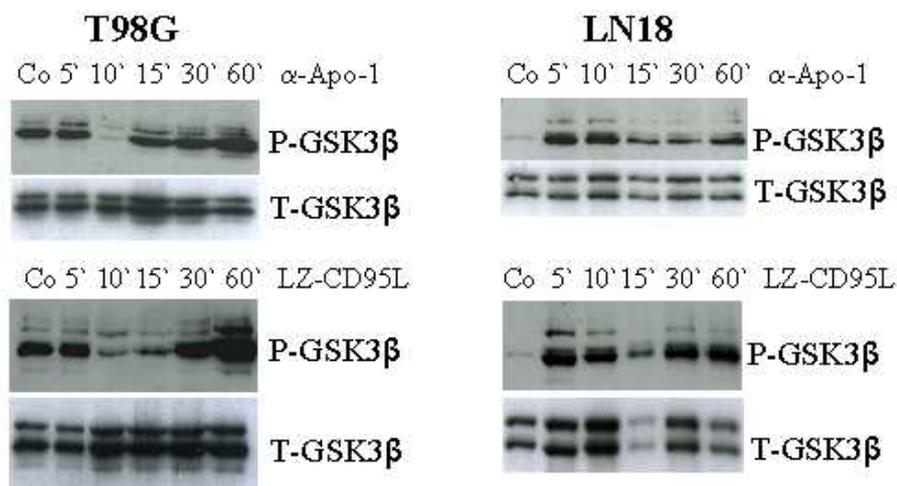
Diese Zellen werden im Migrationsassay eingesetzt. Nach der Behandlung mit α -Apo-1 Antikörper oder LZ-CD95L in Ab- oder Anwesenheit des blockierenden Antikörpers (Nok1) kann nach 12 h, weder bei den mT98G noch bei den vT98G ein Anstieg der Migration festgestellt werden (Abb.V.1.6b). Jedoch ist nach 36 h bei den vT98G ein deutlicher Anstieg der Migration nach der Rezeptorstimulierung detektierbar. Diese Zunahme kann mit Nok1 komplett gehemmt werden. Die Migration der mT98G ist durch CD95-Stimulierung nicht induzierbar (Abb.V.1.6b). Die LN18-Zellen dagegen zeigen nach 12-stündiger Behandlung mit LZ-CD95L eine Zunahme der Migration in den vLN18 und mLN18. Dieser Effekt ist

jedoch nach 36 h nicht mehr zu erkennen. Alle Ansätze zeigen eine basale Migration, die nicht verstärkt werden kann (Abb.V.1.6c, unten).

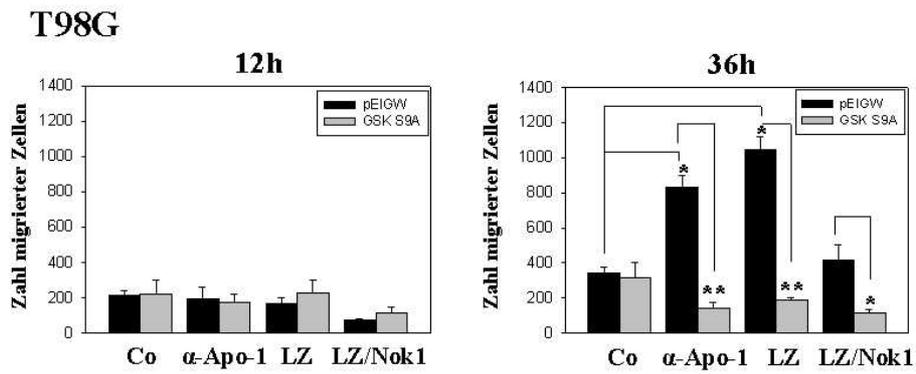
diese Ergebnisse zeigen, dass GSK3 β die CD95-induzierte Migration umsetzt.

Da die Aktivierung von GSK3 β auch zu Apoptose führen kann (Kaytor and Orr, 2002), wird bei den mT98G zum einen das Wachstum und zum anderen die Sensitivität gegenüber CD95-induzierter Apoptose untersucht. Die T98G-Zellen zeigen keine Unterschiede in der Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose; sowohl die vT98G als auch die mT98G sind resistent (Abb.V.1.6d). Dies zeigt auch die vergleichbare Wachstumskurve der beiden Zelllinien (Abb.V.1.6e, links). Bei den LN18-Zellen ist ein Unterschied zwischen den vektorinfizierten Zellen und den mit GSK S9A festzustellen. Die Zellen mit GSK S9A zeigen einen resistenteren Phänotyp als die vLN18-Zellen, was auch durch eine Zunahme der Proliferation zu erklären ist (Abb.V.1.6d und e) Die mLN18-Zellen hingegen proliferieren schneller im Vergleich mit den vLN18 (Abb.V.1.6e, rechts).

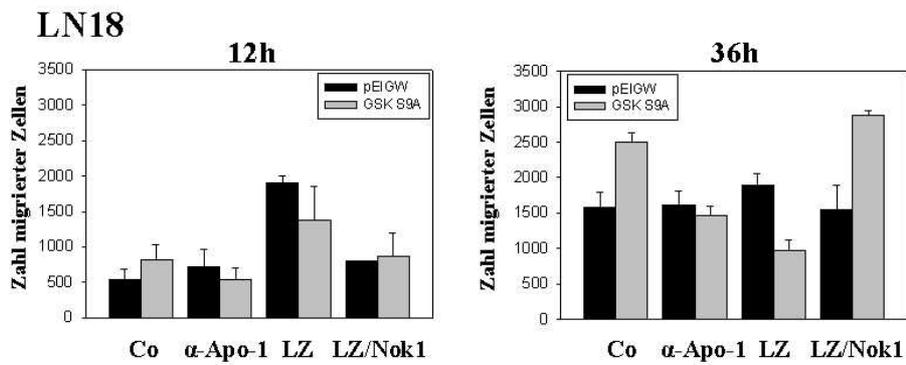
a)



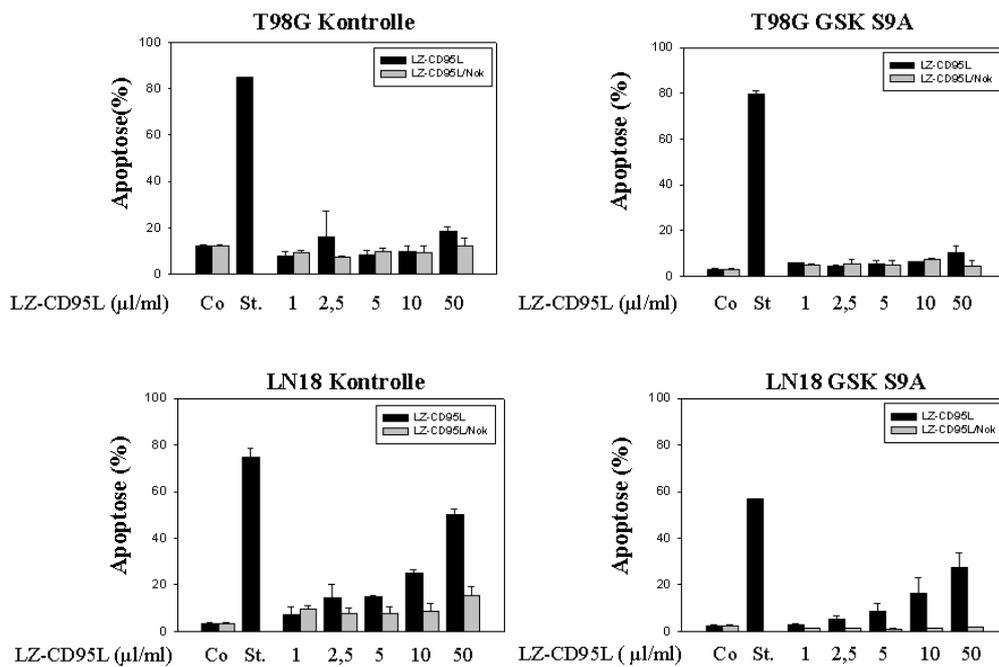
b)



c)



d)



e)

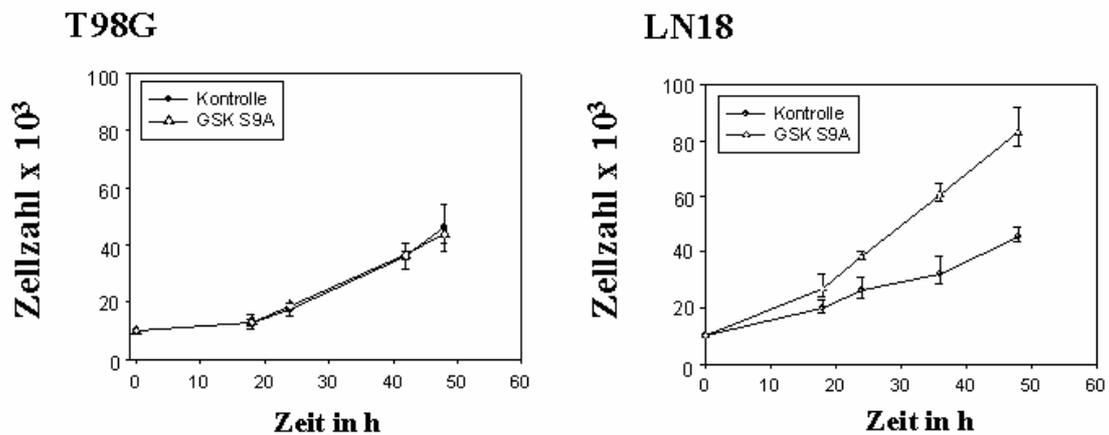


Abb. V.1.6 Die Hemmung von GSK3 β ist notwendig für die CD95-vermittelte Migration/Invasion: a) Western Blot mit den T98G- und LN18-Zellen nach der Behandlung mit α -Apo-1 (5 μ g) und LZ-CD95L (LZ; 1 μ l/ml). Die Proteine werden mit spezifischen Antikörpern Phospho- und Total-GSK3 β (P-GSK3 β , T-GSK3 β) nachgewiesen. b) und c) Migrationsassay mit stabil infizierten T98G- und LN18-Zellen mit lentiviralen Konstrukten, Vektorkontrolle (Kontrolle und vLN18) und konstitutiv aktivem GSK3 β (GSK S9A; mT98G und mLN18). 12 h und 36 h nach der Behandlung mit α -Apo-1 (2 μ g/ml), LZ-CD95L (LZ; 1 μ l/ml) oder LZ-CD95L/Nok1 (LZ 1 μ l/ml, Nok 50ng), wurde die Zahl der migrierten Zellen mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. e) Wachstumskurven der vT98G, mT98G sowie der vLN18 und mLN18 über einen Zeitraum von 48 h. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente und werden als Mittelwerte angegeben \pm S.E., * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, t-Test).

1.7 AKT ist mitverantwortlich für die Hemmung von GSK3 β

GSK3 β kann unterhalb von ILK direkt oder indirekt über AKT gehemmt werden. Welche Art der Hemmung hier vorliegt, wird mit einem spezifischen AKT-Inhibitor (Ly 290059, 25 μ M) untersucht. Nach der Behandlung der Zellen in Ab- oder Anwesenheit von Ly 290059 werden die Proteine im Western Blot detektiert. Die Phosphorylierung von AKT wird durch die Stimulierung des CD95-Rezeptors mit α -Apo-1 Antikörper (2 μ g/ml) ausgelöst und kann durch die Präinkubation mit Ly 290059 gehemmt werden (Abb.V.1.7 oben). Die Inhibierung

von GSK3 β , die bei gleicher α -Apo-1-Stimulierung detektierbar ist, wird durch die Präinkubation mit Ly290059 komplett unterdrückt (Abb.V.1.7 mitte). Die Aktivierung von ERK ist durch die Stimulierung des CD95-Rezeptors und durch die Präinkubation mit Ly 290059 nicht beeinflussbar (Abb.V.1.7 unten).

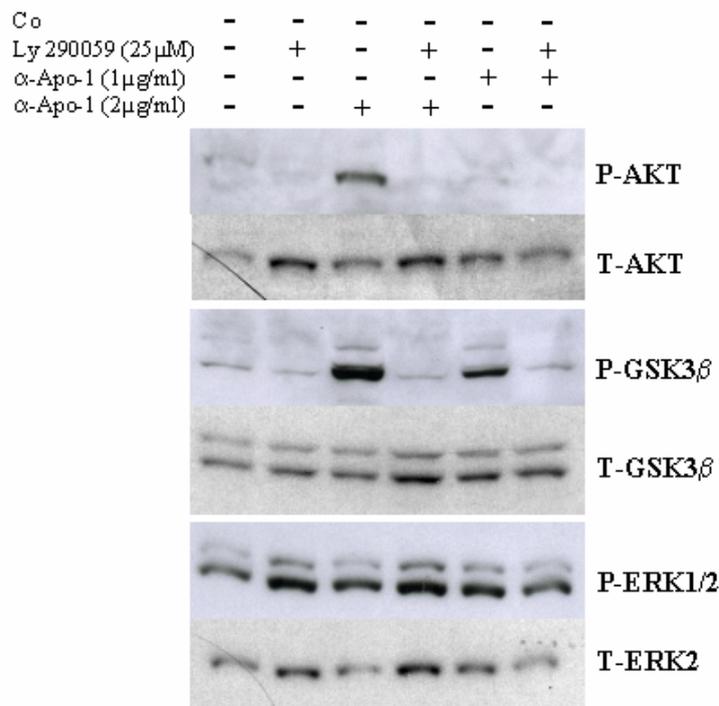


Abb. V.1.7 AKT ist für die Hemmung von ILK verantwortlich: T98G-Zellen werden in An- oder Abwesenheit mit Ly 290059 (25 μ M) präinkubiert und anschließend mit den angegebenen Dosen α -Apo-1 Antikörper für 1 h behandelt. Die Proteine werden mit spezifischen Antikörpern gegen Phospho-AKT (P-AKT), Total-AKT (T-AKT), Phospho-GSK3 β (P-GSK3 β), Total-GSK3 β (T-GSK3 β), Phospho-ERK (P-ERK) und Total-ERK (T-ERK) im Western Blot detektiert. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

1.8 Die Inhibierung von ERK hat keinen Einfluss auf die CD95-induzierte Migration

Um die Aktivierung von ERK zu hemmen wird der spezifische MAPK-Inhibitor PD 98059 eingesetzt. Durch die Präinkubation mit PD 98059 wird die Aktivität von ERK deutlich gehemmt, wie es auf Proteinebene im Western Blot dargestellt ist (Abb.V.1.8). Diese

Hemmung hat jedoch keinen Einfluss auf die CD95-induzierte Migration. Der Migrationsanstieg ausgelöst durch die CD95-Stimulierung mit α -Apo-1 Antikörper (2 μ g/ml) wird durch die Inhibierung von ERK verstärkt (Abb.V.1.8)

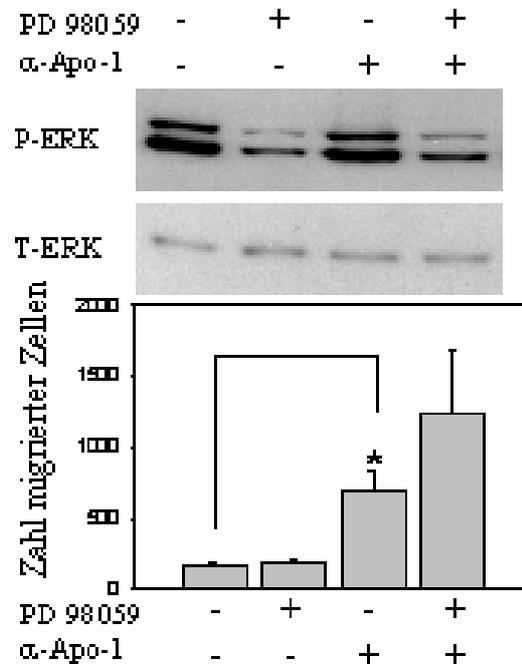


Abb. V.1.8 Die Inhibierung von ERK verstärkt die CD95-induzierte Migration: T98G-Zellen werden in An- oder Abwesenheit mit dem MAPK-Inhibitor (PD 98059, 25 μ M) präinkubiert und anschließend mit α -Apo-1 Antikörper (2 μ g/ml) 1 h für die Detektion im Western Blot be andelt oder 36 h für den Migrationsassay. Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente und dargestellt als Mittelwert angegeben \pm S.E., * p<0.05, t-Test.

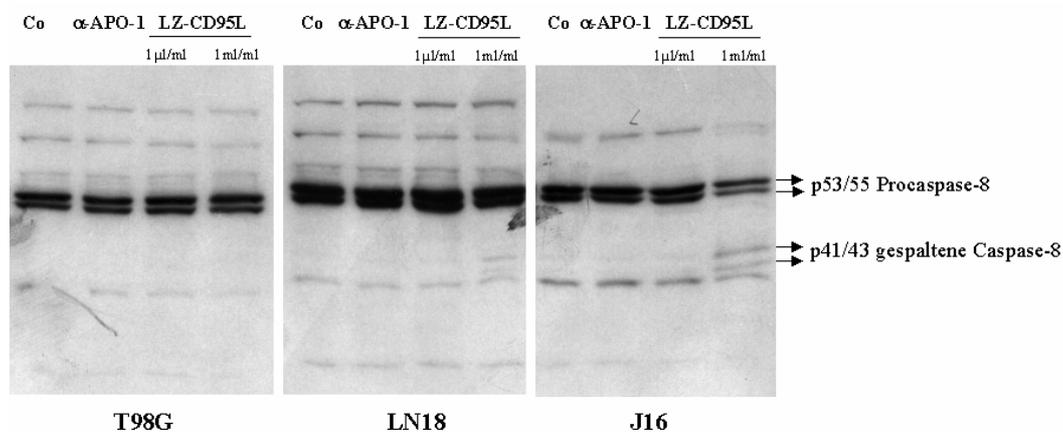
1.9 Der Migrationseffekt ist unabhängig von Caspasen

Caspasen werden bekanntermaßen nach der Stimulierung des CD95-Rezeptors aktiviert und induzieren in sensitiven Zellen die Apoptosesignalkaskade. Um herauszufinden, ob Caspasen auch für die Migration benötigt werden, werden LN18, T98G und Jurkat 16 (J16) Zellen mit α -Apo-1 bzw. LZ-CD95L für 60 Minuten behandelt und anschließend die Expression der

Caspase-8 im Western Blot überprüft. Die basale Expression der Procaspase-8 ist in allen Zelllinien ähnlich. Nach der Stimulierung des CD95-Rezeptors mit einer hohen Dosis LZ-CD95L (5µg/ml) kann eine deutliche Prozessierung der Caspase-8 in den LN18 und den J16 detektiert werden, jedoch nicht in den resistenten T98G-Zellen im Vergleich mit den jeweils unbehandelten Zellen (Abb.V.1.9a).

Um festzustellen, ob die Aktivierung der Caspasen einen Einfluß auf unsere Signalkaskade und auf die Migration hat, werden die Zellen zusätzlich zur Stimulierung des CD95 mit α -Apo-1 Antikörper in Ab- oder Anwesenheit eines spezifischen Caspaseinhibitors, zVAD-fmk (40µM) behandelt. Die Phosphorylierung von GSK3 β wird im Western Blot nachgewiesen. Durch die Behandlung mit α -Apo-1 Antikörper sowie bei der Doppelbehandlung mit α -Apo-1/zVAD-fmk nimmt die Phosphorylierung von GSK3 β bei T98G-Zellen verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen zu. Die Behandlung mit zVAD-fmk alleine hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von GSK3 β (Abb.V.1.9b, rechts). Die LN18-Zellen zeigen zwar auch eine Phosphorylierung von GSK3 β , jedoch wird diese durch die Doppelbehandlung mit zVAD-fmk/ α -Apo-1 aufgehoben, so dass bei diesen Zellen eventuell ein Zusammenhang zwischen der Caspaseaktivität und der Phosphorylierung von GSK3 β bestehen könnte.

a)



b)

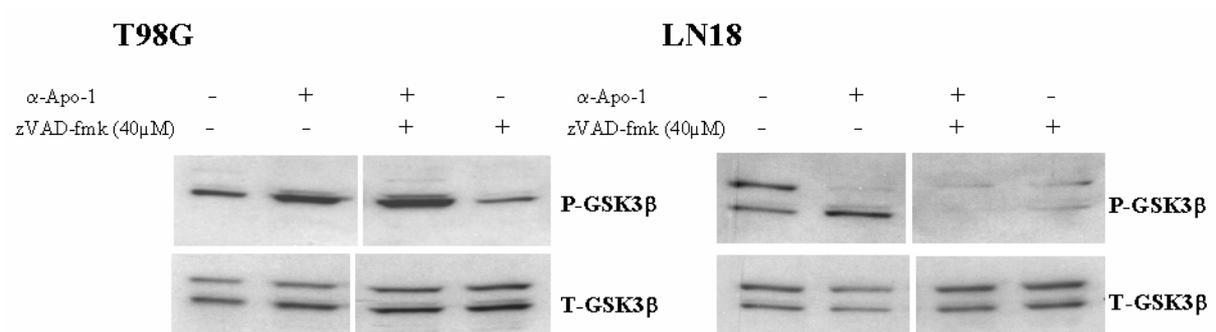


Abb. V.1.9 Caspasen sind am Migrationsprozess nicht beteiligt: a) Glioblastomzelllinien (LN18 und T98G) werden mit α -Apo-1 (1μg/ml) für 10 min. und 60 min. behandelt oder bleiben als Kontrollzellen unbehandelt. Die Proteine werden nach der angegebenen Zeit extrahiert und im Western Blot für Caspase-8 (C15 Hybridomüberstand 1:10) analysiert. b) Die Zellen werden 1 h mit α -Apo-1 (1μg/ml), α -Apo-1/Nok1 (50ng), α -Apo/zVAD-fmk (40μM) oder zVAD-fmk alleine behandelt oder bleiben als Kontrollen unbehandelt. Die Aktivität von GSK3β wird im Western Blot mit einem spezifischen Phospho-GSK3β (P-GSK3β) und Total-GSK3β (T-GSK3β) Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

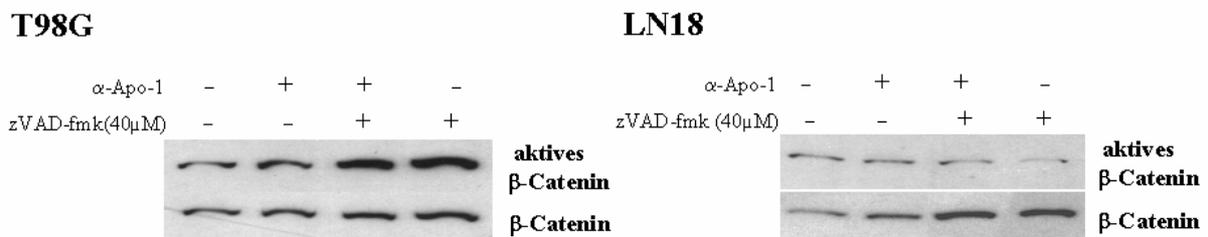
1.10. Die Aktivierung von β -Catenin als Folge der Inhibierung von GSK3β

Die Hemmung von GSK3β führt unter anderem zur Stabilisierung und Translokation von β -Catenin in den Nukleus. Die Bindung von β -Catenin an T-cell factor/lymphoid enhancing factor (Tcf/Lef) führt zur Transkription bestimmter Zielgene. Andererseits spielt die Bindung von β -Catenin an E-Cadherine eine wichtige Rolle im Adhäsionsverhalten der Zellen.

Die Relevanz der Aktivierung von β -Catenin wird in unserem Glioblastommodell getestet. Die T98G- und LN18-Zellen werden mit α -Apo-1 Antikörper in Ab- oder Anwesenheit von zVAD-fmk für 1 bzw. 3,5 h behandelt. Die aktive Form von β -Catenin wird im Western Blot und immunhistochemisch nachgewiesen (Abb.V.1.10a und b). Die T98G-Zellen zeigen eine deutliche Aktivierung von β -Catenin durch die Behandlung mit α -Apo-1/zVAD-fmk sowie

auch mit zVAD-fmk alleine, jedoch nicht mit α -Apo-1 Antikörper alleine. In den LN18-Zellen konnte keine Aktivierung von β -Catenin beobachtet werden (Abb.1.10a rechts). Nach der Stimulierung des CD95-Rezeptors kann immunhistochemisch, in den T98G-Zellen, aktives β -Catenin im Nukleus detektiert werden (Abb.V.1.10b). Bereits nach einer Stunde ist ein deutliches Signal (grün) in der Membran unbehandelter Zellen und im Nukleus stimulierter Zellen zu erkennen. Das Signal ist nach 3,5 h noch stabil, die Lokalisation von GSK3 β (rot) verändert sich nach der Behandlung mit α -Apo-1 Antikörper nicht.

a)



b)

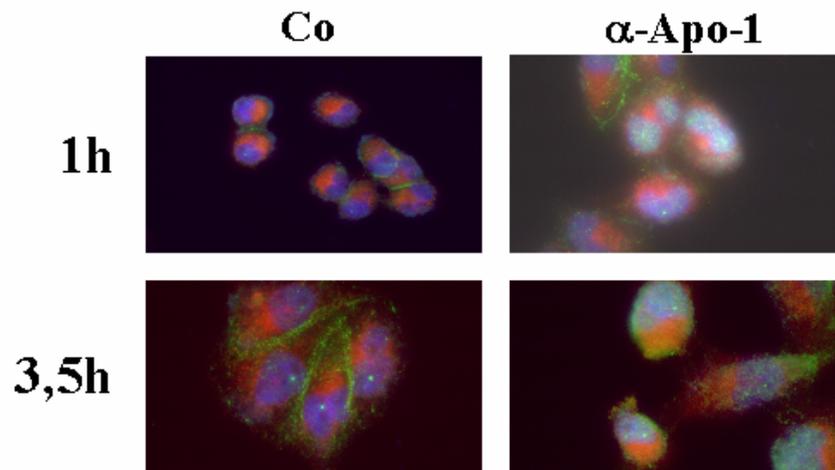


Abb. V.1.10 CD95-Stimulierung führt zur Aktivierung von β -Catenin in T98G-Glioblastomzellen: a) Die T98G- und LN18-Zellen werden mit zVAD-fmk (40 μ M) präinkubiert und anschließend mit α -Apo-1 (2 μ g/ml) Antikörper für 1 h behandelt. Die Proteine werden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern für die aktive Form von β -Catenin und für das Gesamtprotein β -Catenin nachgewiesen. b) Immunofluoreszenz für aktives β -

Catenin (grün, 1:200), Phospho-GSK3 β (rot, 1:100) and 4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride (blau, DAPI, 1:10.000) in T98G-Zellen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

1.11 Phosphoprotein „enriched in diabetes/phosphoprotein enriched in astrocytes-15kDa“ (PED/PEA-15) - ein mögliches Bindeglied zwischen CD95 und ILK?

Nachdem der Signalweg unterhalb von ILK aufgezeigt werden konnte, wird im nächsten Schritt versucht, das Verbindungsmolekül unterhalb des CD95-Rezeptors, das zur Aktivierung von ILK führt, herauszufinden. Ein potentieller Kandidat könnte das DED tragenden Protein PED sein. Um dies zu untersuchen werden die resistenten T98G-Zellen mit PED/PEA-15 siRNA („small interfering“ RNA) transfiziert, um die Expression des Proteins auszuschalten bzw. zu reduzieren. 48 h nach Transfektion der siRNA mit Lipofectamin™2000 kann bereits eine reduzierte Expression von PED verglichen mit den Kontrollansätzen (Co, Lipof., Co siRNA), festgestellt werden (Abb.V.1.11 oberster Blot). Auch die Phosphorylierung von ERK (Abb.V.1.11 mittlerer Blot), das in der Signalkaskade unterhalb von PED liegt, ist im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert, die alle identische PED- und Phospho-ERK-Level aufwiesen.

Die Erwartung, dass durch die Reduktion der PED-Expression auch die Hemmung von GSK3 β beeinträchtigt sein wird, bestätigt sich nicht. Im Gegenteil, zeigt sich durch die Stimulierung des CD95-Rezeptors eine deutlich höhere Phosphorylierung bei den siRNA-PED-Zellen verglichen mit den Kontrollansätzen (Abb.V.1.11 untere Blots), so dass auf Grund dieser Ergebnisse PED als Verbindungsmolekül zwischen CD95 und ILK bzw. GSK3 β ausgeschlossen werden kann.

Als Ladekontrolle wird für ERK und GSK3 β das nicht-phosphorylierte Protein mit identischer Expression nachgewiesen (Abb.V.1.11).

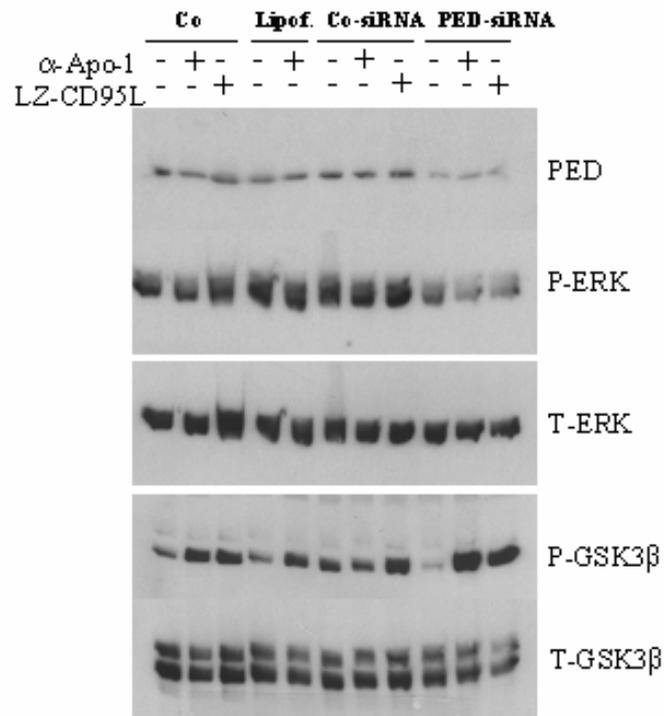


Abb. V.1.11 siRNA für PED zeigt keinen Effekt auf die Inhibierung von GSK3 β : T98G-Zellen transfiziert mit PED-siRNA (50nM) oder Co-siRNA (50nM) oder nicht transfiziert (Co, Lipof.) werden 48 h nach der Transfektion mit α -Apo-1 (2 μ g/ml), LZ-CD95L (1 μ l/ml) 1 h behandelt oder bleiben als Kontrollen unbehandelt. Die Proteine werden mit spezifischen Antikörpern gegen PED, Phospho.ERK (P-ERK), Total-ERK (T-ERK), Phospho-GSK3 β (P-GSK3 β) und Total-GSK3 β (T-GSK3) im Western Blot detektiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

2. Tumorzelllinien von Hirntumorpatienten

Nachdem in etablierten Glioblastomzelllinien gezeigt werden konnte, dass resistente Glioblastomzelllinien nach der Stimulierung des CD95-Rezeptors einen invasiveren Phänotyp ausbilden, der mit der Inhibierung von GSK3 β , der Aktivierung von β -Catenin und der Hochregulierung der MMP-2 und -9 einhergeht, soll nun im folgenden Abschnitt diese Signalkaskade auf ein physiologischeres System übertragen werden. Hierzu werden von Hirntumorpatienten stammende Zelllinien eingesetzt.

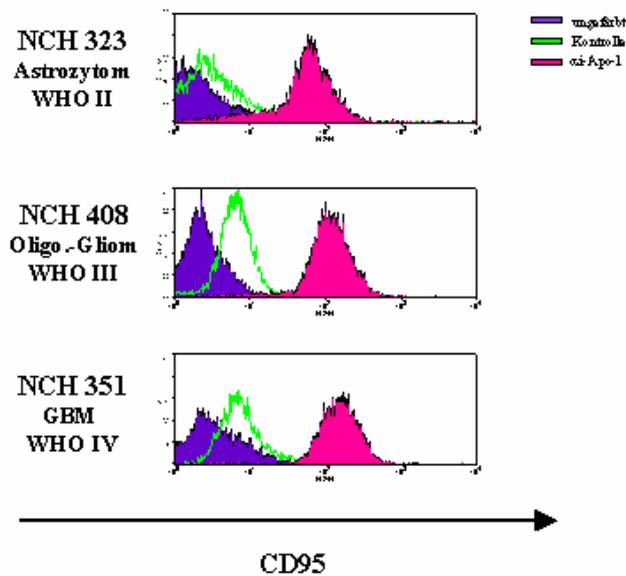
2.1 Expression des CD95-Rezeptors und die Sensitivität für CD95-induzierte Apoptose in Astrozytom- und Oligodendrogliomzelllinien

Die hier eingesetzten Zelllinien stammen aus der Kopfklinik-Heidelberg. Sie werden direkt aus frischem Tumormaterial gewonnen und haben maximal fünf Kulturpassagen hinter sich. Es handelt sich um Astrozytome und Oligodendrogliome, die einen WHO Grad II-III besitzen, sowie Glioblastome mit WHO IV. Die Astrozytome und Oligodendrogliome zeigen eine vergleichbare CD95-Oberflächenexpression (Abb.V.2.1a) sowie einen dosisabhängigen, spezifischen (mit Nok1 blockierbaren) LZ-CD95L-induzierten Zelltod (Abb.V.2.1b). Die Oberflächenexpression des CD95 ist bei den Glioblastomzellen vergleichbar, sie sind jedoch gegenüber CD95-induzierter Apoptose komplett resistent (Abb.V.2.1a und b).

Tabelle 1. Klinische Daten der Patienten-Zelllinien

NCH Nummer	Geschlecht	Alter	Diagnose
323	männlich	25	Astrozytom WHO II
408	männlich	35	Oligodendrogliom WHO III
351	männlich	37	GBM WHO IV

a)



b)

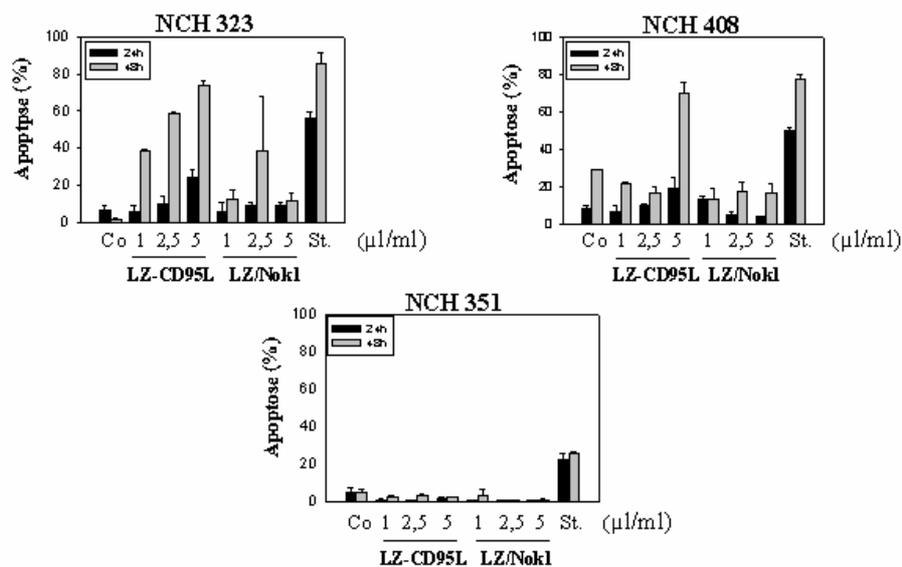


Abb. V.2.1 CD95-Expression und Sensitivität gegenüber CD95-induzierter Apoptose in Astrozytom-, Oligodendrogliom- und Glioblastomzelllinien von Patienten stammend: a) Für die Bestimmung des Rezeptors werden die Zellen mit α -Apo-1 und anschließend mit anti-Maus-Phycoerithrin inkubiert und mittels FACS analysiert. b) Die Zellen werden für den Nicoletti Assay mit LZ-CD95L(1, 2,5 oder 5 μ l/ml) behandelt, und als Blockierungsexperiment wird die gleiche Menge LZ-CD95L mit Nok1 (50ng) präinkubiert. Nach 24 h und 48 h werden die Zellen fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt und mittels FACS analysiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm S.D. und repräsentieren zwei unabhängige Experimente.

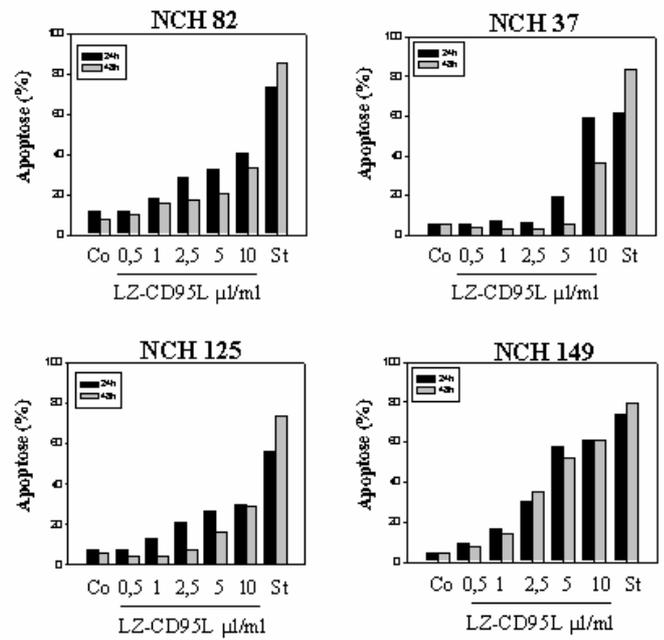
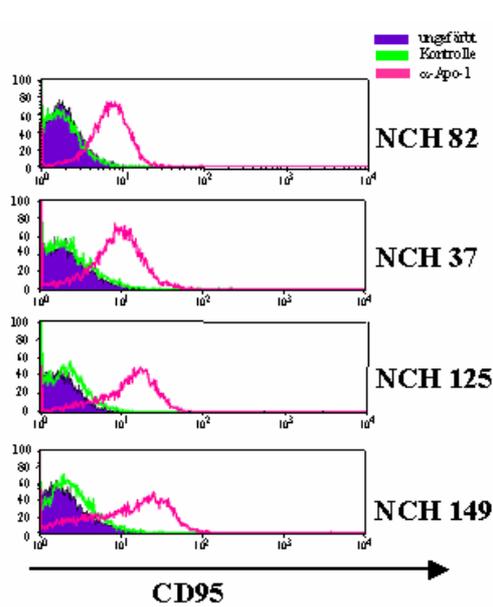
2.2 CD95-Expression und Apoptosesensitivität in Glioblastomzelllinien von Patienten stammend (WHO IV)

Um ein Klinik relevantes System zu finden, das mit den etablierten T98G- und LN18-Zelllinien vergleichbar ist, werden zehn aus Glioblastompatienten stammende Zelllinien getestet. Diese Zelllinien sind ebenfalls aus Tumorgeweben einzelner Patienten gewonnen, entsprechen alle dem WHO IV und haben maximal 50 Passagen in Kultur. Die CD95-Oberflächenexpression ist in allen getesteten Zelllinien identisch (Abb.V.2.2a und b). Jedoch können die Zelllinien aufgrund ihrer unterschiedlichen Apoptoseresistenz in 2 Gruppen unterteilt werden: Zum einen die semi-sensitiven (Abb.V.2.2a), die sich ähnlich wie die T98G-Zellen verhalten, und zum anderen die komplett resistenten Glioblastomzelllinien (Abb.V.2.2b).

Tabell 2. Klinische Daten zu den Patienten-Glioblastomzelllinien

NCH Nummer	Geschlecht	Alter	Diagnose
37	männlich	52	Gliosarcom WHO IV
82	männlich	56	GBM
89	weiblich	41	GBM
125	männlich	43	GBM
149	männlich	54	GBM
156	männlich	54	GBM
199	männlich	88	sekundäres GBM
270	männlich	71	GBM

a)



b)

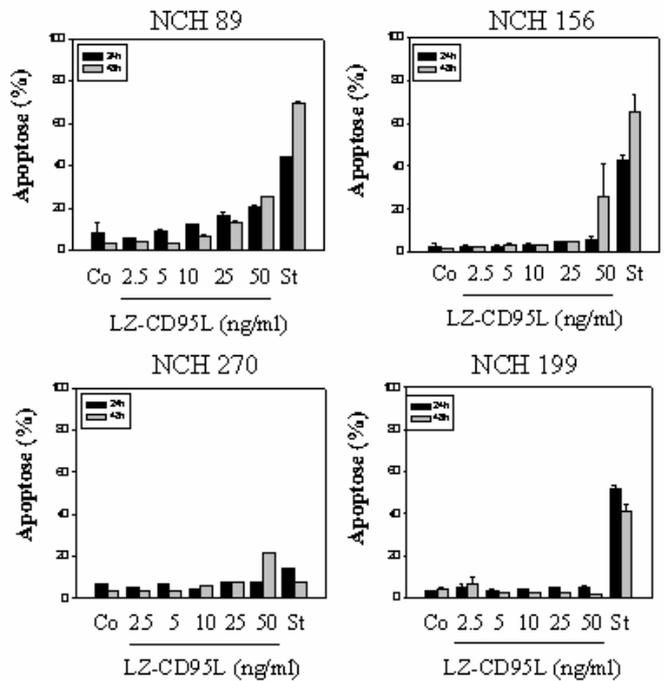
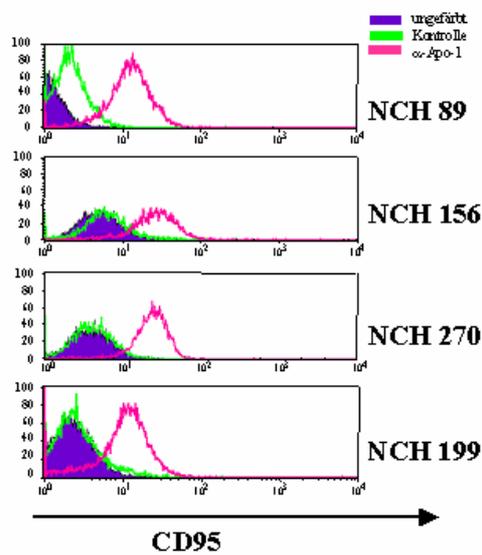


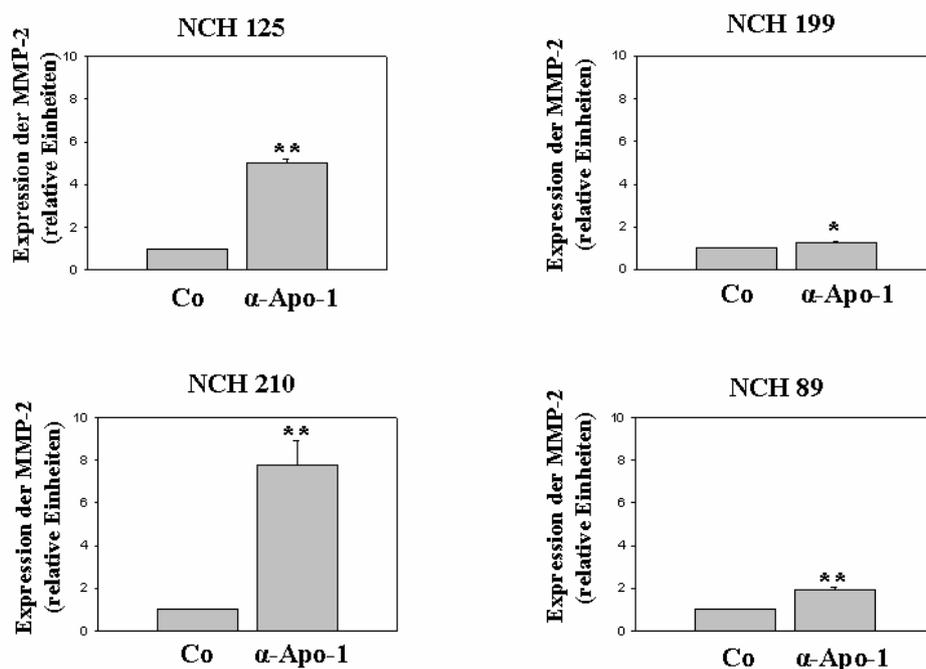
Abb. V.2.2 CD95-Expression und die Sensitivität gegenüber CD95-induzierter Apoptose in Zelllinien von Glioblastompatienten: a) und b) Die Zellen werden für die CD95-Färbung mit α -Apo-1 und einem Zweitantikörper der an Phycoerithrin gekoppelt ist, gefärbt und mittels FACS analysiert. Um bei diesen Zellen Apoptose zu messen, wird ein Nicoletti-Assay durchgeführt. Die Zellen werden mit den angezeigten

Konzentration an LZ-CD95L behandelt, und nach 24 h und 48 h wird der Zelltod mittels FACS bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm S.D. und repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

2.3 Aus Patienten stammende Glioblastomzelllinien zeigen nach Stimulation des CD95-Rezeptors einen Anstieg der Expression von Matrix-Metalloproteinasen

Für die weiteren Experimente werden vier Zelllinien ausgewählt. Davon sind zwei komplett resistent und zwei semi-sensitiv gegenüber CD95-induzierter Apoptose. semi-sensitiv sind Zellen, die erst bei relativ hohen Dosen des exogenen CD95L (5 bzw. 10 μ l/ml) sterben. Als erstes wird die Expression der MMP-2 und -9 nach Rezeptorstimulation detektiert. Die Zelllinien NCH 125 und 270 zeigen einen Anstieg der MMP-2 und -9 nach der Stimulation des CD95-Rezeptors verglichen mit der jeweiligen Kontrolle, während die NCH 199 nur einen Anstieg der MMP-9 aufweisen, nicht aber der MMP-2. Weder die Expression der MMP-2 noch der MMP-9 wird durch die Behandlung mit α -Apo-1 Antikörper in der NCH 89 Zelllinie induziert (Abb.V.2.3a und b).

a)



b)

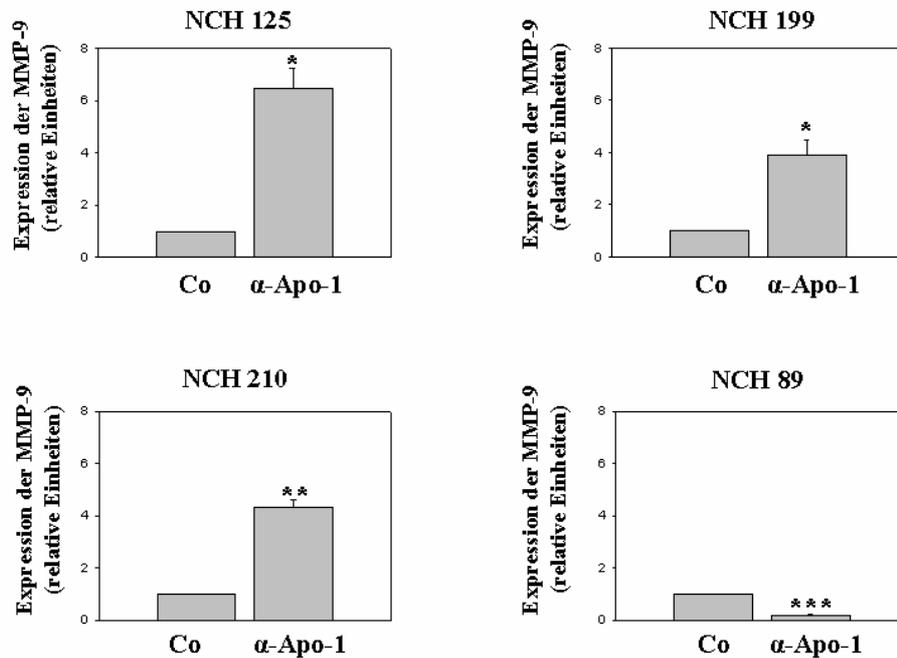


Abb. V.2.3 Induktion der MMP-2 und -9 nach Stimulierung des CD95-Rezeptors: a) und b) Die aus Patienten stammenden Glioblastomzellen werden auf Petrischalen ausplattiert und mit α -Apo-1 (1 μ g/ml) für 40 h behandelt. Mit der Real-Time PCR wird die Expression der MMP-2 und -9 nachgewiesen. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm S.E., * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, t-Test und repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

2.4 Tumorzelllinien von Glioblastompatienten zeigen eine erhöhte Migration nach CD95-Stimulierung

Das Migrationsverhalten wird für die Zelllinien NCH 125, 270 und 89 genauer untersucht. Die NCH 125- und 270-Zellen, die beide eine Hochregulierung der MMPs nach der Stimulierung des CD95-Rezeptors zeigen, zeigen auch eine deutliche Zunahme der Migration nach der Behandlung mit α -Apo-1 Antikörper bzw. LZ-CD95L nach 36 h. Die Migration ist durch die Präinkubation mit Nok1 komplett gehemmt (Abb.V.2.4). Die NCH 89-Zellen, die

keine Hochregulierung der MMPs nach Rezeptorstimulation zeigen, zeigen ebenfalls keine Zunahme der Migration nach dessen Stimulierung (Abb. V.2.4).

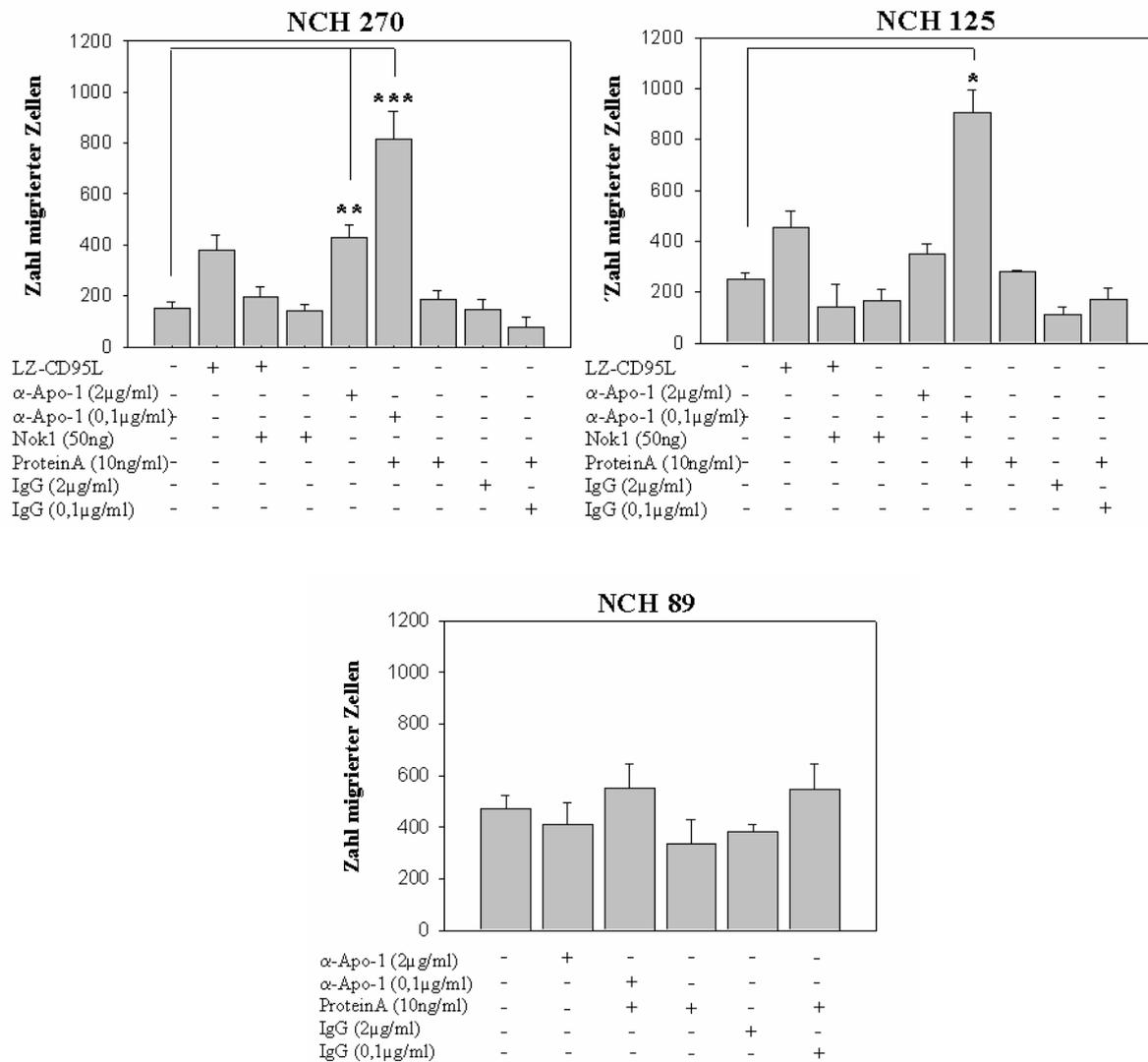


Abb. V.2.4 Die Stimulierung von CD95 induziert die Migration in Glioblastomzelllinien von Patienten:

NCH-Zelllinien (270, 125 und 89) werden nach dem Ausplattieren auf Migrations-Platten mit α-Apo-1 (2µg/ml), α-Apo-1 (0,1µg/ml) /ProteinA (1µl/ml), LZ-CD95L (1µl/ml), LZ-CD95L (1µl/ml)/Nok1 (50ng), Nok1 (50ng), ProteinA (10ng/ml), IgG (2µg/ml) und IgG (0,1µg/ml)/ProteinA (10ng/ml) für 36 h behandelt und anschließend die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Ergebnisse sind Mittelwerte angegeben als ± S.E. * p<0.05; ** p<0.001; *** p<0.0005, t-Test und repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

2.5 Expression des CD95/CD95L-System in Tumorgewebe

Wichtig für die klinische Relevanz der bisher dargestellten Daten ist es zu zeigen, dass das CD95/CD95L-System in Gewebe exprimiert ist. Die Expression wird mittels quantitativer Real-Time PCR detektiert. Fünf verschiedene Tumore (Tabelle 3) werden miteinander verglichen. Für die CD95-mRNA kann man bei vier Tumoren vergleichbare Werte feststellen, während der Tumor 356 eine 40-fach höhere Expression zeigt (Abb.V.2.5a). Die Varianz zwischen den einzelnen Tumoren für die CD95L-mRNA ist wesentlich höher (Abb. V.2.5b). Aus diesem Versuch kann jedoch eindeutig gezeigt werden, dass das CD95/CD95L-System in Tumoren vorhanden ist und somit den bisher gezeigten Daten eine physiologische Rolle zugeordnet werden kann.

Tabelle 3: Klinische Daten zu den Tumorproben

NCH Nummer	Geschlecht	Alter	Diagnose
NCH 160	männlich	58	GBM
NCH 277	weiblich	78	GBM
NCH 316	weiblich	72	GBM
NCH 325	männlich	31	GBM
NCH 356	männlich	67	GBM

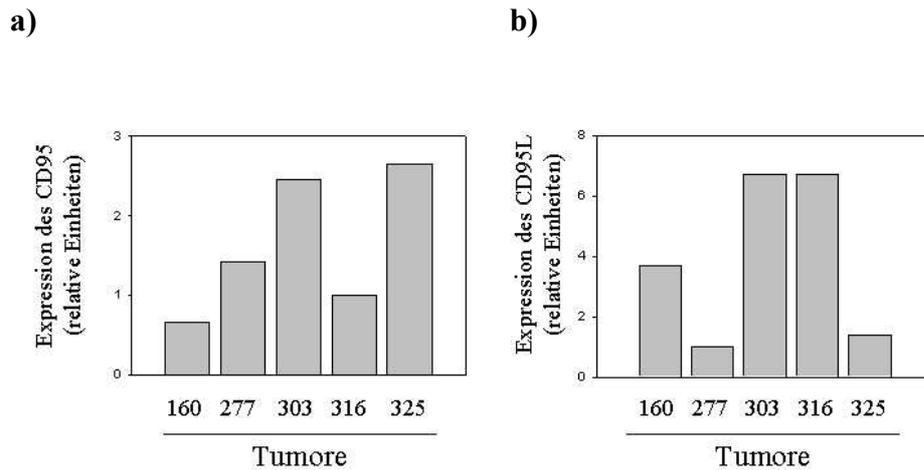


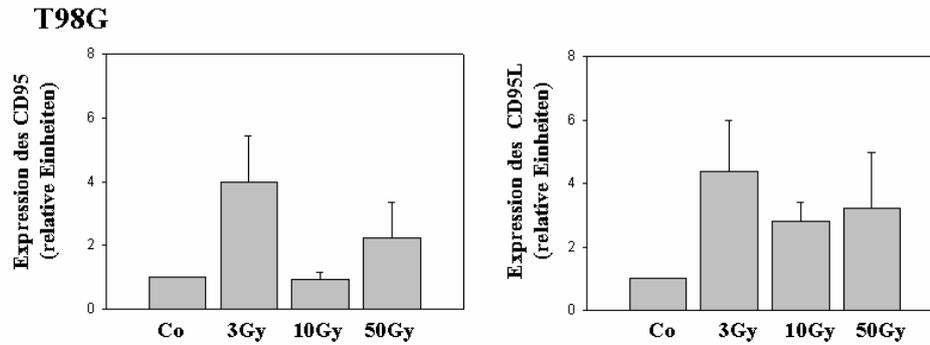
Abb. V.2.5 Die CD95- und CD95L-Expression in Tumorgewebe: a) und b) Aus dem tiefgefrorenen Tumorgewebe (160, 277, 316, 325 und 356) wird RNA isoliert und in der Real-Time PCR die Expression des CD95-Rezeptors und CD95-Liganden detektiert.

2.6 Klinische Relevanz des CD95/CD95L-Systems nach γ -Bestrahlung

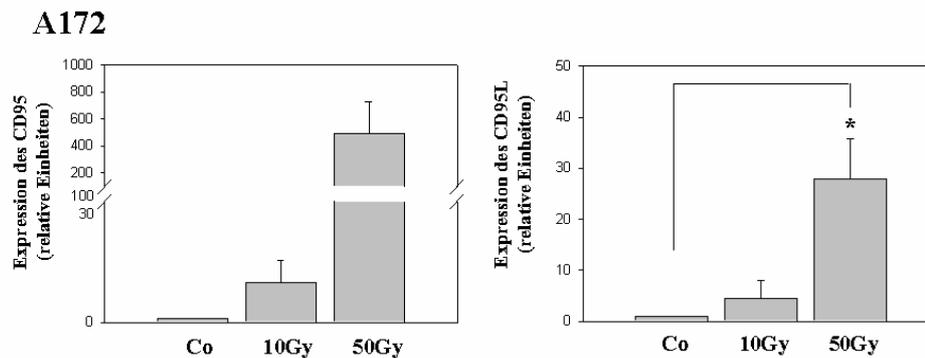
Das Hauptaugenmerk der Behandlung von Glioblastomen liegt derzeit auf dem operativen Eingriff und der anschließenden γ -Bestrahlung. Die Konsequenz der Bestrahlung ist die Hochregulierung des CD95/CD95L-Systems, was die Apoptosemaschinerie aktivieren soll. Deshalb wird zuerst die Hochregulierung des CD95-Rezeptors und -Liganden in zwei Glioblastomzelllinien (T98G und A172) nach Bestrahlung überprüft. Die A172-Zellen dienen als Positivkontrolle; bei ihnen ist die Hochregulation von CD95 und CD95L nach Bestrahlung bereits veröffentlicht (Fulda et al., 1998a). Sowohl die CD95-mRNA als auch die CD95L-mRNA steigt nach einer Strahlendosis von 3 Grey (3 Gy) in den T98G-Zellen auf ein 6- bis 8-faches an, relativ zu den Kontrollzellen (Abb.V.2.6a). Bei höheren Dosen fallen die mRNA-Level wieder ab. Die A172-Zellen hingegen zeigen bei einer hohen Strahlendosis von 50 Grey (50 Gy) eine Hochregulation der CD95-mRNA auf ein 500-faches und der CD95L-mRNA auf ein 30-faches relativ zu den unbestrahlten Kontrollen (Abb.V.2.6b). Die Resistenz dieser Zelllinien wird im Nicoletti-Assay deutlich. Die T98G-Zellen sterben nur bei einer sehr

hohen Dosis von 50 Gy, (35% vs. 3%; 50 Gy vs. Co), während die A172-Zellen komplett resistent bleiben (Abb.V.2.6c).

a)



b)



c)

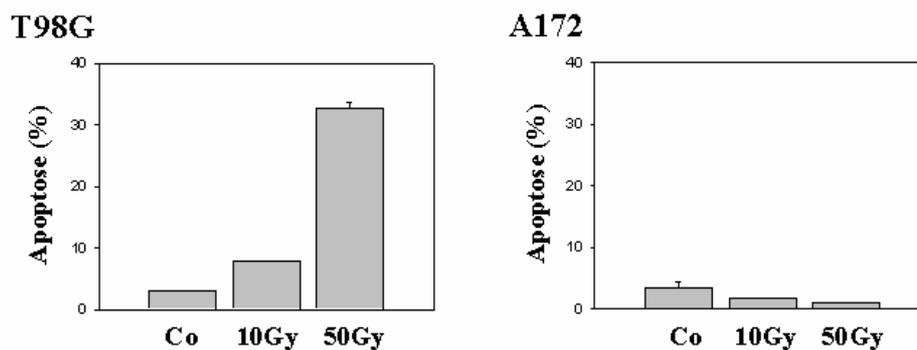
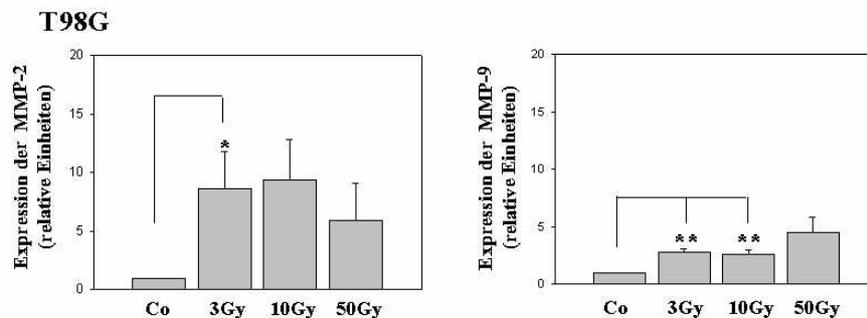


Abb. V.2.6 Durch γ -Bestrahlung induzierte Expression des CD95-Rezeptors und CD95-Liganden in Glioblastomzelllinien: a) und b) Die Zellen (T98G und A172) werden auf Petrischalen ausplattiert und am folgenden Tag mit unterschiedlichen Strahlendosen behandelt (3, 10 und 50 Gy). Nach 24 h wird mittels Real-Time PCR mRNA des CD95-Rezeptors und -Liganden gemessen. Ergebnisse sind Mittelwerte angegeben als \pm S.E. * $p < 0.05$, t-Test und repräsentieren drei unabhängige Experimente.

2.7 γ -Bestrahlung führt zur Transkription der Metalloproteinasen-2 und -9

Der nächste Abschnitt soll klären, ob die Hochregulierung des CD95/CD95L-Systems nach therapeutischer Bestrahlung, erstens zur Transkription der mRNA von Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 führt und zweitens, ob dadurch das Migrationsverhalten der Zellen verändert wird. Die Zelllinien werden unterschiedlichen γ -Strahlendosen ausgesetzt. Nach 36 h wird die Expression der MMP-2 und -9 in der Real-Time PCR gemessen. Die T98G-Zellen zeigen einen deutlichen Anstieg der MMP-2- und MMP-9-mRNA-Levels bei einer Strahlendosis von 3 Gy (Abb.V.2.7a). Bei höheren Strahlendosen fällt die Expression wieder ab. Dies korreliert mit der Zunahme an CD95- und CD95L-mRNA (Abb. V.2.6a). Die A172 zeigen ebenfalls einen 10-fachen Anstieg der MMP-2- und einen 400-fachen MMP-9 - mRNA, jedoch erst bei einer Strahlendosis von 50 Gy (Abb V.2.7b).

a)



b)

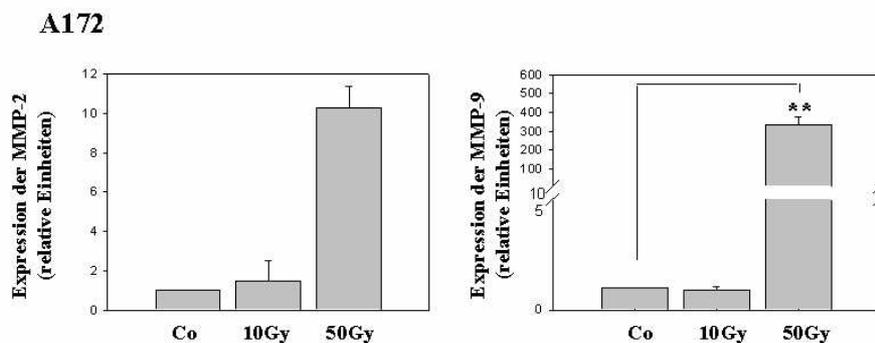


Abb. V.2.7 Aktivierung der MMP-2 und -9 nach therapeutischer Bestrahlung: a) T98G-Zellen und b) A172-Zellen werden mit den angegebenen Strahlendosen behandelt, und nach 36-40 h wird mittels real Time PCR die Expression der MMP-2 und -9 nachgewiesen. Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte \pm S.E. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, t-Test und repräsentieren drei unabhängige Experimente.

2.8 γ -Bestrahlung verstärkt die Migration resistenter, etablierter Glioblastomzellen

Bestätigt sich, dass nach therapeutischer Bestrahlung die Hochregulierung der MMPs zu einem invasiveren Phänotyp apoptoseresistenter Zellen führt, hätte dies für Patienten fatale Folgen. Die etablierte Zelllinie T98G wird wie zuvor mit 3 und 10 Gy bestrahlt und nach 24 h im Migrationsassay analysiert. Die Migration zeigt einen deutlichen Anstieg nach beiden Strahlendosen und kann mit Nok1 komplett gehemmt werden (Abb.V.2.8).

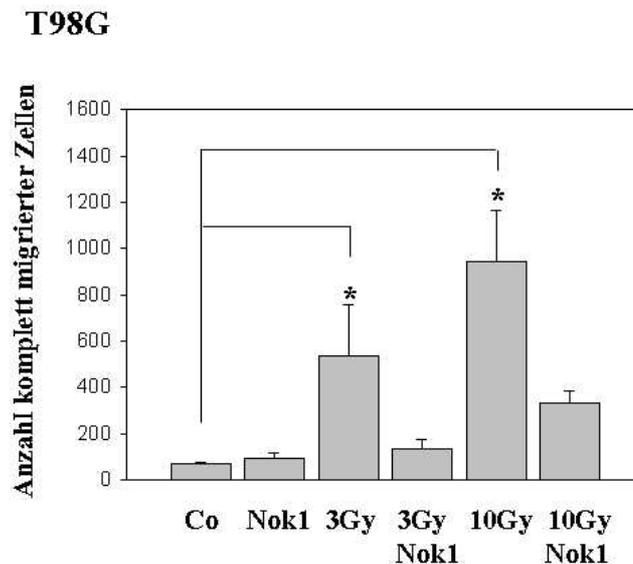


Abb. V.2.8 γ -Bestrahlung erhöht die Migration der T98G: T98G-Zellen werden mit 3 und 10 Gy bestrahlt, und nach 24 h werden sie auf Migrations-Platten ausplattiert. Nach weiteren 24 h wird das Migrationsverhalten untersucht. Mit Nok1 10 μ g werden die Zellen direkt nach der Bestrahlung behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte angegeben \pm S.E., * $p < 0.05$, t-Test und sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

2.9 γ -Bestrahlung erhöht die Migration in Zelllinien von Glioblastompatienten

Wie die T98G-Zellen werden auch die NCH 125, 270 und 89 auf ihr Migrationsverhalten nach γ -Bestrahlung untersucht. Nach unterschiedlicher Strahlenbehandlung (1, 3 und 10 Gy) kann man einen deutlichen Anstieg der Migration in den NCH 270 und 125 beobachten. Ein Höhepunkt ist bei einer Strahlendosis von 3 Gy zu erkennen (Abb.V.2.9). Bei den NCH 89 ist ebenfalls eine Zunahme der Migration zu erkennen, jedoch erst bei einer Dosis von 10 Gy. Der Migrationsanstieg ist CD95L-spezifisch und durch Nok1 blockierbar.

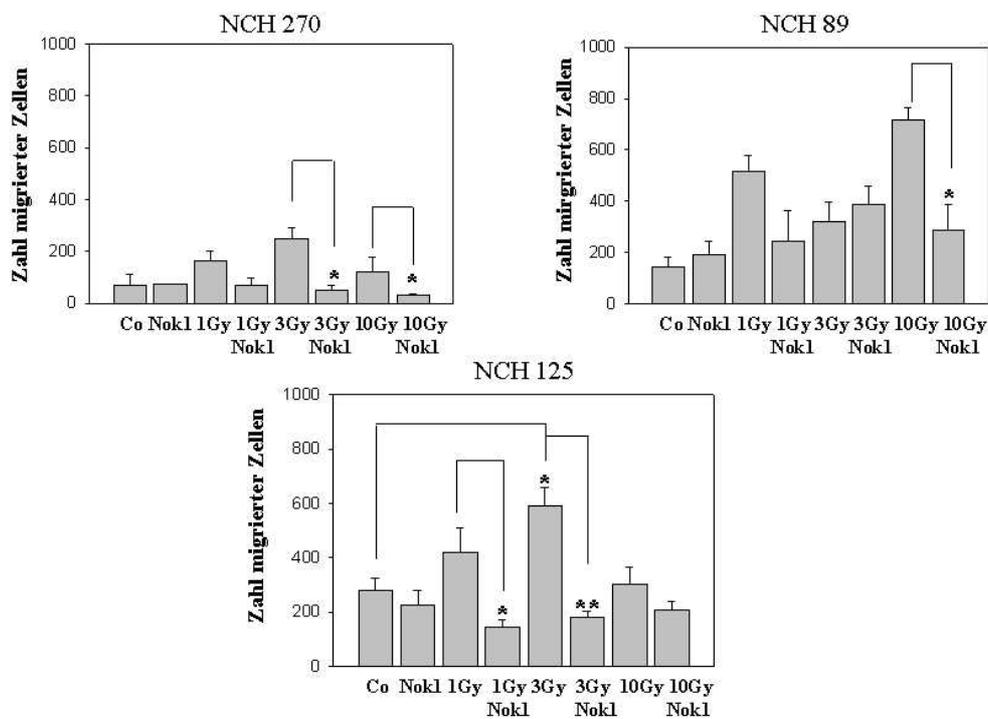


Abb. V.2.9 γ -Bestrahlung erhöht die Migration der aus Glioblastompatienten stammenden Zelllinien:

NCH- 270, 89 und 125 Zellen werden mit 1, 3 und 10 Gy bestrahlt, und nach 24 h werden sie auf Migrations-Platten ausplattiert, und nach weiteren 24 h wird das Migrationsverhalten untersucht. Mit Nok1 10 μ g werden die Zellen direkt nach der Bestrahlung behandelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte angegeben \pm S.E., * p<0.05, ** p<0.005, t-Test und sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

VI. Diskussion

1. Migration/Invasions-Modelle

In unserer Studie wurde gezeigt, dass viele Glioblastomzelllinien gegen CD95-vermittelte Apoptose resistent sind. Für unsere Untersuchungen standen uns drei etablierte Glioblastom-Zelllinien sowie elf aus Hirntumorpatienten stammende Astrozytom- Oligodendrogliom- und Glioblastom-Zelllinien zur Verfügung. Diese Zellen simulieren teilweise die *in vivo* Situation invadierender Hirntumore, speziell dann, wenn sie als sogenannte Spheroidkulturen kultiviert werden (Corcoran and Del Maestro, 2003;Farrell et al., 1987). Solche dreidimensionalen Modelle der Hirntumor-Invasion ermöglichen die Untersuchung des invasiven Verhaltens der Spheroide *in vitro*. Diese Bedingungen spiegeln die Dynamik der Tumorinteraktion mit dem Hirnparenchym wieder (Corcoran and Del Maestro, 2003;Tamaki et al., 1997). Faktoren, die an der Migration/Invasion maßgeblich beteiligt sind, einschließlich der Matrixkomponenten, der Oberflächenrezeptoren sowie auch des Zellbewegungs-Apparates, können eingehend untersucht werden (Bauman et al., 1999b;Bauman et al., 1999a;Bell et al., 1999;Tamaki et al., 1997). Des weiteren müssen die Zellen in einem dreidimensionalen Verbund die Fähigkeit besitzen ihre zellulären Verbindungen zu lösen, um als einzelne Zelle aus dem Spheroid invadieren zu können. In unserer Studie wurde dieses Modell genutzt um den Einfluss des CD95/CD95L-Systems auf das Invasionsverhalten der T98G und LN18 Spheroide zu untersuchen (Abb.1.3a und b). Neben dem dreidimensionalen Modell kam auch das zweidimensionale Migrationsmodell nach Boyden (1962) zum Einsatz. In diesem zweidimensionalen Assay wird die Gliomabewegung durch speziell mit Extrazellulären-Matrixkomponenten (Kollagen, Vitronectin, Fibronectin oder Matrigel) beschichtete Membranen beobachtet (Albini et al., 1987;Berens et al., 1994;Chicoine and Silbergeld,

1995). Der Vorteil dieses Systems ist die einfache und schnelle Nutzung sowie die rasche Analyse der Ergebnisse. In unserer Studie werden sowohl immortalisierte Zelllinien (T98G und LN18) sowie von Glioblastompatienten stammende Zelllinien (NCH) als Monolayer auf Kollagen beschichtete Boyden Kammern ausplattiert und die Migration nach der Stimulierung des CD95-Rezeptors beobachtet (Abb.V.1.5; Abb.V.1.6b und c; Abb.V.2.4; Abb.V.2.8 und Abb.V.2.9). Wir wählten Typ I Kollagen als Oberfläche aus, da es neben Fibronectin, Laminin und Heparansulfat Proteoglykanen eines der Bestandteile der ECM des zentralen Nervensystems (ZNS) darstellt. Durch die Nutzung beider Modelle konnten wir eine CD95-induzierte Migration/Invasion in T98G und NCH Zellen detektieren. Darüber hinaus konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Migration/Invasion und der Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen gezeigt werden (Abb.V.1.4; Abb.V.2.3a und b sowie Abb.V.2.7a und b). Neben den erwähnten Modellen sind für zukünftige Arbeiten physiologischere *in vitro* sowie *in vivo* Modelle vorgesehen. Beispiel für ein physiologisches *in vitro* Modell ist das sogenannte Konfrontationsmodell, bei dem normales Gewebe mit Tumorzellen in Kontakt gebracht wird (Mareel et al., 1979). Das gesunde Gewebe ist das Zielgewebe für die invadierenden Zellen und wird von diesen zerstört bzw. ersetzt. Dies wird allgemein auch bei bösartigen GBM beobachtet (Abb.VI.1).

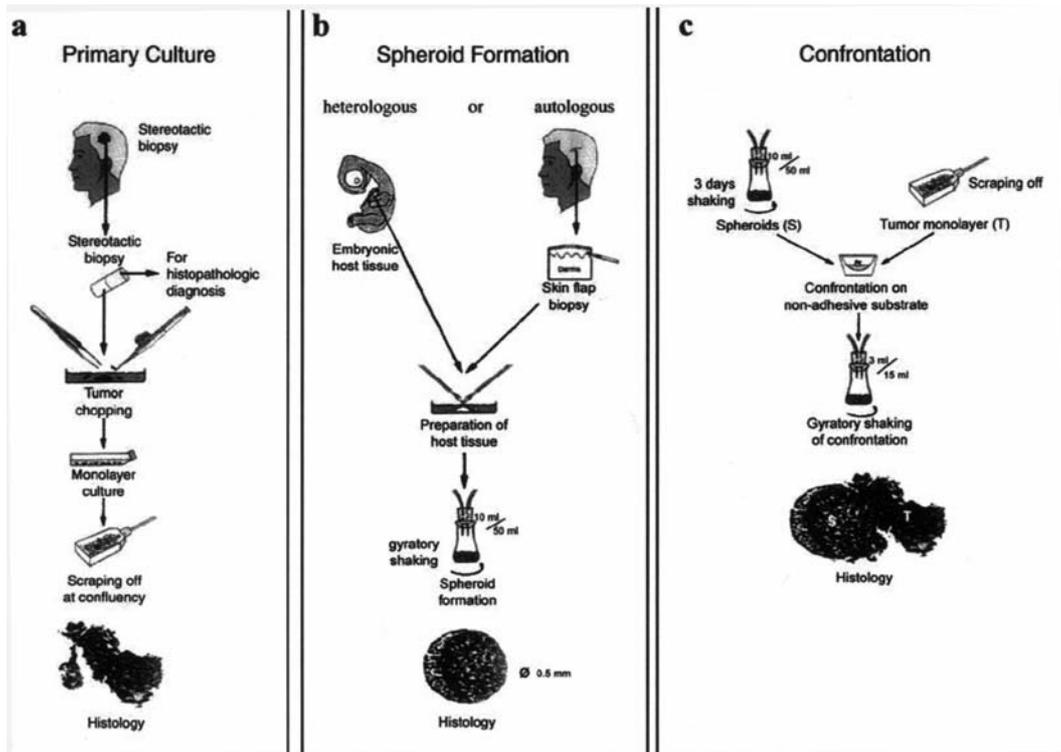


Abb.VI.1 Schematische Darstellung der unterschiedlichen *in vitro* Invasionsmodelle (Corcoran et al., 2003).

Für die *in vivo* Untersuchungen der Hirntumore stehen verschiedene Tiermodelle zur Verfügung. Entweder werden den Tieren neurokarzinogene Substanzen wie beispielsweise Methylnitrosurea (MNU) und Ethylnitrosurea (ENU) injiziert, um Tumore in neuronalem Gewebe zu induzieren, oder es werden Glioblastomzelllinien (C6, 9L und BT4 Rattenzelllinien) als sogenannte Xenotransplantate intracranial injiziert. Jedoch hat das letztgenannte Modell den Nachteil, dass die Tumore zwar wachsen, aber nicht wie im menschlichen ZNS in das Hirnparenchym invadieren (Peterson et al., 1994). Deshalb wurden diese Modelle weiterentwickelt, so dass immer häufiger transgene Tiere (*ras*, *Akt*, *EGFR* oder *GFAP*) eingesetzt werden, da auf diese Weise erzeugte Tumore vergleichbare Eigenschaften humaner Glioblastome aufweisen (Holland, 2000; Holland et al., 2000b; Holland et al., 2000a).

Table 1. Model systems used for migration and invasion studies of gliomas

<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
<i>Migration assays</i>	1. Spontaneous tumors (in dogs)
1. Monolayer migration assay	2. Induction of brain tumors
2. Spheroid migration assay	Carcinogen induced tumors
Permanent glioma cell lines	Virus-induced tumors
Biopsy spheroids	3. Models based on cell and tissue transplantation
<i>Invasion assays</i>	Synergic transplantation models
1. Matrigel invasion assay	Xenografts
2. Co-culture system	4. Transgenic models
Fetal rat brain aggregates	
Chic heart fragments	
Optic nerve	
Brain slices	

Tabelle 1: Modellsysteme für die Untersuchung der Invasion und Migration von Glioblastomas (Tysnes et al., 1996).

2. Die Expression des CD95 und CD95L in Glioblastomas

Im Gehirn können die verschiedenen Zelltypen ganz unterschiedlich auf die Stimulierung des CD95-Rezeptors reagieren. In dorsalen Ganglienzellen (DRGs) führt der CD95L zum Auswachsen des Axons (Desbarats et al., 2003), während in embryonalen, hippocampalen und corticalen Neuronen der CD95L eine verstärkte Verzweigung der neuronalen Fortsätze herbeiführt (Zuliani et al., 2005). Deshalb zeigen Tiere, die einen nicht funktionellen CD95-Rezeptor (*lpr*) bzw. einen nicht funktionellen CD95L (*gld*) besitzen, eine reduzierte Verzweigung ihrer neuronalen Fortsätze verglichen mit WT-Tiere. Im Gegensatz zu den embryonalen Neuronen, sind Motoneuronen und verletzte adulte Neuronen, wie sie bei der Ischämie oder Querschnittlähmung auftreten, sensitiv für die CD95-vermittelte Apoptose (Demjen et al., 2004; Martin-Villalba et al., 1999; Raoul et al., 1999) (AbbVI.2).

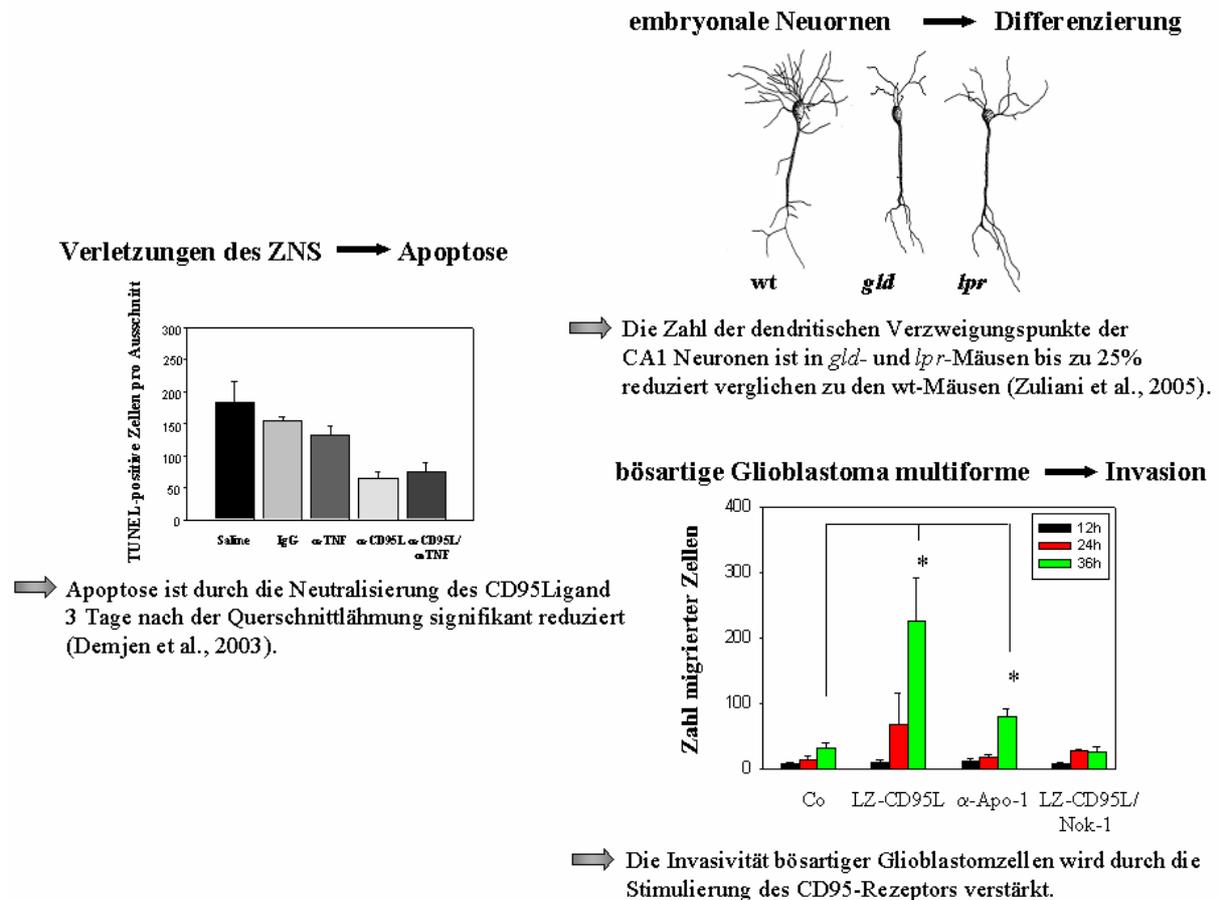


Abb. VI.2 Die unterschiedlichen Rolle des CD95/CD95L-Systems im ZNS

Weiterhin ist das CD95/CD95L-System bei einer Vielzahl maligner Tumore exprimiert. Viele dieser Tumore sind sensitiv gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose, deshalb wird das CD95/CD95L-System als spezifisches Tumorangriffsziel angesehen. Frühere Studien haben auch die Expression des CD95-Rezeptors *in vivo* mit dem Malignitätsgrad verschiedener ZNS Tumore korreliert (Ehrmann, Jr. et al., 2000; Frankel et al., 1999; Husain et al., 1998; Tohma et al., 1998). Jedoch steigt die Zahl der Tumore, die trotz der CD95-Oberflächenexpression eine Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose aufweisen, stetig an. Maligne Hirntumore, eingeschlossen GBMs, Medulloblastome sowie Neuroblastome, exprimieren CD95, ihre Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose ist jedoch sehr unterschiedlich (Choi et al., 2001; Frei et al., 1998; Weller et al., 1994). Ausserdem kann die Stimulierung des CD95-

Rezeptors zur Expression proinflammatorischer und Angiogenese fördernder Moleküle in bösartigen Astrozytomen führen (Choi et al., 2001; Choi et al., 2002). Dadurch können Tumorzellen vor dem CD95-vermittelten Zelltod geschützt oder sogar das Tumorwachstum durch die Angiogenese gefördert werden (Shinohara et al., 2000).

Neben dem CD95-Rezeptor exprimieren die meisten bösartigen Hirntumore auch einen funktionellen CD95L. Sie können damit vielleicht das körpereigene Immunsystem umgehen, indem sie CD95-positiven T-Zellen, die das Tumorgewebe infiltrieren, durch Apoptose abtöten. Dies wird als „tumor counter attack“ Theorie bezeichnet (Walker et al., 1997). Die Expression des CD95/CD95L-Systems konnte auch in unserer Studie in allen Zelllinien und Tumoren sowohl auf Protein als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Bei den Tumoren müssen wir berücksichtigen, dass die Expression des CD95 und CD95L durch eventuell infiltrierende Lymphozyten ebenfalls erhöht sein könnte (Abb.V.2.5a und b). Jedoch wird anhand unserer Daten deutlich, dass die Höhe der Rezeptorexpression nicht mit der Sensitivität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose korreliert. Denn die semi-sensitiven T98G-, sowie die sensitiven LN18-Zellen zeigen eine identische CD95-Oberflächenexpression (Abb.V.1.2a). Jarad und seine Kollegen zeigten, dass das CD95-System auch Einfluss auf die Zellmigration haben kann. In dieser Studie wurden nephrogene Epithelzellen mit einem agonistischen Antikörper gegen CD95 behandelt, was zu einer erhöhten Migrationsaktivität führte. Hervorgerufen wurde die Migration durch die Hochregulierung der $\alpha_v\beta_8$ Integrin Expression, die mit der Vitronectin bedingten Migration korreliert (Jarad et al., 2002). Barnhart und seine Kollegen konnten als erste zeigen, dass die Stimulierung des CD95-Rezeptors auch in Tumorzelllinien (Eierstock-, Brust-, Haut-, Lunge- und Nierenkrebszellen) eine Zunahme der Migration/Invasion auslöst, anstatt Apoptose zu induzieren (Barnhart et al., 2004). Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass resistente Glioblastomzelllinien (T98G sowie die NCH Zelllinien) einen deutlichen Anstieg der Migration nach der Stimulierung des CD95-Rezeptors aufweisen

(Abb.V.1.3; Abb.V.1.5; Abb.V.1.6b; Abb.V.1.8; Abb.V.2.4 und Abb.V.2.8). Die LZ-CD95L-vermittelte Migration konnte mit dem neutralisierenden Antikörper Nok1 (gegen CD95L) auf basale Werte reduziert werden. (Abb. V.1.5; Abb.V.1.6b; Abb. V.2.4 und Abb.V.2.8). Im Unterschied zu dem in Barnhart et al., (2004) verwendeten Migrationsmodell wird in unserem Modell kein zusätzlicher Migrationsstimulus (Serum) neben CD95L benötigt. Der Grund hierfür könnte die charakteristische konstitutive invasive Neigung der Glioblastomzellen sein.

3. Signalkaskade der CD95L-induzierten Invasion/Migration

Die Aktivierung der klassischen Signalkaskade des CD95-Rezeptors schließt die Formierung des DISC, die Spaltung und Aktivierung von Caspasen und deren Substrate, was letztlich zum Zelltod führt, ein. In unserem Fall sind die Zellen jedoch resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose (Abb.V.1.1a) und zeigen stattdessen einen invasiven Phänotyp. Barnhart und seine Kollegen führten den CD95-induzierten Migrationsanstieg auf die Aktivierung drei parallel ablaufender Signalwege zurück, die die antiapoptotische Signalkaskade in Tumorzellen auslösen: Die Aktivierung der Caspase-8, ERK1/2 und NFkappaB. Die Aktivierung der Caspase-8 ist für die ansteigende Migration/Invasion einiger Krebszellen verantwortlich. Durch ihre Hemmung kann die CD95-induzierte Invasion komplett blockiert werden (Barnhart et al., 2004). In unseren Glioblastomzelllinien scheint die Aktivierung von Caspasen keinen Einfluss auf die CD95-induzierte Migrationssignalkaskade zu haben. Nach der Stimulierung des CD95-Rezeptors zeigen nur die sensitiven LN18-Zellen eine Prozessierung der Caspase-8 (p41/43), während die resistenten T98G-Zellen keine Spaltung der Caspase-8 zeigen (Abb.V.1.9a). Darüber hinaus bleibt auch die Phosphorylierung von GSK3 β nach der Hemmung der Caspasen mit zVAD-fmk, einem spezifischen Caspase-Inhibitor in den T98G-Zellen, bestehen (Abb.V.1.9b). Das gleiche trifft auch für die Aktivierung von ERK1/2 zu: Glioblastomzelllinien zeigen keine

Phosphorylierung des Moleküls nach CD95-Stimulierung, verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass auch die Hemmung der ERK-Aktivität mit dem spezifischen Inhibitor PD 98059 die Migration nicht beeinflusst (Abb.V.1.8). Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen stehen die Studien von Desbarats (2003) und Barnhart (2004), wo die Aktivierung von ERK sowohl als Schlüsselereignis des CD95-induzierten Auswachsens der Neuriten (Desbarats et al., 2003), als auch der CD95-induzierten Invasion verschiedener Tumorzelllinien angesehen wird (Barnhart et al., 2004). In letzterem Fall führt die Hemmung von ERK zur Blockierung der Invasion. In unserem Glioblastom-Modell führt die CD95-induzierte Migrations-Signalkaskade über die Aktivierung der Integrin-Linked-Kinase (ILK), AKT zur Inhibierung von GSK3 β (Abb.V.1.5, Abb.V.1.6 und Abb.V.1.7). Dieser ist in der Abbildung VI.3). schematisch dargestellt.

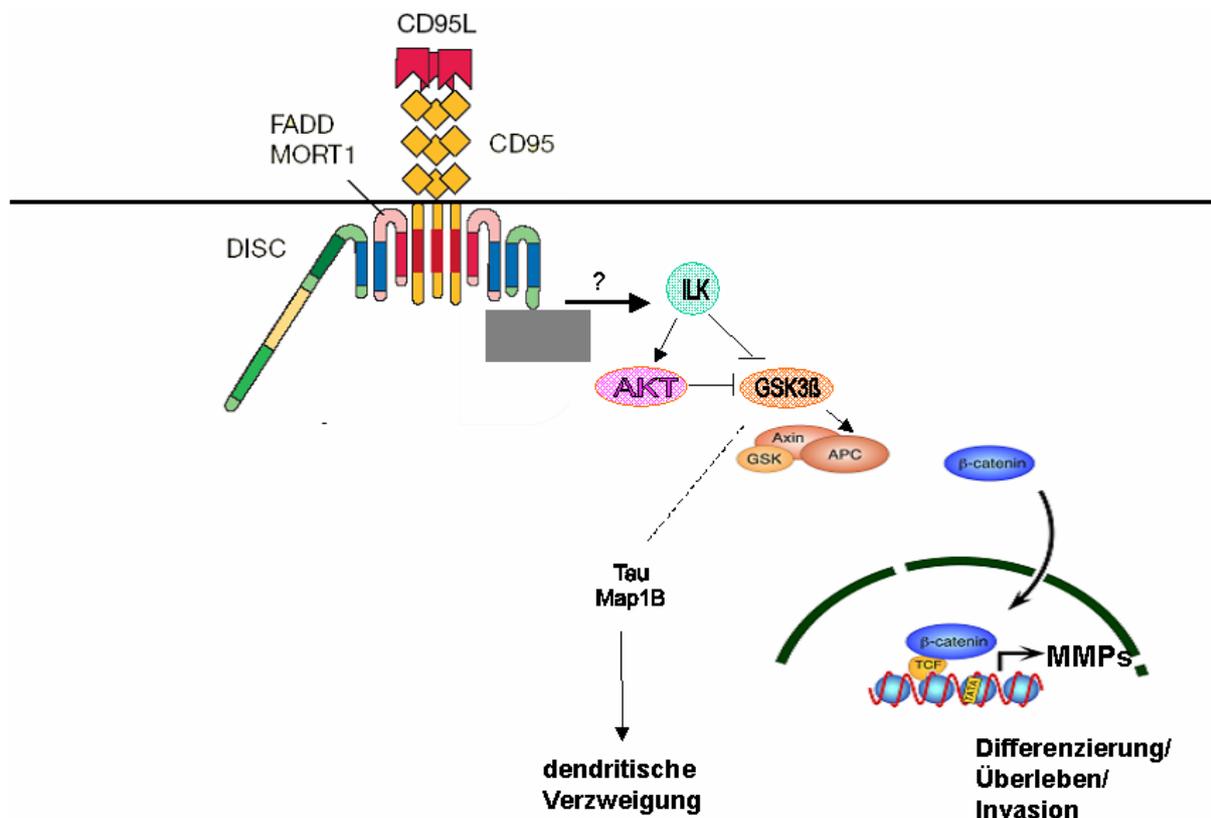


Abb. VI.3 Anti-apoptische Signalwege unterhalb des CD95-Rezeptors

Die Aktivierung von ILK und die dadurch ausgelöste Inhibierung von GSK3 β wurde bereits von Troussard und ihren Kollegen bei invadierenden Glioblastomzelllinien beobachtet (Troussard et al., 1999). Des weiteren konnten sie zeigen, dass die Inhibierung von GSK3 β zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führte und somit die Transkription der Matrix-Metalloproteinasen -2 und -9 verstärkte (Troussard et al., 2000a). Die angrenzende 5'-Sequenz des MMP-9-Promotors enthält neben der AP-1-Bindungsstelle auch Bindungsstellen für NF κ B, SP1 und AP-2 (Sato et al., 1993). Die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen ist für die Invasion absolut notwendig, um die extrazelluläre Matrix zu verdauen (Abb.VI.4). Die Expression der MMP-9 ist in Glioblastomzellen signifikant erhöht, verglichen mit normalem Gehirngewebe und mit Tumoren, die ein geringeres Invasionspotential aufweisen (Rao, 2003). MMP-9 defiziente Glioblastomzellen zeigen einen deutlich reduzierten invasiven Phänotyp *in vitro* und *in vivo* (Rao, 2003).

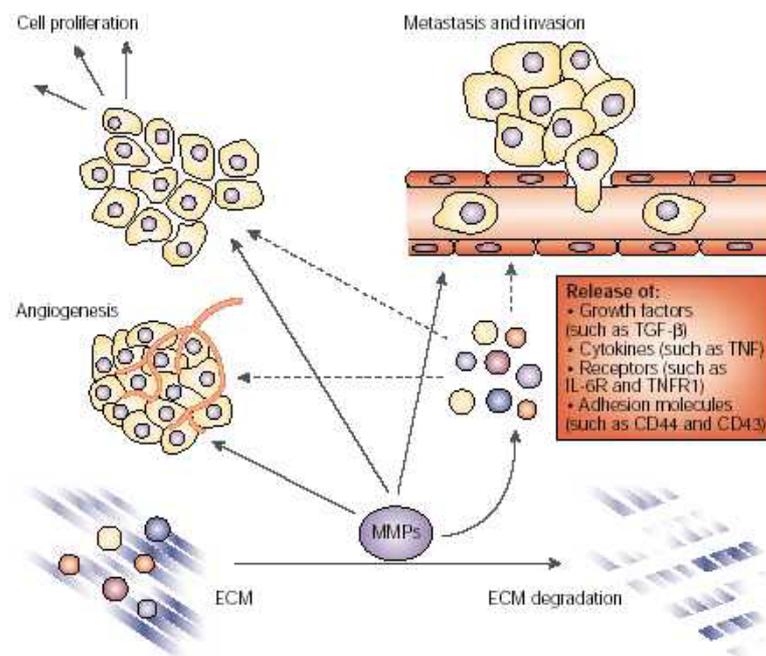


Abb. VI.4 Metalloproteinase unterstützen das Wachstum und die Invasion von Krebszellen (Rao, 2003).

Auch die in unserer Studie verwendeten Glioblastomzelllinien zeigen nach der Stimulierung des CD95-Rezeptors einen Anstieg der Migration/Invasion, die auf die Hochregulation der MMP-2 und -9 zurückzuführen ist (Abb.V.1.4 und Abb.V.2.3). Wie jedoch AP-1 aktiviert wird ist unklar. Möglicherweise erfolgt die Aktivierung über β -Catenin. Dieses Molekül liegt zusammen mit „Adenomatous Polyposis Colon“ (APC), einem Tumorsuppressorprotein, Axin und GSK3 β in einem Multiproteinkomplex im Zytoplasma vor. In unstimulierten Zellen phosphoryliert GSK3 β β -Catenin, dadurch wird das Protein für den Abbau im Proteasom markiert (Nateri et al., 2005). Durch die Inhibierung von GSK3 β wird dieser Multiproteinkomplex instabil, β -Catenin wird dephosphoryliert und akkumuliert im Zytoplasma, bevor es in den Nukleus wandert. Dort fungiert es als Kofaktor der Transkriptionsfaktorfamilie T-cell factor/lymphoid enhancing factor (TCF/Lef) (Giles et al., 2003;Reya and Clevers, 2005). Diese Translokation konnten wir nach der Behandlung mit α -Apo-1 in den T98G-Zellen durch Immunfluoreszenzbilder nachweisen (Abb.V.1.10b). GBMs weisen einen größeren zytoplasmatischen Pool an unphosphoryliertem β -Catenin auf (Herold-Mende, persönliche Auskunft). Eine kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt diese Hypothese. C-Jun ist eine Komponente des AP-1 Transkriptionskomplexes und wurde als meistinduziertes TCF/ β -Catenin-Zielgen identifiziert (Mann et al., 1999;Staal et al., 2004). Außerdem wurde phosphoryliertes c-Jun als Interaktionspartner von TCF4 detektiert und reguliert auf diesem Weg wahrscheinlich die Darmkrebs-Tumorgenese durch das Einschließen des JNK und GSK Signalweges. Wir behaupten, dass eine hohe basale Aktivität von ERK, JNK und GSK3 β die CD95-kanzerogene Aktivität bestimmt. Insofern konnten wir zeigen dass höhere basale GSK3 β Level, aber nicht die Höhe der CD95-Oberflächenexpression, positiv mit der CD95-induzierten Migration korreliert (nicht gezeigte Daten). Dennoch sollte eine größere Anzahl der aus Patienten stammenden Glioblastomzellkulturen und Tumore auf die basale Phosphorylierung von GSK3 β getestet werden.

4. γ -Bestrahlung und Chemotherapie führen zu einer Hochregulierung des CD95/CD95L-Systems

Die standardmäßige Therapie bei Hirntumoren ist, wie bereits erwähnt, die operative Entfernung des Tumors und eine anschließende Strahlentherapie, die zusätzlich mit einer Chemotherapie gekoppelt sein kann. Die Strahlentherapie ist seit den 80er Jahren eine der wichtigsten Therapien, die zu einer vielleicht geringeren Verlängerung des Überlebens bei Patienten mit bösartigen Hirntumoren führt. In der Regel wird die Strahlentherapie zwei bis vier Wochen nach der Operation angewendet. Die meist angewandte Form der Bestrahlung ist die Röntgen (X -) Bestrahlung. Diese kann direkt wirken, d.h. die Atome der Zielzelle werden direkt von den Strahlen getroffen, was zu einem hohen linearen Energietransfer führt. Daneben kann auch ein indirekter Effekt erzielt werden. Hierbei werden Moleküle innerhalb der Zelle von der Strahlung betroffen (z.B. Wasser). Dies führt zur Bildung freier Radikale die einen sekundären Schaden auslösen. Neben der normalen X -Bestrahlung kommt auch eine sogenannte Teilchen-Therapie zum Einsatz. Dabei werden Neutronen und Protonen eingesetzt. Der Vorteil dieser Form der Strahlentherapie ist eine direkte lokale Strahlendosis. Ausgehend von dieser klassischen Strahlentherapie werden immer wieder neue Modifizierungen entwickelt. So werden die Zellen beispielsweise durch Chemikalien Bestrahlungs-sensitiv gemacht, um einen besseren therapeutischen Effekt zu erzielen. Jedoch ist bis heute keine deutliche Verbesserung der Therapie sichtbar (Burton and Prados, 2000). Ziel dieser Therapien ist es, noch vorhandene Tumorzellen zu zerstören. Die therapeutische Strahlungs-dosis sind 60 Gy, normalerweise verabreicht in täglichen Dosen von 180 bis 200 cGy für etwa sechs Wochen. Die zu bestrahlende Region wird in der Regel durch Magnet-Resonanz-Imaging (MRI) detektiert und auf 2-3 cm ausgeweitet. Diese Form der Bestrahlung wurde basierend auf dem Wissen entwickelt, dass die Wiederkehr des Tumors in 80% bis

90% der Fälle 2 cm neben dem ursprünglichen Tumorherd auftritt (Burton and Prados, 2000). Sowohl durch die Strahlentherapie als auch durch die chemotherapeutische Behandlung wird Apoptose in sensitiven Zielzellen durch Induktion der Expression der Todesliganden wie beispielsweise CD95L oder „TNF-related apoptosis inducing ligand“ (TRAIL) hervorgerufen (Fisher, 1994; Meyn et al., 1996). Das CD95/CD95L-System wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als Hauptauslöser des medikamentös-induzierten Zelltodes in Leukämien und soliden Tumoren identifiziert (Friesen et al., 1997; Fulda et al., 1997). Beispielsweise induziert die Behandlung mit Doxorubicin und γ -Bestrahlung den Zelltod in Medulloblastomen, nicht aber in resistenten Glioblastomzellen (Fulda et al., 1998b). In dieser Studie konnte auch die Hochregulation des CD95 und CD95L nach γ -Bestrahlung und Chemotherapie gezeigt werden. Auch in unserer Studie ist ein signifikanter Anstieg der CD95 und CD95L mRNA-Expression nach γ -Bestrahlung detektierbar (Abb.V.2.6a und b). Dieser Anstieg löst jedoch in resistenten Glioblastomzelllinien keine Apoptose aus (Abb.V.2.6c), sondern induziert gleichermaßen, wie zuvor mit dem exogenen CD95L (LZ-CD95L) beobachtet, Migration bzw. Invasion. Das Migrationspotential wird durch die γ -Bestrahlung verstärkt. So bekommen die NCH 89-Zellen, die mit der exogenen Stimulierung des CD95-Rezeptors keinen Anstieg der Migration zeigen, bekommen durch die endogene Hochregulation des CD95/CD95L-Systems ein deutlich höheres Migrationspotential als die unbestrahlten Kontrollzellen (Abb.V.2.9). Ein signifikanter Anstieg der Migration kann auch in den etablierten T98G-Zellen sowie den restlichen Glioblastomzellen (NCH 125 und 270), bereits bei einer Strahlendosis von 3 Gy detektiert werden (Abb.V.2.8 und Abb.V.2.9). Dieser Anstieg ist in allen Zelllinien auf die Expression der MMP-9 und MMP-2 zurückzuführen. Der beobachtete Migrationsanstieg ist CD95L-spezifisch, da er mit dem neutralisierenden Antikörper gegen CD95L (Nok1) komplett gehemmt werden kann. Deshalb kann möglicherweise ein zusätzlicher Anstieg des CD95-Rezeptors oder eine Veränderung der allgemeinen Kinaseaktivität diese Zellen für die CD95-induzierte Migration sensibilisieren. In dieser

Hinsicht ist die therapeutische X-Bestrahlung, wie sie beispielsweise bei vielen Krebsarten im Kindesalter angewendet wird, bisher der einzige Faktor, der eindeutig mit einem erhöhten Hirntumorrisiko in Verbindung gebracht werden kann. Die Hirntumore einschließlich der Glioblastome treten häufig zehn Jahre nach der Therapie auf (Ohgaki and Kleihues, 2005).

Diese Ergebnisse sollten Folgen für die Strahlenbehandlung von Patienten haben, auf der Grundlage der hierbei gewonnen Erkenntnissen wäre es empfehlenswert, Tumore nach der operativen Entnahme auf ihre Reaktion gegenüber CD95-Stimulierung zu testen, bevor der Patient der anschließenden Strahlentherapie unterzogen wird. Je nach Testergebnis sollte abgewogen werden, ob die klassische Strahlentherapie oder eventuell eine neue Therapieform Anwendung findet. Alternative Therapien könnten die herkömmliche Strahlentherapie mit Inhibitoren für die CD95-induzierte Migration, wie z.B. dem ILK-Hemmer (KP-SD1) oder aber mit Reagenzien, die die Zellen für apoptotische Stimuli sensitivieren, koppeln. Erste Hinweise, dass dies ein erfolgversprechender Schritt sein könnte zeigen Glioblastomzellen, die Caspase-9 überexprimieren. Nach der Bestrahlung wird in diesen Zellen die Caspase-9 aktiviert, dies führt zu einer Blockade der Invasion und der Angiogenese (Yanamandra et al., 2004). Die Schwerionentherapie könnte ebenfalls eine Alternative zur bisherigen Standardtherapie darstellen. Die Partikeltherapie mit Schwerionen ist ein sehr präzises und biologisch hochwirksames Therapieverfahren. Über eine Beschleunigeranlage werden die Schwerionen auf eine sehr hohe Geschwindigkeit gebracht und in den Tumor geschossen. Dort fügen die Schwerionen den Tumorzellen irreparable Schäden zu. Durch die exakt berechenbare Reichweite und mithilfe einer millimetergenauen Steuerung lässt sich der Tumor punktgenau bestrahlen, wodurch das umliegende gesunde Gewebe geschont wird. Möglicherweise wird bei dieser Strahlenform das CD95/CD95L-System nicht aktiviert. Dies muß aber noch getestet werden. Sollte dies der Fall sein, würde sich die Gefahr, dass resistente Zellen gegenüber diesem System mit einem Anstieg der Migration/Invasion

reagieren könnten, verringern. Um diese Theorie zu überprüfen, sind gezielte Vorversuche mit Patientenmaterial notwendig.

VII. Referenzliste

1. Albini,A., Iwamoto,Y., Kleinman,H.K., Martin,G.R., Aaronson,S.A., Kozlowski,J.M., and McEwan,R.N. (1987). A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells *Cancer Res.* *47*, 3239-3245.
2. Ashkenazi,A. and Dixit,V.M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors *Curr.Opin.Cell Biol.* *11*, 255-260.
3. Barnhart,B.C., Legembre,P., Pietras,E., Bubici,C., Franzoso,G., and Peter,M.E. (2004). CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells *EMBO J.* *23*, 3175-3185.
4. Bauman,G.S., Fisher,B.J., McDonald,W., Amberger,V.R., Moore,E., and Del Maestro,R.F. (1999a). Effects of radiation on a three-dimensional model of malignant glioma invasion *Int.J.Dev.Neurosci.* *17*, 643-651.
5. Bauman,G.S., MacDonald,W., Moore,E., Ramsey,D.A., Fisher,B.J., Amberger,V.R., and Del Maestro,R.M. (1999b). Effects of radiation on a model of malignant glioma invasion *J.Neurooncol.* *44*, 223-231.
6. Belien,A.T., Paganetti,P.A., and Schwab,M.E. (1999). Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter *J.Cell Biol.* *144*, 373-384.
7. Bell,H.S., Wharton,S.B., Leaver,H.A., and Whittle,I.R. (1999). Effects of N-6 essential fatty acids on glioma invasion and growth: experimental studies with glioma spheroids in collagen gels *J.Neurosurg.* *91*, 989-996.
8. Bellail,A.C., Hunter,S.B., Brat,D.J., Tan,C., and Van Meir,E.G. (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion *Int.J.Biochem.Cell Biol.* *36*, 1046-1069.
9. Belot,N., Rorive,S., Doyen,I., Lefranc,F., Bruyneel,E., Dedecker,R., Micik,S., Brotchi,J., Decaestecker,C., Salmon,I., Kiss,R., and Camby,I. (2001). Molecular characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features *Glia* *36*, 375-390.
10. Benjamin,R., Capparella,J., and Brown,A. (2003). Classification of glioblastoma multiforme in adults by molecular genetics *Cancer J.* *9*, 82-90.
11. Berens,M.E., Rief,M.D., Loo,M.A., and Giese,A. (1994). The role of extracellular matrix in human astrocytoma migration and proliferation studied in a microliter scale assay *Clin.Exp.Metastasis* *12*, 405-415.
12. Bhardwaj,A. and Aggarwal,B.B. (2003). Receptor-mediated choreography of life and death *J.Clin.Immunol.* *23*, 317-332.
13. Bigner,D.D., Brown,M., Coleman,R.E., Friedman,A.H., Friedman,H.S., McLendon,R.E., Bigner,S.H., Zhao,X.G., Wikstrand,C.J., Pegram,C.N., and . (1995).

- Phase I studies of treatment of malignant gliomas and neoplastic meningitis with ¹³¹I-radiolabeled monoclonal antibodies anti-tenascin 81C6 and anti-chondroitin proteoglycan sulfate Me1-14 F (ab')₂--a preliminary report *J.Neurooncol.* *24*, 109-122.
14. Blanchard,H., Kodandapani,L., Mittl,P.R., Marco,S.D., Krebs,J.F., Wu,J.C., Tomaselli,K.J., and Grutter,M.G. (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis *Structure.Fold.Des* *7*, 1125-1133.
 15. Boldin,M.P., Varfolomeev,E.E., Pancer,Z., Mett,I.L., Camonis,J.H., and Wallach,D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* *270*, 7795-8.
 16. Bredesen,D.E. (1995). Neural apoptosis. *Ann.Neurol.* *38*, 839-851.
 17. Bredesen,D.E. (1996). Genetic control of neural cell apoptosis. *Perspect.Dev.Neurobiol.* *3*, 101-109.
 18. Burton,E.C. and Prados,M.D. (2000). Malignant gliomas. *Curr.Treat.Options.Oncol.* *1*, 459-468.
 19. Cary,L.A. and Guan,J.L. (1999). Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling *Front Biosci.* *4*, D102-D113.
 20. Chang,D.W., Xing,Z., Pan,Y., Algeciras-Schimmich,A., Barnhart,B.C., Yaish-Ohad,S., Peter,M.E., and Yang,X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis *EMBO J.* *21*, 3704-3714.
 21. Chicheportiche,Y., Bourdon,P.R., Xu,H., Hsu,Y.M., Scott,H., Hession,C., Garcia,I., and Browning,J.L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J.Biol.Chem.* *272*, 32401-32410.
 22. Chicoine,M.R. and Silbergeld,D.L. (1995). Assessment of brain tumor cell motility in vivo and in vitro *J.Neurosurg.* *82*, 615-622.
 23. Chinnaiyan,A.M., O'Rourke,K., Tewari,M., and Dixit,V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* *81*, 505-12.
 24. Chinnaiyan,A.M., O'Rourke,K., Yu,G.L., Lyons,R.H., Garg,M., Duan,D.R., Xing,L., Gentz,R., Ni,J., and Dixit,V.M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* *274*, 990-992.
 25. Choi,C., Gillespie,G.Y., Van Wagoner,N.J., and Benveniste,E.N. (2002). Fas engagement increases expression of interleukin-6 in human glioma cells *J.Neurooncol.* *56*, 13-19.
 26. Choi,C., Xu,X., Oh,J.W., Lee,S.J., Gillespie,G.Y., Park,H., Jo,H., and Benveniste,E.N. (2001). Fas-induced expression of chemokines in human glioma cells: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase *Cancer Res.* *61*, 3084-3091.
 27. Choi,D.W. (1996). Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr.Opin.Neurobiol.* *6*, 667-672.

28. Comerford,I. and Nibbs,R.J. (2005). Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors? *Immunol.Lett.* *96*, 163-174.
29. Corcoran,A., De Ridder,L.I., Del Duca,D., Kalala,O.J., Lah,T., Pilkington,G.J., and Del Maestro,R.F. (2003). Evolution of the brain tumour spheroid model: transcending current model limitations *Acta Neurochir.(Wien.)* *145*, 819-824.
30. Corcoran,A. and Del Maestro,R.F. (2003). Testing the "Go or Grow" hypothesis in human medulloblastoma cell lines in two and three dimensions *Neurosurgery* *53*, 174-184.
31. Degli-Esposti,M.A., Dougall,W.C., Smolak,P.J., Waugh,J.Y., Smith,C.A., and Goodwin,R.G. (1997). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* *7*, 813-820.
32. Demchik,L.L., Sameni,M., Nelson,K., Mikkelsen,T., and Sloane,B.F. (1999). Cathepsin B and glioma invasion *Int.J.Dev.Neurosci.* *17*, 483-494.
33. Demjen,D., Klusmann,S., Kleber,S., Zuliani,C., Stieltjes,B., Metzger,C., Hirt,U.A., Walczak,H., Falk,W., Essig,M., Edler,L., Krammer,P.H., and Martin-Villalba,A. (2004). Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury *Nat.Med.* *10*, 389-395.
34. Demuth,T. and Berens,M.E. (2004). Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion *J.Neurooncol.* *70*, 217-228.
35. Desbarats,J., Birge,R.B., Mimouni-Rongy,M., Weinstein,D.E., Palerme,J.S., and Newell,M.K. (2003). Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* *5*, 118-25.
36. Deveraux,Q.L. and Reed,J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis *Genes Dev.* *13*, 239-252.
37. Doble,B.W. and Woodgett,J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase *J.Cell Sci.* *116*, 1175-1186.
38. Earnshaw,W.C., Martins,L.M., and Kaufmann,S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* *68*, 383-424.
39. Ehrmann,J., Jr., Rihakova,P., Hlobilkova,A., Kala,M., and Kolar,Z. (2000). The expression of apoptosis-related proteins and the apoptotic rate in glial tumors of the brain *Neoplasma* *47*, 151-155.
40. Embi,N., Rylatt,D.B., and Cohen,P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase *Eur.J.Biochem.* *107*, 519-527.
41. Etienne-Manneville,S. and Hall,A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* *421*, 753-756.

42. Farrell,C.L., Stewart,P.A., and Del Maestro,R.F. (1987). A new glioma model in rat: the C6 spheroid implantation technique permeability and vascular characterization *J.Neurooncol.* 4, 403-415.
43. Fassina,G., Ferrari,N., Brigati,C., Benelli,R., Santi,L., Noonan,D.M., and Albini,A. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities *Clin.Exp.Metastasis* 18, 111-120.
44. Fisher,D.E. (1994). Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78, 539-542.
45. Frankel,B., Longo,S.L., and Ryken,T.C. (1999). Co-expression of Fas and Fas ligand in human non-astrocytic glial tumors *Acta Neuropathol.(Berl)* 98, 363-366.
46. Frei,K., Ambar,B., Adachi,N., Yonekawa,Y., and Fontana,A. (1998). Ex vivo malignant glioma cells are sensitive to Fas (CD95/APO-1) ligand-mediated apoptosis *J.Neuroimmunol.* 87, 105-113.
47. French,L.E. and Tschopp,J. (2003). Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors *Cell Death.Differ.* 10, 117-123.
48. Friedrich,E.B., Liu,E., Sinha,S., Cook,S., Milstone,D.S., MacRae,C.A., Mariotti,M., Kuhlencordt,P.J., Force,T., Rosenzweig,A., St Arnaud,R., Dedhar,S., and Gerszten,R.E. (2004). Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development *Mol.Cell Biol.* 24, 8134-8144.
49. Friesen,C., Fulda,S., and Debatin,K.M. (1997). Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia* 11, 1833-1841.
50. Fulda,S., Scaffidi,C., Pietsch,T., Krammer,P.H., Peter,M.E., and Debatin,K.M. (1998b). Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ.* 5, 884-893.
51. Fulda,S., Scaffidi,C., Pietsch,T., Krammer,P.H., Peter,M.E., and Debatin,K.M. (1998a). Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death.Differ.* 5, 884-893.
52. Fulda,S., Sieverts,H., Friesen,C., Herr,I., and Debatin,K.M. (1997). The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 57, 3823-3829.
53. Gabison,E.E., Mourah,S., Steinfels,E., Yan,L., Hoang-Xuan,T., Watsky,M.A., De Wever,B., Calvo,F., Mauviel,A., and Menashi,S. (2005). Differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in normal and ulcerated corneas: role in epithelio-stromal interactions and matrix metalloproteinase induction *Am.J.Pathol.* 166, 209-219.
54. Giese,A., Rief,M.D., Loo,M.A., and Berens,M.E. (1994). Determinants of human astrocytoma migration *Cancer Res.* 54, 3897-3904.
55. Giles,R.H., van Es,J.H., and Clevers,H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim.Biophys.Acta* 1653, 1-24.

56. Gladson, C.L. (1999). The extracellular matrix of gliomas: modulation of cell function *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 58, 1029-1040.
57. Goldmann, W.H. (2002). Mechanical aspects of cell shape regulation and signaling *Cell Biol.Int.* 26, 313-317.
58. Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2005a). c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis *J.Biol.Chem.* 280, 14507-14513.
59. Golks, A., Brenner, D., Schmitz, I., Watzl, C., Krueger, A., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2005b). The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell Death Differ.*
60. Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Arnold, E., Varfolomeev, E.E., Brodianskii, V.M., and Wallach, D. (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains *J.Biol.Chem.* 272, 19641-19644.
61. Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E., Longthorne, V.L., Culhane, A.C., and Williams, G.T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur.J.Biochem.* 236, 1-26.
62. Hannigan, G., Troussard, A.A., and Dedhar, S. (2005). Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK *Nat.Rev.Cancer* 5, 51-63.
63. Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C., and Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase *Nature* 379, 91-96.
64. Hauck, C.R., Hsia, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2002). The focal adhesion kinase--a regulator of cell migration and invasion *IUBMB.Life* 53, 115-119.
65. Holland, E.C. (2000). A mouse model for glioma: biology, pathology, and therapeutic opportunities *Toxicol.Pathol.* 28, 171-177.
66. Holland, E.C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R.E., and Fuller, G.N. (2000a). Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice *Nat.Genet.* 25, 55-57.
67. Holland, E.C., Li, Y., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R.A., and Fuller, G.N. (2000b). Astrocytes give rise to oligodendrogliomas and astrocytomas after gene transfer of polyoma virus middle T antigen in vivo *Am.J.Pathol.* 157, 1031-1037.
68. Honarpour, N., Du, C., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Wang, X., and Herz, J. (2000). Adult Apaf-1-deficient mice exhibit male infertility *Dev.Biol.* 218, 248-258.
69. Husain, N., Chiocca, E.A., Rainov, N., Louis, D.N., and Zervas, N.T. (1998). Co-expression of Fas and Fas ligand in malignant glial tumors and cell lines *Acta Neuropathol.(Berl)* 95, 287-290.
70. Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E., and Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP *Nature* 388, 190-195.

71. Itoh,N. and Nagata,S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen *J.Biol.Chem.* 268, 10932-10937.
72. Jarad,G., Wang,B., Khan,S., DeVore,J., Miao,H., Wu,K., Nishimura,S.L., Wible,B.A., Konieczkowski,M., Sedor,J.R., and Schelling,J.R. (2002). Fas activation induces renal tubular epithelial cell beta 8 integrin expression and function in the absence of apoptosis *J.Biol.Chem.* 277, 47826-47833.
73. Jiang,H., Guo,W., Liang,X., and Rao,Y. (2005). Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators *Cell* 120, 123-135.
74. Juliano,R.L. (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 42, 283-323.
75. Kahari,V.M. and Saarialho-Kere,U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin *Exp.Dermatol.* 6, 199-213.
76. Kaneko,Y., Kitazato,K., and Basaki,Y. (2004). Integrin-linked kinase regulates vascular morphogenesis induced by vascular endothelial growth factor *J.Cell Sci.* 117, 407-415.
77. Kayagaki,N., Kawasaki,A., Ebata,T., Ohmoto,H., Ikeda,S., Inoue,S., Yoshino,K., Okumura,K., and Yagita,H. (1995). Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand *J.Exp.Med.* 182, 1777-1783.
78. Kaytor,M.D. and Orr,H.T. (2002). The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol* 12, 275-8.
79. Keppler,O.T., Peter,M.E., Hinderlich,S., Moldenhauer,G., Stehling,P., Schmitz,I., Schwartz-Albiez,R., Reutter,W., and Pawlita,M. (1999). Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus *Glycobiology* 9, 557-569.
80. Kerr,J.F., Wyllie,A.H., and Currie,A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26, 239-257.
81. Kischkel,F.C., Hellbardt,S., Behrmann,I., Germer,M., Pawlita,M., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-88.
82. Kitson,J., Raven,T., Jiang,Y.P., Goeddel,D.V., Giles,K.M., Pun,K.T., Grinham,C.J., Brown,R., and Farrow,S.N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384, 372-375.
83. Klaus Schulze-Osthoff. In tödlicher Mission: Apoptose, Killerproteasen und Erkrankungen. *Jahrbuch der Heinrich Heine Universität Düsseldorf* , 119-129. 2002. Rektor der Heinrich Heine Universität Düsseldorf. Ref Type: Magazine Article

84. Kleihues,P., Louis,D.N., Scheithauer,B.W., Rorke,L.B., Reifenberger,G., Burger,P.C., and Cavenee,W.K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* *61*, 215-225.
85. Kleihues,P. and Ohgaki,H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis *Neuro.-oncol.* *1*, 44-51.
86. Krammer,P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* *407*, 789-795.
87. Kuida,K., Haydar,T.F., Kuan,C.Y., Gu,Y., Taya,C., Karasuyama,H., Su,M.S., Rakic,P., and Flavell,R.A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9 *Cell* *94*, 325-337.
88. Kuida,K., Zheng,T.S., Na,S., Kuan,C., Yang,D., Karasuyama,H., Rakic,P., and Flavell,R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice *Nature* *384*, 368-372.
89. Kurpad,S.N., Zhao,X.G., Wikstrand,C.J., Batra,S.K., McLendon,R.E., and Bigner,D.D. (1995). Tumor antigens in astrocytic gliomas *Glia* *15*, 244-256.
90. Lamszus,K., Kunkel,P., and Westphal,M. (2003). Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy *Acta Neurochir.Suppl* *88*, 169-177.
91. Lauffenburger,D.A. and Horwitz,A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process *Cell* *84*, 359-369.
92. Lavrik,I., Golks,A., and Krammer,P.H. (2005). Death receptor signaling *J.Cell Sci.* *118*, 265-267.
93. Levicar,N., Dewey,R.A., Daley,E., Bates,T.E., Davies,D., Kos,J., Pilkington,G.J., and Lah,T.T. (2003). Selective suppression of cathepsin L by antisense cDNA impairs human brain tumor cell invasion in vitro and promotes apoptosis *Cancer Gene Ther.* *10*, 141-151.
94. Liotta,L.A., Tryggvason,K., Garbisa,S., Hart,I., Foltz,C.M., and Shafie,S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen *Nature* *284*, 67-68.
95. Los,M., Wesselborg,S., and Schulze-Osthoff,K. (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity.* *10*, 629-639.
96. Lu,J., Ashwell,K.W., and Waite,P. (2000). Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine* *25*, 1859-1866.
97. Majno,G. and Joris,I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death *Am.J.Pathol.* *146*, 3-15.
98. Mann,B., Gelos,M., Siedow,A., Hanski,M.L., Gratchev,A., Ilyas,M., Bodmer,W.F., Moyer,M.P., Riecken,E.O., Buhr,H.J., and Hanski,C. (1999). Target genes of beta-

- catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 1603-1608.
99. Mareel,M., Kint,J., and Meyvisch,C. (1979). Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart in vitro *Virchows Arch.B Cell Pathol.Incl.Mol.Pathol.* 30, 95-111.
 100. Marsters,S.A., Sheridan,J.P., Donahue,C.J., Pitti,R.M., Gray,C.L., Goddard,A.D., Bauer,K.D., and Ashkenazi,A. (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr.Biol.* 6, 1669-1676.
 101. Martin-Villalba,A., Hahne,M., Kleber,S., Vogel,J., Falk,W., Schenkel,J., and Krammer,P.H. (2001). Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 8, 679-86.
 102. Martin-Villalba,A., Herr,I., Jeremias,I., Hahne,M., Brandt,R., Vogel,J., Schenkel,J., Herdegen,T., and Debatin,K.M. (1999). CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis- inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19, 3809-17.
 103. Mattson,M.P., Culmsee,C., and Yu,Z.F. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301, 173-87.
 104. Medema,J.P., Scaffidi,C., Kischkel,F.C., Shevchenko,A., Mann,M., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1997a). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-804.
 105. Medema,J.P., Toes,R.E., Scaffidi,C., Zheng,T.S., Flavell,R.A., Melief,C.J., Peter,M.E., Offringa,R., and Krammer,P.H. (1997b). Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis *Eur.J.Immunol.* 27, 3492-3498.
 106. Meyn,R.E., Stephens,L.C., and Milas,L. (1996). Programmed cell death and radioresistance. *Cancer Metastasis Rev.* 15, 119-131.
 107. Micheau,O., Thome,M., Schneider,P., Holler,N., Tschopp,J., Nicholson,D.W., Briand,C., and Grutter,M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex *J.Biol.Chem.* 277, 45162-45171.
 108. Mischel,P.S. and Cloughesy,T.F. (2003). Targeted molecular therapy of GBM *Brain Pathol.* 13, 52-61.
 109. Mittl,P.R., Di Marco,S., Krebs,J.F., Bai,X., Karanewsky,D.S., Priestle,J.P., Tomaselli,K.J., and Grutter,M.G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone *J.Biol.Chem.* 272, 6539-6547.
 110. Mohanam,S., Jasti,S.L., Kondraganti,S.R., Chandrasekar,N., Lakka,S.S., Kin,Y., Fuller,G.N., Yung,A.W., Kyritsis,A.P., Dinh,D.H., Olivero,W.C., Gujrati,M., Ali-Osman,F., and Rao,J.S. (2001). Down-regulation of cathepsin B expression impairs

- the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells *Oncogene* 20, 3665-3673.
111. Mongkolsapaya,J., Cowper,A.E., Xu,X.N., Morris,G., McMichael,A.J., Bell,J.I., and Screaton,G.R. (1998). Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL. *J.Immunol.* 160, 3-6.
 112. Murphy,G., Ward,R., Hembry,R.M., Reynolds,J.J., Kuhn,K., and Tryggvason,K. (1989). Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase *Biochem.J.* 258, 463-472.
 113. Muzio,M., Chinnaiyan,A.M., Kischkel,F.C., O'Rourke,K., Shevchenko,A., Ni,J., Scaffidi,C., Bretz,J.D., Zhang,M., Gentz,R., Mann,M., Krammer,P.H., Peter,M.E., and Dixit,V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-27.
 114. Nagata,S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-65.
 115. Nateri,A.S., Spencer-Dene,B., and Behrens,A. (2005). Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature*.
 116. Nicholson,D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death.Differ.* 6, 1028-1042.
 117. Obara,S., Nakata,M., Takeshima,H., Kuratsu,J., Maruyama,I., and Kitajima,I. (2002). Inhibition of migration of human glioblastoma cells by cerivastatin in association with focal adhesion kinase (FAK) *Cancer Lett.* 185, 153-161.
 118. Ohgaki,H. and Kleihues,P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas *Acta Neuropathol.(Berl)* 109, 93-108.
 119. Oloumi,A., McPhee,T., and Dedhar,S. (2004). Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase *Biochim.Biophys.Acta* 1691, 1-15.
 120. Oppenheim,R.W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu.Rev.Neurosci.* 14, 453-501.
 121. Palecek,S.P., Loftus,J.C., Ginsberg,M.H., Lauffenburger,D.A., and Horwitz,A.F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness *Nature* 385, 537-540.
 122. Pan,G., Bauer,J.H., Haridas,V., Wang,S., Liu,D., Yu,G., Vincenz,C., Aggarwal,B.B., Ni,J., and Dixit,V.M. (1998). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 431, 351-356.
 123. Pan,G., Ni,J., Wei,Y.F., Yu,G., Gentz,R., and Dixit,V.M. (1997a). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.

124. Pan,G., O'Rourke,K., Chinnaiyan,A.M., Gentz,R., Ebner,R., Ni,J., and Dixit,V.M. (1997b). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.
125. Papoff,G., Hausler,P., Eramo,A., Pagano,M.G., Di Leve,G., Signore,A., and Ruberti,G. (1999). Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor *J.Biol.Chem.* 274, 38241-38250.
126. Papoff,P. (2000). Infection, neutrophils, and hematopoietic growth factors in the pathogenesis of neonatal chronic lung disease *Clin.Perinatol.* 27, 717-31, viii.
127. Parsons,J.T., Martin,K.H., Slack,J.K., Taylor,J.M., and Weed,S.A. (2000). Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement *Oncogene* 19, 5606-5613.
128. Persad,S. and Dedhar,S. (2003). The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression *Cancer Metastasis Rev.* 22, 375-384.
129. Peter,M.E. and Krammer,P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond *Cell Death.Differ.* 10, 26-35.
130. Peterson,D.L., Sheridan,P.J., and Brown,W.E., Jr. (1994). Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions *J.Neurosurg.* 80, 865-876.
131. Petit,V. and Thiery,J.P. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics *Biol.Cell* 92, 477-494.
132. Pitti,R.M., Marsters,S.A., Lawrence,D.A., Roy,M., Kischkel,F.C., Dowd,P., Huang,A., Donahue,C.J., Sherwood,S.W., Baldwin,D.T., Godowski,P.J., Wood,W.I., Gurney,A.L., Hillan,K.J., Cohen,R.L., Goddard,A.D., Botstein,D., and Ashkenazi,A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396, 699-703.
133. Raff,M.C., Barres,B.A., Burne,J.F., Coles,H.S., Ishizaki,Y., and Jacobson,M.D. (1994). Programmed cell death and the control of cell survival. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 345, 265-268.
134. Raghupathi,R., Graham,D.I., and McIntosh,T.K. (2000). Apoptosis after traumatic brain injury. *J.Neurotrauma* 17, 927-938.
135. Rao,J.S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases *Nat.Rev.Cancer* 3, 489-501.
136. Raoul,C., Henderson,C.E., and Pettmann,B. (1999). Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor *J.Cell Biol.* 147, 1049-1062.
137. Rasper,D.M., Vaillancourt,J.P., Hadano,S., Houtzager,V.M., Seiden,I., Keen,S.L., Tawa,P., Xanthoudakis,S., Nasir,J., Martindale,D., Koop,B.F., Peterson,E.P., Thornberry,N.A., Huang,J., MacPherson,D.P., Black,S.C., Hornung,F., Lenardo,M.J., Hayden,M.R., Roy,S., and Nicholson,D.W. (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment

- and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex *Cell Death.Differ.* 5, 271-288.
138. Rempel,S.A., Rosenblum,M.L., Mikkelsen,T., Yan,P.S., Ellis,K.D., Golembieski,W.A., Sameni,M., Rozhin,J., Ziegler,G., and Sloane,B.F. (1994). Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion *Cancer Res.* 54, 6027-6031.
139. Reya,T. and Clevers,H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer *Nature* 434, 843-850.
140. Ridley,A.J. (2001). Rho GTPases and cell migration *J.Cell Sci.* 114, 2713-2722.
141. Riva,P., Franceschi,G., Frattarelli,M., Riva,N., Guiducci,G., Cremonini,A.M., Giuliani,G., Casi,M., Gentile,R., Jekunen,A.A., and Kairemo,K.J. (1999). 131I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma--phase I and II study *Acta Oncol.* 38, 351-359.
142. Rotonda,J., Nicholson,D.W., Fazil,K.M., Gallant,M., Gareau,Y., Labelle,M., Peterson,E.P., Rasper,D.M., Ruel,R., Vaillancourt,J.P., Thornberry,N.A., and Becker,J.W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis *Nat.Struct.Biol.* 3, 619-625.
143. Rutka,J.T., Apodaca,G., Stern,R., and Rosenblum,M. (1988). The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function *J.Neurosurg.* 69, 155-170.
144. Salvesen,G.S. and Dixit,V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 10964-10967.
145. Saraste,A. and Pulkki,K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc.Res.* 45, 528-537.
146. Sato,H., Kita,M., and Seiki,M. (1993). v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J.Biol.Chem.* 268, 23460-23468.
147. Savill,J., Fadok,V., Henson,P., and Haslett,C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis *Immunol.Today* 14, 131-136.
148. Scaffidi,C., Fulda,S., Srinivasan,A., Friesen,C., Li,F., Tomaselli,K.J., Debatin,K.M., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-87.
149. Scaffidi,C., Medema,J.P., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b *J.Biol.Chem.* 272, 26953-26958.
150. Scaffidi,C., Schmitz,I., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis *J.Biol.Chem.* 274, 1541-1548.

151. Schall,T.J., Lewis,M., Koller,K.J., Lee,A., Rice,G.C., Wong,G.H., Gatanaga,T., Granger,G.A., Lentz,R., Raab,H., and . (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61, 361-370.
152. Schaller,M.D. (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein *Oncogene* 20, 6459-6472.
153. Schmitz,I., Kirchhoff,S., and Krammer,P.H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 32, 1123-1136.
154. Schulze-Osthoff,K., Ferrari,D., Los,M., Wesselborg,S., and Peter,M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors *Eur.J.Biochem.* 254, 439-459.
155. Screaton,G.R., Xu,X.N., Olsen,A.L., Cowper,A.E., Tan,R., McMichael,A.J., and Bell,J.I. (1997). LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 4615-4619.
156. Sheridan,J.P., Marsters,S.A., Pitti,R.M., Gurney,A., Skubatch,M., Baldwin,D., Ramakrishnan,L., Gray,C.L., Baker,K., Wood,W.I., Goddard,A.D., Godowski,P., and Ashkenazi,A. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818-821.
157. Shinohara,H., Yagita,H., Ikawa,Y., and Oyaizu,N. (2000). Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation *Cancer Res.* 60, 1766-1772.
158. Siegel,R.M., Frederiksen,J.K., Zacharias,D.A., Chan,F.K., Johnson,M., Lynch,D., Tsien,R.Y., and Lenardo,M.J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.
159. Simonet,W.S., Lacey,D.L., Dunstan,C.R., Kelley,M., Chang,M.S., Luthy,R., Nguyen,H.Q., Wooden,S., Bennett,L., Boone,T., Shimamoto,G., DeRose,M., Elliott,R., Colombero,A., Tan,H.L., Trail,G., Sullivan,J., Davy,E., Bucay,N., Renshaw-Gegg,L., Hughes,T.M., Hill,D., Pattison,W., Campbell,P., Boyle,W.J., and . (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.
160. Sivak,J.M. and Fini,M.E. (2002). MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology *Prog.Retin.Eye Res.* 21, 1-14.
161. Sivaparvathi,M., Sawaya,R., Wang,S.W., Rayford,A., Yamamoto,M., Liotta,L.A., Nicolson,G.L., and Rao,J.S. (1995). Overexpression and localization of cathepsin B during the progression of human gliomas *Clin.Exp.Metastasis* 13, 49-56.
162. Slee,E.A., Adrain,C., and Martin,S.J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis *Cell Death.Differ.* 6, 1067-1074.
163. Smith,P.J., Rackstraw,C., and Cotter,F. (1994). DNA fragmentation as a consequence of cell cycle traverse in doxorubicin- and idarubicin-treated human lymphoma cells *Ann.Hematol.* 69 Suppl 1, S7-11.

164. Sprick,M.R., Rieser,E., Stahl,H., Grosse-Wilde,A., Weigand,M.A., and Walczak,H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8 *EMBO J.* 21, 4520-4530.
165. Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Otilie,S., Bullrich,F., Banks,S., Wang,Y., Fernandes-Alnemri,T., Croce,C.M., Litwack,G., Tomaselli,K.J., Armstrong,R.C., and Alnemri,E.S. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis *J.Biol.Chem.* 272, 18542-18545.
166. Staal,F.J., Weerkamp,F., Baert,M.R., van den Burg,C.M., van Noort,M., de Haas,E.F., and van Dongen,J.J. (2004). Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion *J.Immunol.* 172, 1099-1108.
167. Stegh,A.H., Barnhart,B.C., Volkland,J., Algeciras-Schimmich,A., Ke,N., Reed,J.C., and Peter,M.E. (2002). Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein *J.Biol.Chem.* 277, 4351-4360.
168. Stegh,A.H., Herrmann,H., Lampel,S., Weisenberger,D., Andra,K., Seper,M., Wiche,G., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (2000). Identification of the cytolinker plectin as a major early in vivo substrate for caspase 8 during *Mol.Cell Biol.* 20, 5665-5679.
169. Stegh,A.H. and Peter,M.E. (2001). Apoptosis and caspases *Cardiol.Clin.* 19, 13-29.
170. Suda,T., Hashimoto,H., Tanaka,M., Ochi,T., and Nagata,S. (1997). Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J.Exp.Med.* 186, 2045-2050.
171. Suetsugu,S. and Takenawa,T. (2003). Regulation of cortical actin networks in cell migration *Int.Rev.Cytol.* 229, 245-286.
172. Takahashi,T., Tanaka,M., Brannan,C.I., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Suda,T., and Nagata,S. (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand *Cell* 76, 969-976.
173. Tamaki,M., McDonald,W., Amberger,V.R., Moore,E., and Del Maestro,R.F. (1997). Implantation of C6 astrocytoma spheroid into collagen type I gels: invasive, proliferative, and enzymatic characterizations *J.Neurosurg.* 87, 602-609.
174. Tan,C., Cruet-Hennequart,S., Troussard,A., Fazli,L., Costello,P., Sutton,K., Wheeler,J., Gleave,M., Sanghera,J., and Dedhar,S. (2004). Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK) *Cancer Cell* 5, 79-90.
175. Tanaka,S.S., Togooka,Y., Sato,H., Seiki,M., Tojo,H., and Tachi,C. (1998). Expression and localization of membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in trophoblast cells of cultured mouse blastocysts and ectoplacental cones *Placenta* 19, 41-48.

176. Tartaglia,L.A., Rothe,M., Hu,Y.F., and Goeddel,D.V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73, 213-216.
177. Thome,M., Schneider,P., Hofmann,K., Fickenscher,H., Meinel,E., Neipel,F., Mattmann,C., Burns,K., Bodmer,J.L., Schroter,M., Scaffidi,C., Krammer,P.H., Peter,M.E., and Tschopp,J. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors *Nature* 386, 517-521.
178. Tohma,Y., Gratas,C., Van Meir,E.G., Desbaillets,I., Tenan,M., Tachibana,O., Kleihues,P., and Ohgaki,H. (1998). Necrogenesis and Fas/APO-1 (CD95) expression in primary (de novo) and secondary glioblastomas *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 57, 239-245.
179. Tonn,J.C. and Goldbrunner,R. (2003). Mechanisms of glioma cell invasion *Acta Neurochir.Suppl* 88, 163-167.
180. Trauth,B.C., Klas,C., Peters,A.M., Matzku,S., Moller,P., Falk,W., Debatin,K.M., and Krammer,P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
181. Troussard,A.A., Costello,P., Yoganathan,T.N., Kumagai,S., Roskelley,C.D., and Dedhar,S. (2000b). The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) *Oncogene* 19, 5444-5452.
182. Troussard,A.A., Costello,P., Yoganathan,T.N., Kumagai,S., Roskelley,C.D., and Dedhar,S. (2000a). The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) *Oncogene* 19, 5444-5452.
183. Troussard,A.A., Tan,C., Yoganathan,T.N., and Dedhar,S. (1999). Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner *Mol.Cell Biol.* 19, 7420-7427.
184. Tysnes,B.B., Larsen,L.F., Ness,G.O., Mahesparan,R., Edvardsen,K., Garcia-Cabrera,I., and Bjerkvig,R. (1996). Stimulation of glioma-cell migration by laminin and inhibition by anti-alpha3 and anti-beta1 integrin antibodies *Int.J.Cancer* 67, 777-784.
185. Vaux,D.L. and Korsmeyer,S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
186. Vercammen,D., Beyaert,R., Denecker,G., Goossens,V., Van Loo,G., Declercq,W., Grooten,J., Fiers,W., and Vandenabeele,P. (1998). Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 187, 1477-1485.
187. Visse,R. and Nagase,H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry *Circ.Res.* 92, 827-839.
188. Vouret-Craviari,V., Boulter,E., Grall,D., Matthews,C., and Obberghen-Schilling,E. (2004). ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells *J.Cell Sci.* 117, 4559-4569.

189. Wajant,H. (2003). Death receptors *Essays Biochem.* 39, 53-71.
190. Walczak,H., Degli-Esposti,M.A., Johnson,R.S., Smolak,P.J., Waugh,J.Y., Boiani,N., Timour,M.S., Gerhart,M.J., Schooley,K.A., Smith,C.A., Goodwin,R.G., and Rauch,C.T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16, 5386-5397.
191. Walker,P.R., Saas,P., and Dietrich,P.Y. (1997). Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J.Immunol.* 158, 4521-4524.
192. Wehrle-Haller,B. and Imhof,B.A. (2003). Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 35, 39-50.
193. Weller,M., Frei,K., Groscurth,P., Krammer,P.H., Yonekawa,Y., and Fontana,A. (1994). Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines *J.Clin.Invest* 94, 954-964.
194. Wiley,S.R., Schooley,K., Smolak,P.J., Din,W.S., Huang,C.P., Nicholl,J.K., Sutherland,G.R., Smith,T.D., Rauch,C., Smith,C.A., and . (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 3, 673-682.
195. Wilson,K.P., Black,J.A., Thomson,J.A., Kim,E.E., Griffith,J.P., Navia,M.A., Murcko,M.A., Chambers,S.P., Aldape,R.A., Raybuck,S.A., and . (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme *Nature* 370, 270-275.
196. Woessner,J.F., Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling *FASEB J.* 5, 2145-2154.
197. Woodgett,J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A *EMBO J.* 9, 2431-2438.
198. Wu,C. and Dedhar,S. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes *J.Cell Biol.* 155, 505-510.
199. Xiao,C., Yang,B.F., Asadi,N., Beguinot,F., and Hao,C. (2002). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells *J.Biol.Chem.* 277, 25020-25025.
200. Yanamandra,N., Kondraganti,S., Srinivasula,S.M., Gujrati,M., Olivero,W.C., Dinh,D.H., and Rao,J.S. (2004). Activation of caspase-9 with irradiation inhibits invasion and angiogenesis in SNB19 human glioma cells *Oncogene* 23, 2339-2346.
201. Yang,X., Chang,H.Y., and Baltimore,D. (1998). Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization *Mol.Cell* 1, 319-325.
202. Yu,K.Y., Kwon,B., Ni,J., Zhai,Y., Ebner,R., and Kwon,B.S. (1999). A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J.Biol.Chem.* 274, 13733-13736.

-
203. Zagzag,D., Friedlander,D.R., Margolis,B., Grumet,M., Semenza,G.L., Zhong,H., Simons,J.W., Holash,J., Wiegand,S.J., and Yancopoulos,G.D. (2000a). Molecular events implicated in brain tumor angiogenesis and invasion *Pediatr.Neurosurg.* 33, 49-55.
 204. Zagzag,D., Zhong,H., Scalzitti,J.M., Laughner,E., Simons,J.W., and Semenza,G.L. (2000b). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression *Cancer* 88, 2606-2618.
 205. Zheng,T.S., Hunot,S., Kuida,K., and Flavell,R.A. (1999). Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death.Differ.* 6, 1043-1053.
 206. Zuliani,C., Kleber,S., Klussmann,S., Wenger,T., Kenzelmann,M., Schreglmann,N., Martinez,A., Del Rio,J.A., Soriano,E., Vodrazka,P., Kuner,R., Groene,H.J., Herr,I., Krammer,P.H., and Martin-Villalba,A. (2005). Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1) *Cell Death.Differ.*

VIII. Publikationsverzeichnis

2001

Martin-Villalba A., **Kleber S.**, Vogel J., Walczack H., Krestel H., Hahne M. Schenkel J., and Krammer P.H. (2001). Synergistical therapeutical effect of anti-CD95Ligand and anti-TNF antibodies in ischemic brain damage. *Cell death and Differentiation*, 8:679-686

2004

Demjen D., Klussmann S., **Kleber S.**, Zuliani C., Stieltjes B., Metzger C., Hirt U.A., Walczack H., Falk W., Essig M., Edler L., Krammer P.H. and Martin-Villalba A. (2004). Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Nature Medicine* 10: 389-395

2005

Zuliani C., **Kleber S.**, Klussmann S., Wenger T., Kenzelmann M., Schreglmann N., Martinez A., del Rio J.A., Soriano E., Vodrazka P., Kuner R., Groene H.-J., Krammer P.H. and Martin-Villalba A. (2005) Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo1). *Cell death and Differentiation*, elektronische Version 8. Juli 2005 1-10.

2005

Kleber S., Beisel A., Schreglmann N., Zuliani C., Klussmann S., Letellier E., Sülthmann H., Roth W., Dedhar S., Müller M. M., Krammer P.H., Herold-Mende C. and Martin-Villalba A. (2005 submitted). Irradiation of primary glioblastoma cells promotes invasiveness via the CD95Ligand. *Nature Medicine*

2005

Kuhn A., Herrmann M., **Kleber S.**, Beckmann-Welle M., Fehsel K., Martin-Villalba A., Lehmann P., Ruzicka T., Krammer P. H., and Kolb-Bachofen V., (2005 submitted). Accumulation of apoptotic cells in the epidermis of patients with cutaneous lupus erythematosus after UV irradiation. *Arthritis & Rheumatism*

Vorträge und Posterpräsentationen:

2002

Kleber S., Li-Weber M., Zuliani C., Demjen D., Krammer P.H. and Martin-Villalba A. (2002). Molecular mechanisms of apoptosis in stroke. 23. – 28. Februar 2002 Thrid European Workshop on cell death: *Death on the beach, Salobrena, Spain*

2003

Kleber S., Sandhoff R., Uttenweiler D., Testi R. and Martin-Villalba A. (2003). Disialoganglioside GD3 promotes ischemic brain damage. 07. - 11.05.2003 in Magdeburg III. *Magdeburger Internationale Symposium "Neuroprotection and Neurorepair"*

2004

Kleber S., Zuliani C., Klussmann S., Krammer P.H. and Martin-Villalba A. (2004). New trials downstream of CD95 in the CNS. 11. – 16. Mai 2004. *The fourth european Workshop on cell death: Death on the bosphorus in Istanbul, Türkei*

Kleber S., Zuliani C., Klussmann S., Krammer P.H. and Martin-Villalba A. (2004). New trials downstream of CD95 in the CNS. 25.- 28. July 2004. *10th International Symposium on Pharmacology of Cerebral Ischemia, Marburg, Deutschland.*

IX. Erklärung

Hiermit versichere ich Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

Heidelberg im September 2005

Susanne Kleber