

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR PSYCHIATRIE

Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Florian Holsboer

**Expression und funktionelle Bedeutung
des Platelet-derived Growth Factors und seiner Rezeptoren in humanen
Meningiomen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel Utpadel-Fischler

aus München

2012

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Günter K. Stalla

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rainer Glaß
Prof. Dr. Kirsten Lauber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ulrich Renner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2012

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Abkürzungsverzeichnis..... | 1 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 2.1 | Humane Meningiome | 3 |
| 2.1.1 | Ätiologie, Epidemiologie und Pathogenese | 3 |
| 2.1.2 | Pathologie | 7 |
| 2.1.3 | Klinik..... | 10 |
| 2.1.4 | Diagnose | 11 |
| 2.1.5 | Therapie | 13 |
| 2.2 | PDGF | 15 |
| 2.2.1 | PDGF-Familie..... | 15 |
| 2.2.2 | PDGF-Rezeptor | 17 |
| 2.2.3 | Intrazelluläre Signaltransduktion | 19 |
| 2.2.4 | Physiologische Funktion von PDGF | 22 |
| 2.2.5 | Rolle von PDGF und PDGFR in der Tumorgenese | 23 |
| 2.3 | VEGF-Familie..... | 24 |
| 2.4 | Zielsetzung der Arbeit..... | 26 |
| 3 | Material und Methoden..... | 28 |
| 3.1 | Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen..... | 28 |
| 3.1.1 | Geräte und Materialien..... | 28 |
| 3.1.2 | Chemikalien und Lösungen..... | 29 |
| 3.1.3 | Humanes Tumorgewebe | 33 |
| 3.2 | Methoden..... | 34 |
| 3.2.1 | Zellkulturmethoden | 34 |
| 3.2.1.1 | Präparation des Tumorgewebes..... | 34 |
| 3.2.1.2 | Primärzellkultur | 35 |
| 3.2.1.3 | Subkultivierung (Passagieren/Splitten) der Zellkulturen..... | 35 |
| 3.2.1.4 | Stimulations- und Inhibitionsversuche | 36 |
| 3.2.1.5 | Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer | 38 |
| 3.2.1.6 | WST1-Assay zur Proliferationsbestimmung | 39 |
| 3.2.1.7 | ³ H-Thymidin-Inkorporationsversuch zur Proliferationsbestimmung..... | 39 |

| | | |
|---------|---|---|
| 3.2.2 | Proteinchemische Methoden..... | 41 |
| 3.2.2.1 | Proteinextraktion | 41 |
| 3.2.2.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bio-Rad Protein-Assay | 41 |
| 3.2.2.3 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 42 |
| 3.2.3 | Immunologische Methoden | 43 |
| 3.2.3.1 | Immunhistochemie (ICH) | 43 |
| 3.2.3.2 | VEGF-ELISA..... | 45 |
| 3.2.3.3 | Western Blot | 47 |
| 3.2.4 | Molekularbiologische Methoden | 49 |
| 3.2.4.1 | RNA-Extraktion..... | 49 |
| 3.2.4.2 | Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion..... | 51 |
| 3.2.4.3 | Herstellung eines Agarose-Gels | 53 |
| 3.2.5 | Statistik..... | 54 |
| 4 | Ergebnisse..... | 55 |
| 4.1 | Expression von PDGFR- α und - β | 55 |
| 4.2 | Wirkung von PDGF-AA, -AB, -BB und RAD001 auf die VEGF-Sekretion | 57 |
| 4.3 | Wirkung von PDGF-AA und -BB auf die VEGF-Transkription | 66 |
| 4.4 | Wirkung von PDGF-AA, -BB, RAD001 und Curcumin auf die Proliferation | 67 |
| 4.4.1 | Resultate des ^3H -Thymidin-Einbaus..... | 67 |
| 4.4.2 | Resultate des WST-1-Assays | 72 |
| 4.5 | Untersuchung der Signaltransduktion von PDGF | 77 |
| 5 | Diskussion | 81 |
| 5.1 | Expression von PDGF-Rezeptoren..... | 81 |
| 5.2 | PI3K-Akt-mTOR-Signaltransduktionsweg..... | 82 |
| 5.3 | VEGF-Sekretion | 83 |
| 5.4 | Zellproliferation..... | 86 |
| 5.5 | RAD001 und Curcumin..... | 87 |
| 5.6 | Schlussfolgerung | 88 |
| 6 | Zusammenfassung | 90 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 92 |
| 8 | Danksagung | 97 |
| 9 | Lebenslauf..... | Fehler! Textmarke nicht definiert. |

1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| A. | Arteria |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| cDNA | <i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i> |
| cpm | <i>Counts per Minute</i> |
| CSF | <i>Cerebrospinal Fluid</i> |
| CT | Computertomographie |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| FCS | <i>Fetal Calf Serum</i> |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HIF-1 α | <i>Hypoxia-inducible Factor-1α</i> |
| HRP | <i>Horseradish Peroxidase</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IHC | Immunhistochemie |
| mRNA | <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> |
| MRT | Magnet-Resonanz-Tomographie |
| mTOR | <i>Mammalian Target of Rapamycin</i> |
| N. | Nervus |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PDK1 | <i>Phosphoinositide Dependent Protein Kinase-1</i> |
| PDGF | <i>Platelet-derived Growth Factor</i> |
| PDGFR | <i>Platelet-derived Growth Factor Receptor</i> |

| | |
|------------------|--|
| PET | Positronenemissionstomographie |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PIP ₃ | Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat |
| PTEN | <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> |
| RTK | Rezeptortyrosinkinase |
| SD | <i>Standard Deviation</i> |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| TB | <i>TRIS Buffer</i> |
| TBS | <i>TRIS Buffered Saline</i> |
| TBST | TBS Tween® |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tPA | <i>Tissue Plasminogen Activator</i> |
| U/min | Umdrehungen/Minute |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| VEGFR | <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> |
| WB | Western Blot |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

2 Einleitung

2.1 Humane Meningiome

2.1.1 Ätiologie, Epidemiologie und Pathogenese

Bereits im Jahre 1938 publizierten Cushing und Eisenhardt eine wegweisende Monographie über Meningiome (Shrivastava et al., 2003). Diese Neoplasien sind hauptsächlich benigne und gut vaskularisierte Geschwüre der Hirnhaut, welche langsam und selten invasiv wachsen. Mit einem Anteil von 33,8 % zählen sie den Daten aus der *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS) zufolge zu den zwischen 2002 und 2006 am häufigsten diagnostizierten primären ZNS-Tumoren in den USA. Da sie meist intrakraniell lokalisiert sind, ergeben sich oft schwerwiegende und potentiell letale Folgen für die Patienten.

Die Prävalenz von Meningiomen wird auf über 170.000 in den USA geschätzt, wobei unter Frauen eine mehr als doppelt so hohe Inzidenz (8,36/100.000 pro Jahr) festgestellt wurde (Wiemels et al., 2010). Zudem offenbaren altersspezifische Inzidenzraten für Männer und Frauen ein zunehmendes Erkrankungsrisiko mit voranschreitendem Alter, bei einem mittleren Erkrankungsalter von 63 Jahren (Mawrin and Perry, 2010).

Sporadische Meningiome sind typischerweise mit einer oder mehreren fokalen chromosomalen Deletionen assoziiert und die Komplexität der genetischen Aberrationen nimmt mit steigendem Tumorgrad zu. Die am häufigsten auftretenden genetischen Veränderungen betreffen das Neurofibromatose-Typ 2-Gen (NF2) auf Chromosom 22q, was sehr oft zu einer gekürzten, nicht-funktionalen Proteinvariante des entsprechenden, als Merlin bezeichneten Genprodukts führt. Individuen mit diesen Mutationen haben ein deutlich erhöhtes Risiko, an Meningiomen zu erkranken.

2. Einleitung



Abb. 1 Post mortem Sicht auf die Dura mater zeigt mehrere Meningiome, die in der Größe stark variieren. Die Tumoren sind unilateral lokalisiert, ohne die Falx cerebri (FC) zu überschreiten. Für multiple durale Meningiome wurde ein klonaler Ursprung nachgewiesen und ihre Ausbreitung erfolgt wahrscheinlich über den Liquor cerebrospinalis (Stangl et al., 1997). Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Kleihues, Universitätsspital Zürich (<http://www.pubcan.org/image.php?id=685>)

Die Frequenz der NF2-Mutationen unterscheidet sich zwischen den einzelnen WHO-Graden der Meningiome nicht wesentlich, so dass sie eher einen entscheidenden Schritt zur Tumorentstehung als zur Progression repräsentieren. Hinsichtlich der verschiedenen histologischen Typen konnten dagegen Unterschiede in der Frequenz festgestellt werden, die die wichtige Rolle von NF2-Veränderungen in mesenchymartigen Phänotypen (transitionale, fibroblastische und psammomatöse Meningiome) hervorheben, was durch die möglicherweise mutationsbedingte Beeinträchtigung der Zellform erklärt werden könnte, denn Merlin gehört zur Proteinfamilie 4.1, deren Mitglieder Membranproteine mit dem Zytoskelett verbinden.

Weitere Gene, die an der Entstehung von Meningiomen involviert sein könnten, sind BAM22, ein auf Chromosom 22q12 lokalisiertes Gen der β -Adaptin-Familie, das Tumorsuppressorgen *Breakpoint Cluster Region* (BCR) auf 22q, *Differentially Expressed in*

2. Einleitung

Adenocarcinoma of the Lung 1 (DAL1), auch ein Gen der 4.1-Familie mit dem Genprodukt 4.1B, dessen Expression unabhängig vom histologischen Grad in 60% der untersuchten Meningiome reduziert war, (Mawrin and Perry, 2010) und *Tumor Suppressor in Lung Cancer 1* (TSLC-1), das vermutlich mit 4.1B interagiert und für das eine verminderte Expression in atypischen und anaplastischen Meningiomen beobachtet wurde (Surace et al., 2004). Ferner wurde für das ebenfalls auf 22q12 gelegene Gen *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3* (TIMP3) eine Assoziation mit der Tumorprogression nachgewiesen, da 67% von anaplastischen Meningiomen eine Hypermethylierung des TIMP3-Promoters aufwies, während dies nur für 22% der atypischen und 17% der benignen Meningiome zutraf (Barski et al., 2010).

Unabhängig vom Tumorgrad lassen sich Meningiome anhand ihrer molekularen Signatur in die beiden Gruppen stark-proliferativ und schwach-proliferativ einteilen (Carvalho et al., 2007). Generell wird davon ausgegangen, dass sich die Tumorprogression von niedriggradigen zu hochgradigen Tumoren vollzieht. Neben 22q wird der Verlust von 6q und 14q als besonders relevant für die Progression und Rekurrenz angesehen (Mawrin and Perry, 2010).

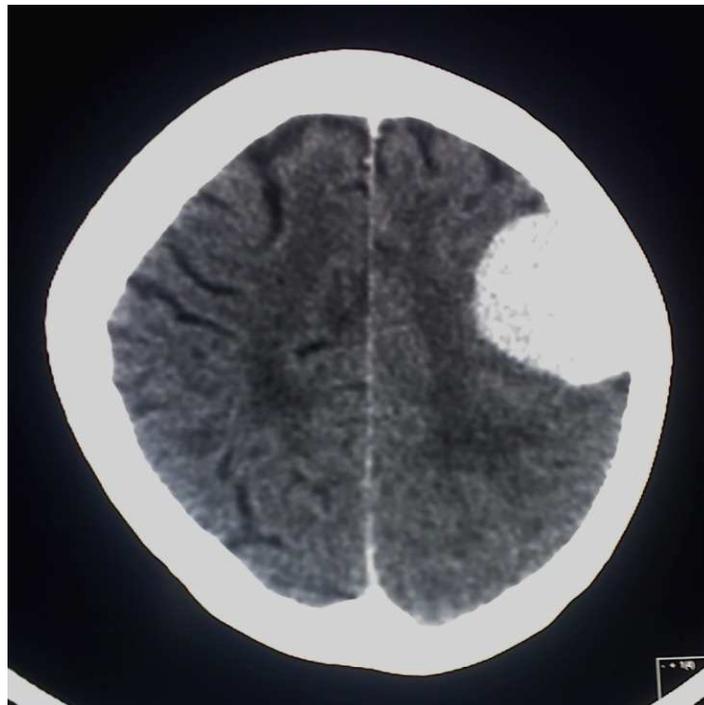


Abb. 2 CCT nach Kontrastmittelgabe. In der linken Hemisphäre ein Kontrastmittel aufnehmendes Meningiom.

2. Einleitung

In der bislang größten Studie zu genetischen Polymorphismen und dem Meningiomrisiko wurde eine statistisch signifikante Assoziation zu Meningiomen für zwölf SNPs in Reparaturgenen entdeckt, darunter das Gen für *Breast Cancer Susceptibility Gene 1-Interacting Protein 1* (BRIP1), welches an der Reparatur von DNA-Doppelbrüchen beteiligt ist und in Verbindung mit der Entstehung des Mamma-Karzinoms gebracht wird. Daher vermuten manche Forscher, dass die beobachtete Assoziation zwischen Meningiomen und Mamma-Karzinom nicht auf hormonellen Faktoren, als vielmehr auf ähnlichen Defekten in DNA-Reparaturgenen beruhe (Wiemels et al., 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des β -Catenin-/Wingless(wnt)- und Hedgehog-Signaltransduktionswegs in der Tumorprogression involviert sind (Wrobel et al., 2005; Laurendeau et al., 2010). Die Expression des Tumorsuppressorgens E-Cadherin (CDH1), eines wichtigen Modulators des wnt-Signalwegs, welcher in einer Studie bei etwa einem Drittel der Meningiome verändert war, war in aggressiven Meningiomen bei gleichzeitiger Hochregulation von β -Catenin herab reguliert (Mawrin and Perry, 2010). Außerdem wurde eine Überaktivierung des *Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors* (EGFR) und des PDGFR- β entdeckt (Riemenschneider et al., 2006).

Familiäre Meningiome treten am häufigsten im Zusammenhang mit der Neurofibromatose Typ 2 auf, wo sie den zweithäufigsten Tumortyp nach Schwannomen des N. vestibularis darstellen. Eine Assoziation mit anderen hereditären Tumorsyndromen indes ist selten, nur wenige Fälle wurden für das Cowden-Syndrom, das Li-Fraumeni-Syndrom und die Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN1) beschrieben. Ob es sich hierbei um eine kausale Verknüpfung oder um eine Koinzidenz handelt, ist unklar (Mawrin and Perry, 2010). Verwandte 1. Grades von Meningiopatients tragen ein ungefähr dreimal so großes Risiko, selbst zu erkranken, wie die Gesamtbevölkerung (Bethke et al., 2008).

Exposition gegenüber ionisierender Strahlung gilt als gesicherter Risikofaktor für Meningiome, mit bis zu zehnfach erhöhtem Erkrankungsrisiko. Außerdem wird ein hormoneller Einfluss auf die Tumorgenese von einer Reihe an Beobachtungen suggeriert: Die Inzidenz für geschlechtsreife Frauen ist mehr als doppelt so hoch wie für Männer, einige

2. Einleitung

Meningiome exprimieren - geschlechtsunabhängig - Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptoren und es gibt Hinweise darauf, dass die Tumorgroße mit Schwangerschaft und weiblichem Hormonzyklus variiert. Dennoch sind die genauen Zusammenhänge bislang unklar und es liegt lediglich eine eingeschränkte statistische Evidenz für ein erhöhtes Risiko durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva vor, während die aktuelle Datenlage auf ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei der Hormonersatztherapie hindeutet (Wiemels et al., 2010).

2.1.2 Pathologie

Die Mehrheit der Meningiome ist makroskopisch von umliegenden Hirnstrukturen eindeutig abgrenzbar und breitbasig der Dura mater angeheftet. Von runder oder flacher Form, besitzen sie eine glatte oder leicht lobulierte Oberfläche. Eine feste oder gummiartige Konsistenz ist charakteristisch und die Schnittfläche erscheint oft grob-körnig. Eine Infiltration des knöchernen Schädels tritt selten auf, ist nicht-destruktiv und imponiert makroskopisch als Hyperostose. Die Arterien der Schädelbasis können, bei in der Regel unbeeinträchtigtem Blutfluss, von Tumorgewebe eingemauert werden (Perry et al., 2007). Für eine Auswahl an makroskopischen Bildern s. Abb. 1 und Abb. 3.

Es wird davon ausgegangen, dass Meningiome sich von Deckzellen der Arachnoidea mater ableiten. Sie besitzen häufig mesenchymale (u.a. spindelförmige Morphologie und Produktion eines kollagenen Stromas) und epitheloide (u.a. zahlreiche Zellkontakte, Expression von *Epithelial Membrane Antigen* (EMA) und sekretorische Funktionen) Anteile. Grundsätzlich weisen sie ein breites Spektrum an histologischen Mustern auf, die nicht selten gemischt auftreten. Oft lassen sich kleine, durch Zellnekrosen entstandene Verkalkungen, sog. Psammomkörperchen, abgrenzen. Die aktuell gültige WHO-Klassifikation ordnet basierend auf verschiedenen histopathologischen Kriterien 16 Meningiomsubtypen die Grade I – III zu (s. Tabelle 1). Der Großteil der Meningiome wird als benigne (WHO-Grad I) klassifiziert, etwa 20% der Meningiome werden als hochgradig

2. Einleitung

(WHO-Grade II und III) eingestuft, verhalten sich aggressiver und sind mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden (Hanft et al., 2010; Mawrin and Perry, 2010).

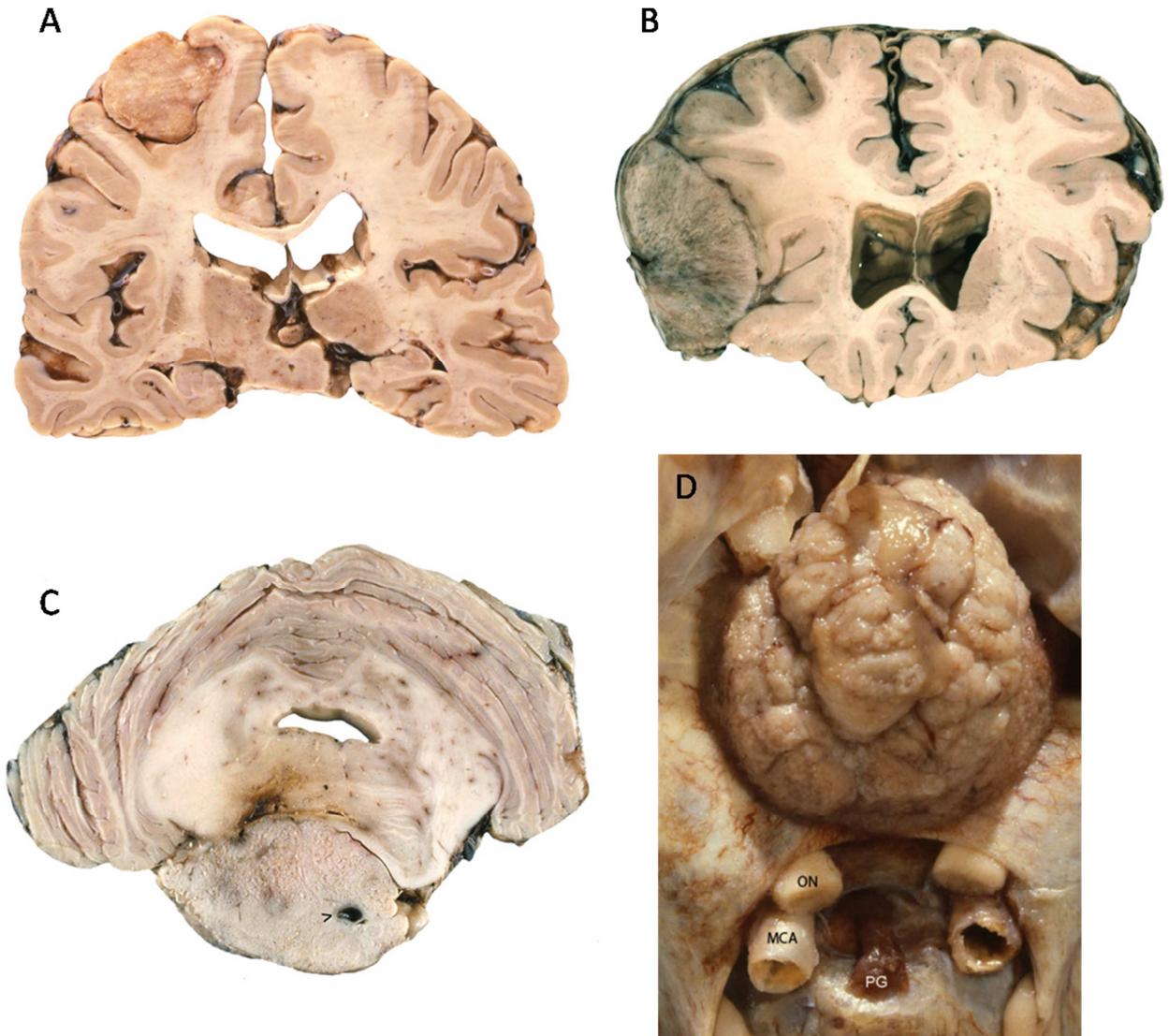


Abb. 3 Makroskopische Bilder von Meningiomen. A Parasagittales Meningiom in der Region des linken Parietallappens. Der Tumor komprimiert, aber infiltrierte den zerebralen Cortex nicht. B Großes Meningiom, das den links-frontalen Cortex komprimiert. Man beachte die Befestigung an der Dura mater und die scharfe Abgrenzung zum Hirngewebe. In dieser Position wachsen Meningiome oftmals eher flach als rund. C Großes Meningiom vom Clivus ausgehend. Man beachte die Kompression des Hirnstamms mit Rückständen einer Blutung. Die A. basilaris (>) wird vom Tumor eingeschlossen, aber nicht okkludiert. D Post mortem Sicht auf die Schädelbasis mit großem, vom Sulcus olfactorius ausgehendem Meningiom. Der Tumor komprimierte frontobasale Hirnstrukturen. Man beachte die glatte, leicht lobulierte Oberfläche. ON N. opticus, MCA A. cerebri media, PG Hypophyse. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Kleihues, Universitätsspital Zürich (<http://www.pubcan.org/cancer/4902/meningioma-nos/macrosocopy>)

2. Einleitung

Anaplastische/maligne Meningiome sind mit 1-2% sehr selten und die durchschnittliche Überlebenszeit betroffener Patienten liegt unter zwei Jahren. Daher ist einer der wichtigsten Prognosemarker die histopathologische Einteilung (*Grading*); ebenfalls von prognostischem Nutzen hat sich der Proliferationsmarker Ki-67/MIB-1 bewährt. Der meningotheleale, fibröse und transitionale Subtyp zählen zu den häufigsten WHO-I-Grad-Meningiomen. Kennzeichnend für den meningothelealen Subtyp (s. Abb. 4) sind dicht gepackte Zellen mit unscharfen Zytoplasmagrenzen, Wirbelbildungen und konzentrische Verkalkungen (Psammomkörperchen).

Tabelle 1 Meningiomsubtyp und WHO-Grad nach der WHO-Klassifikation von 2007

| WHO-Grad | Histologischer Subtyp |
|-----------------------------------|---|
| I (benigne) | meningotheleal, psammomatös, angiomatös, fibrös, transitional, mikrozystisch, sekretorisch, lymphoplasmazytenreich, metaplastisch |
| II (atypisch) | klarzellig, chordoid, atypisch, hirninvasiv |
| III (anaplastisch/maligne) | papillär, rhabdoid, anaplastisch |

Modifiziert nach Hanft et al., 2010

Wiewohl eine lokale Gefäßinvasion relativ häufig auftritt, sind Metastasen eine seltene Komplikation maligner Meningiome und treten nur in etwa 0,1% der Fälle auf. Die Metastasierung erfolgt vorzugsweise in Lunge und Pleura. Anatomische Prädilektionsstellen umfassen die Großhirnkonvexität, den Keilbeinflügel, das Tuberculum sellae, den Clivus, den Kleinhirnbrückenwinkel, die Olfactoriusrinne, die Falx cerebri, das Tentorium cerebelli (Mawrin and Perry, 2010) und etwa 10% der Meningiome entstehen im Spinalkanal (Whittle et al., 2004).

2. Einleitung

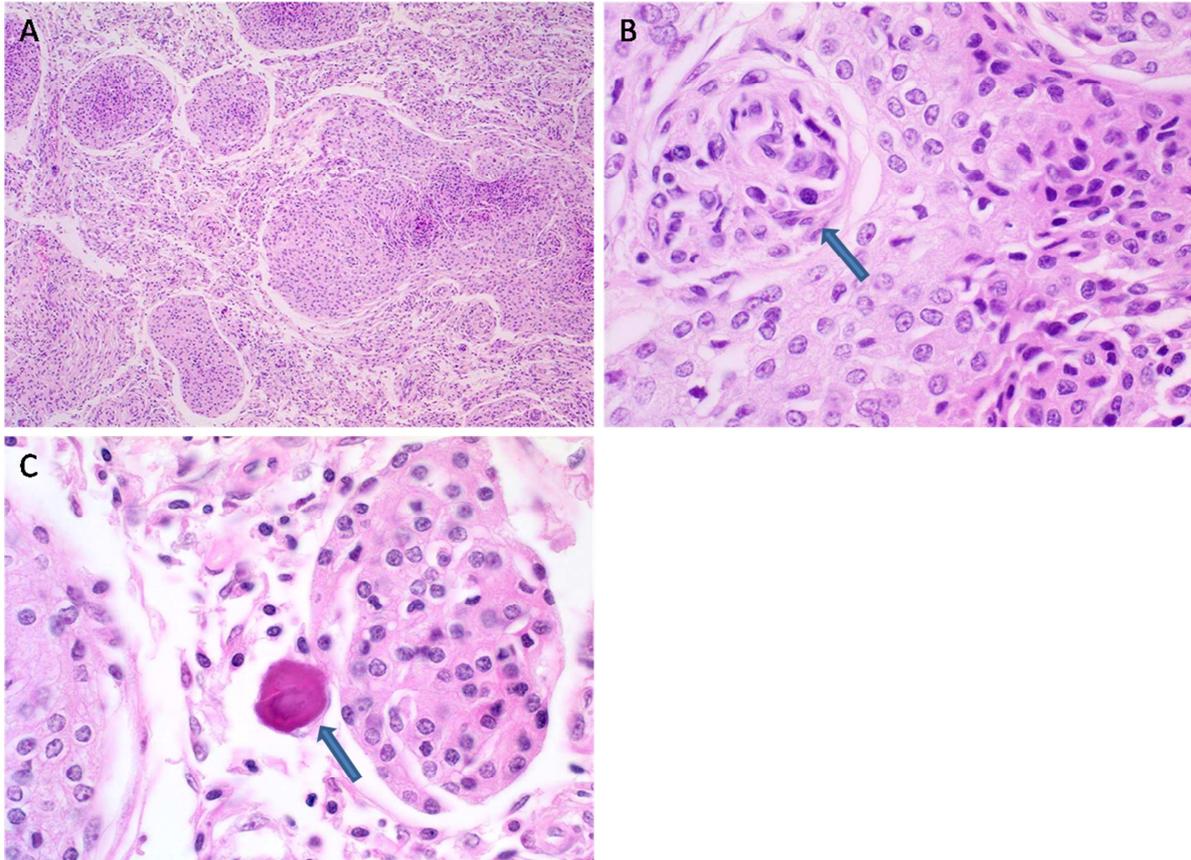


Abb. 4 Präparat eines meningothelialen Meningioms in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. A Klassisches Meningiom, bestehend aus teils kugeligen Verbänden monomorpher Tumorzellen. Zwischen den Tumorzellverbänden kleine Gefäße und schmale Bindegewebssepten. B Monomorpher Tumorzellverband mit Wirbelbildung (*Pfeil*). Die Tumorzellen haben ovale Kerne ohne Atypien und reichlich Zytoplasma. C Runde, angedeutet geschichtete Verkalkung (Psammomkörperchen, *Pfeil*). Mit freundlicher Genehmigung von Frau PD Dr. Glatz, Universitätsspital Basel (<http://alf3.urz.unibas.ch/hipaku-permalink/151.htm>)

2.1.3 Klinik

Durch den weit verbreiteten Einsatz von CT und MRT werden viele subklinische Meningiome als Zufallsbefund gefunden (Whittle et al., 2004), illustriert durch eine holländische Studie, bei welcher auf MRT-Aufnahmen von 2000 asymptomatischen Probanden bei 0,9% ein Meningiom identifiziert wurde (Vernooij et al., 2007). Zudem wurden in Autopsieserien in 2,3% der Fälle Meningiome zufällig entdeckt (Mawrin and Perry, 2010).

2. Einleitung

Abhängig von ihrer Lokalisation rufen Meningiome eine Vielzahl von Symptomen hervor. Oft manifestieren sie sich klinisch durch epileptische Anfälle. In der hinteren Schädelgrube gelegen, können sie einen obstruktiven Hydrozephalus verursachen, der mit Papillenödem und morgendlichen Kopfschmerzen einhergeht. Fokale neurologische Defizite, Hirnnervenausfälle, Ataxie und Persönlichkeitsveränderungen sind möglich. Ein fortschreitender unilateraler Gesichtsfeldausfall ist für das Opticusscheidenmeningiom charakteristisch. In seltenen Fällen kann es durch Kompression des Hypophysenvorderlappens zu einer neuroendokrinen Dysfunktion kommen. Die vor allem im Thorakalmark auftretenden spinalen Meningiome bewirken u.a. eine langsam progressive spastische Paraparese mit oder ohne radikuläre Schmerzen (Whittle et al., 2004). Einen Überblick der Symptome und Untersuchungsbefunde zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2 Häufigkeit von anamnestisch berichteten Symptomen und erhobenen körperlichen Untersuchungsbefunden bei Patienten mit benignen, intrakraniellen Meningiomen

| Symptome | Anzahl der Patienten (in %) | Untersuchungsbefunde | Anzahl der Patienten (in %) |
|---|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Kopfschmerzen | 70 (36) | Parese | 57 (30) |
| Persönlichkeitsveränderung/Konfusion | 43 (22) | ohne Befund | 51 (26) |
| Parese | 37 (19) | Gedächtnisstörungen | 29 (15) |
| Generalisierte Anfälle | 36 (19) | Hirnnervenausfall | 21 (12) |
| Sehstörungen | 30 (16) | Gesichtsfeldausfall | 19 (10) |
| Fokale Anfälle | 29 (15) | Parästhesien | 17 (9) |
| Ataxie | 28 (15) | Aphasie | 17 (9) |
| Aphasie | 19 (10) | Papillenödem | 15 (8) |
| Vigilanzminderung | 13 (7) | Verminderte Sehschärfe | 12 (6) |
| Parästhesien | 11 (6) | Vigilanzminderung | 9 (5) |
| Diplopie | 6 (3) | Nystagmus | 6 (3) |
| Schwindel | 2 (1) | Hörschädigung | 4 (2) |
| Hörschädigung | 2 (1) | | |

Modifiziert nach Rockhill et al., 2007

2.1.4 Diagnose

Das wichtigste diagnostische Verfahren ist die Bildgebung mittels CT oder MRT. Meningiome imponieren als scharf begrenzte, extra-axiale Masse, die das angrenzende Gehirn verdrängt. In der CT erscheinen relativ zum normalen Hirngewebe die meisten Meningiome als leicht hyperdens und besitzen eine starke, homogene

2. Einleitung

Kontrastmittelaufnahme (s. Abb. 2), während sie in der MRT auf T1-gewichteten Bildern isointens oder schwach hypointens und in der T2-Wichtung hyperintens sind, mit ebenfalls starker, homogener Anreicherung nach Kontrastmittelgabe (s. Abb. 5). Wegen des höheren Weichteilkontrastes und größeren Detailreichtums bei der Darstellung intrakranieller Strukturen, insbesondere der hinteren Schädelgrube, ist die MRT der CT vorzuziehen. Auch konventionelle Röntgenbilder des Schädels, meist auf Grund einer anderen Indikation erstellt, können die für Meningiome charakteristischen Befunde einer Tumorverkalkung, Hyperostose, sekundären osteolytischen Läsion und einer Dilatation im Verlauf der A. meningea media zeigen (s. Abb. 6).

Differentialdiagnostisch müssen Krankheitsprozesse berücksichtigt werden, die durch ihre Tendenz, primär die Dura mater oder den Subduralraum zu befallen, Meningiomen ähneln, wie beispielsweise Metastasen oder Lymphome, entzündliche Erkrankungen (z.B. Neurosarkoidose oder Wegener-Granulomatose) und Infektionen, z.B. Tuberkulose (Whittle et al., 2004; Rockhill et al., 2007).

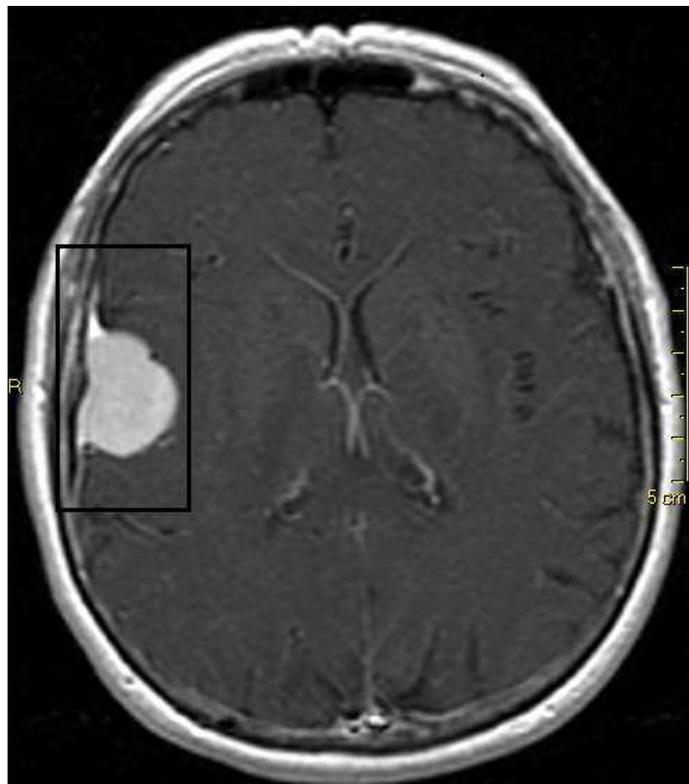


Abb. 5 MRT-Aufnahme in axialer Schnitfführung in T1-Wichtung nach Kontrastmittelgabe. Rechts randständiges Meningiom mit homogener Kontrastmittelaufnahme dargestellt.

2. Einleitung

Wegen der häufigen Invasion zerebraler Venen und venöser Sinus ist die MR-Venographie überaus hilfreich bei der Abklärung von Stenosegrad oder Okklusion größerer Gefäße. Für spezielle Fragestellungen, z.B. postoperative Differenzierung von Residualtumor, Rezidiv und Narbe, können zudem MR-Spektroskopie, PET und Szintigraphie mit radioaktiv markiertem Octreotid, einem Somatostatin-Analogon, von Nutzen sein, denn Meningiome exprimieren sehr häufig Somatostatin-Rezeptoren. Früher galt die Katheter-Angiographie, in der die Gefäßversorgung des Tumors durch meningeale Äste der A. carotis externa und der typische spät-venöse *Tumor Blush* dargestellt werden, als das Standardverfahren zur klinischen Diagnosestellung (s. Abb. 7). Inzwischen ist diese Technik jedoch den mit CT bzw. MRT nicht eindeutig zu klärenden Fällen vorbehalten oder dient der Einschätzung der Gefäßarchitektur des Tumors für die chirurgische Planung und der Vorbereitung einer möglichen präoperativen, endovaskulären Embolisation, um den intraoperativen Blutverlust zu minimieren (Whittle et al., 2004; Rockhill et al., 2007; Saloner et al., 2010).

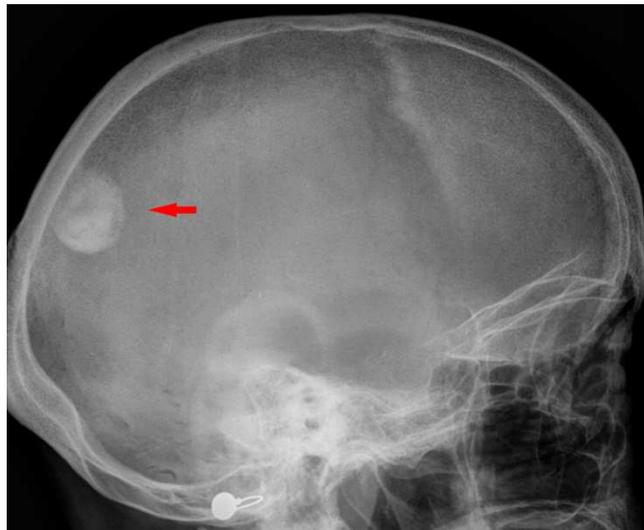


Abb. 6 Röntgenaufnahme des Schädels. Ein Meningiom (*Pfeil*) ist dargestellt.

2.1.5 Therapie

Die Mehrheit asymptomatischer Patienten, bei denen zufällig ein Meningiom entdeckt wurde, kann, solange der Tumor nicht symptomatisch wird oder signifikant an Größe zunimmt, konservativ behandelt werden, vor allem bei einem hohen Alter des Betroffenen

2. Einleitung

oder bei gleichzeitig bestehenden Komorbiditäten, die das Risiko eines chirurgischen Eingriffs deutlich erhöhen würden. Weil das individuelle Tumorstadium unvorhersehbar ist, sind wiederholte MRT-Kontrolluntersuchungen initial im Abstand von sechs Monaten und später, bei gesicherter Stabilität der Tumorausdehnung innerhalb der ersten Jahre, mit steigender Intervalllänge indiziert.

Symptomatische Meningiome werden primär chirurgisch reseziert, mit rezidivfreien Überlebensraten nach totaler Tumoresektion von 93% nach 5 Jahren, 80% nach 10 Jahren und 68% nach 15 Jahren. Basierend auf dem Ausmaß der chirurgischen Exzision erlaubt das postoperative *Grading*-System nach Simpson eine Abschätzung des Rezidivrisikos. Nach partieller Resektion oder bei atypischen und anaplastischen Meningiomen wird eine adjuvante Radiotherapie empfohlen, wobei potentielle Nebenwirkungen der Bestrahlung, wie u.a. Leukoenzephalopathie und kognitive Symptome, mit dem Risiko eines symptomatischen Rezidivs im Kontext der individuellen Lebenserwartung abgewogen werden müssen.

Die stereotaktische Radiochirurgie wurde erfolgreich als primäre Therapie bei chirurgisch nicht zugänglichen Tumoren oder bei Patienten, die aus anderen Gründen für eine Operation nicht in Frage kamen, eingesetzt. Für Patienten mit inoperablen oder hochgradigen Meningiomen, die nach Resektion und Strahlentherapie ein Rezidiv erleiden, befindet sich außerdem eine Vielzahl pharmakologischer Therapieoptionen – insbesondere vielversprechende *Targeted Molecular Agents* – in klinischer Erprobung, darunter klinische Phase-II-Studien zur Evaluierung des monoklonalen VEGF-Antikörpers Bevacizumab, des Chemotherapeutikums Hydroxyurea in Kombination mit Verapamil oder dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib, des Somatostatinrezeptor-Agonisten Pasireotid und des PDGFR- und VEGFR-Inhibitors Sunitinib (Whittle et al., 2004; Rockhill et al., 2007; Wen et al., 2010).

2. Einleitung

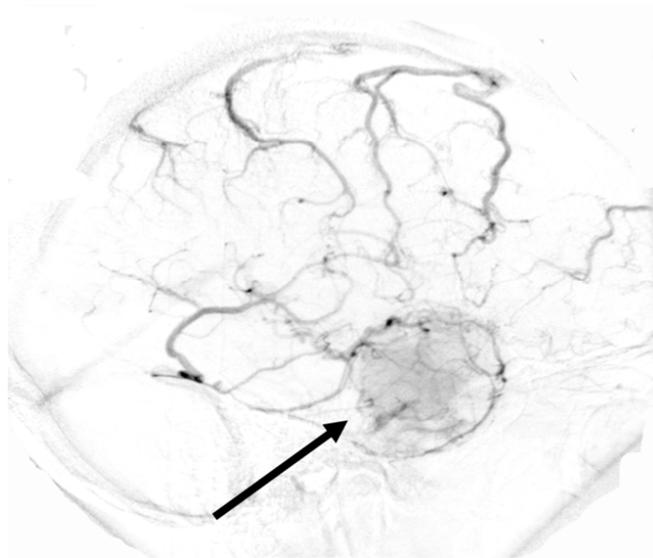


Abb. 7 Angiographie der A. carotis externa. Der für Meningiome typische *Tumor Blush* (Pfeil) ist sichtbar. Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Zimmer, Technische Universität München

2.2 PDGF

2.2.1 PDGF-Familie

Die PDGF-Familie von Wachstumsfaktoren umfasst bedeutende Mitogene für viele Zelltypen mesenchymalen Ursprungs, wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen, und für einige Zellpopulationen neuroektodermaler Herkunft, wie den Oligodendrozyten beispielsweise. Sie besteht aus vier Polypeptid-Ketten, welche von vier verschiedenen Genen codiert werden. Die klassischen PDGF-Ketten, PDGF-A und PDGF-B, wurden bereits vor über 30 Jahren identifiziert und erst deutlich später folgte die Entdeckung von PDGF-C und PDGF-D.

Über Homo- oder Heterodimerisierung dieser vier Ketten entstehen durch Disulfidbrücken verbundene Dimere, welche die bislang beschriebenen fünf Isoformen PDGF-AA, -AB, -BB, -CC und -DD bilden (Fredriksson et al., 2004). PDGF-AA, -AB und -BB wurden in vergleichbaren Mengen in humanen Thrombozyten nachgewiesen (Hart et al., 1990), sie werden als Vorstufen synthetisiert und intrazellulär proteolytisch prozessiert. Die biologische Funktion von PDGF-CC und PDGF-DD, welche im Gegensatz zu den anderen

2. Einleitung

Isoformen als inaktive Vorstufen sezerniert werden und durch limitierte Proteolyse der CUB-Domäne, eines in vielen Proteinen vorhandenen strukturellen Moduls, durch extrazelluläre Proteasen aktiviert werden, ist weitgehend unerforscht; vieles deutet jedoch auf eine wichtige Rolle in der pathologischen Angiogenese hin. Darüber hinaus induziert durch tPA aktiviertes PDGF-CC eine erhöhte Permeabilität der Bluthirnschranke beim ischämischen Schlaganfall (Tallquist and Kazlauskas, 2004; Su et al., 2008; Hou et al., 2010; Kumar et al., 2010).

Alle vier PDGF-Ketten enthalten eine stark konservierte, ca. 100 Aminosäuren lange Wachstumsfaktor-Domäne, bezeichnet als PDGF/VEGF-Homologie-Domäne. Dieses Motiv besitzen ebenfalls die VEGF-verwandten Wachstumsfaktoren. PDGF-A, das durch alternatives *Splicing* als Polypeptide der Länge 196 und 211 synthetisiert wird, und PDGF-B stimmen zu etwa 50% in ihrer Sequenz überein; das gleiche gilt für PDGF-C und PDGF-D. Die die PDGF-Ketten codierenden Gene liegen auf vier unterschiedlichen Chromosomen. Die beiden humanen PDGFA- und PDGFB-Gene sind auf den Chromosomen 7 und 22 lokalisiert, die Gene für PDGF-C und -D hingegen auf Chromosom 4 bzw. 11 (Betsholtz et al., 1986; Fredriksson et al., 2004).

PDGF wird von vielen verschiedenen Zelltypen gebildet, wobei die Synthese oftmals durch externe Faktoren, wie erniedrigte Sauerstoffspannung, Thrombin oder andere Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Obwohl die Expression von PDGF-A und -B unabhängig voneinander reguliert wird, exprimieren die meisten Zellen beide Ketten (Heldin and Westermark, 1999). PDGF-A-mRNA wird in fast allen humanen Geweben und insbesondere in Herz, Pancreas und Skelettmuskel exprimiert. Die größten Mengen an PDGF-B befinden sich vor allem in Herz und Plazenta und an PDGF-C in Herz, Niere und Pancreas, sowie in der Nebenniere. Koexpression von PDGF-A und PDGF-C wurde in Herz, Gehirn, Leber, Niere und Testis gefunden. Außerdem weisen Herz, Pancreas und Ovar eine ebenfalls hohe Expressionsrate von PDGF-D auf (Fredriksson et al., 2004).

2.2.2 PDGF-Rezeptor

Um einen Effekt auf die Zielzellen auszuüben, binden die PDGF-Isoformen an die zwei, strukturell verwandten PDGF-Rezeptoren α und β . Die beiden Rezeptoren haben eine Molekülmasse von ca. 170kDa und 180kDa und besitzen extrazellulär fünf immunglobulin-ähnliche Domänen, sowie eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne. Das humane PDGFR- α -Gen liegt auf Chromosom 4q12 (Heldin and Westermark, 1999) und das PDGFR- β -Gen auf Chromosom 5 (Yarden et al., 1986). Weil die PDGF-Isoformen dimere Moleküle sind, binden sie zwei Rezeptoren gleichzeitig und führen zu deren Dimerisierung, wobei PDGF-AA $\alpha\alpha$ -Rezeptor-Homodimere, PDGF-AB $\alpha\alpha$ -Rezeptor-Homodimere oder $\alpha\beta$ -Rezeptor-Heterodimere und PDGF-BB alle drei möglichen Rezeptorkombinationen induzieren (Heldin and Westermark, 1999).

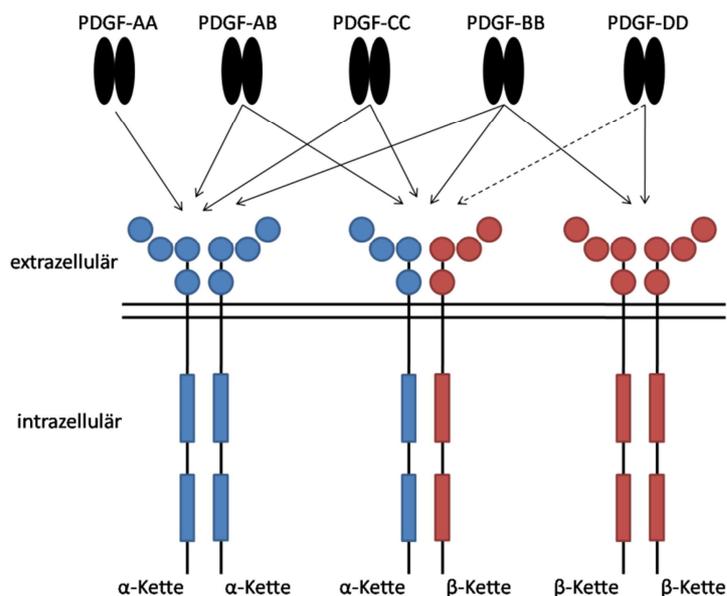


Abb. 8 Rezeptorspezifische Bindung der fünf unterschiedlichen PDGF-Liganden. Die Fähigkeit der fünf PDGF-Isoformen, die homo- und heterodimeren Komplexe von PDGFR- α und PDGFR- β zu binden und zu aktivieren, ist durch Pfeile verdeutlicht. Gestrichelter Pfeil zeigt eine postulierte Aktivierung an. *Modifiziert nach Fredriksson et al., 2004*

Die spezifische Bindung der einzelnen PDGF-Isoformen an die Rezeptorsubtypen ist in Abb. 8 dargestellt. Auf Grund dieses spezifischen Bindungsverhaltens und der unterschiedlichen Signale, die von den Rezeptoren transduziert werden, wird die Antwort einer Zelle auf

2. Einleitung

PDGF-Stimulation maßgeblich von ihrer Rezeptorexpression beeinflusst. Die klassischen PDGF-Zielzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten, exprimieren sowohl PDGFR- α als auch, jedoch in höherer Dichte, PDGFR- β (Heldin and Westermark, 1999). Für eine Übersicht der Expression in verschiedenen Zelltypen s. Tabelle 3. PDGF-Rezeptoren sind ein fundamentaler Stimulator der Zellproliferation in vielen Tumoren und auch humane Meningiome exprimieren PDGF-AA, -BB und PDGFR- β (Maxwell et al., 1990; Wen et al., 2010).

Tabelle 3 Expression von PDGFR- α und - β in verschiedenen Zelltypen

| Zelltyp | PDGFR- α | PDGFR- β |
|---|-----------------|----------------|
| Fibroblasten | + | + |
| Mesangiumzellen | + | + |
| Leydig-Zellen | + | + |
| Ito-Zellen | - | + |
| sinusoidale Endothelzellen der Leber | + | - |
| Myoblasten | - | + |
| vaskuläre glatte Muskelzellen | + | + |
| kapilläre Endothelzellen | - | + |
| Perizyten | - | + |
| Astrozyten | + | - |
| Neurone | + | - |
| Schwanzzellen | + | + |
| Epithelzellen aus der Mamma | - | + |
| retinale Pigmentepithelzellen | + | + |
| Thrombozyten/Megakaryozyten | + | - |
| T-Zellen | - | + |
| myeloische Stammzellen | - | + |
| Makrophagen | - | + |

+ wird exprimiert, - wird nicht exprimiert. *Modifiziert nach Heldin and Westermark, 1999*

Die PDGFR-Expression ist nicht konstant, beispielsweise ist die PDGFR-Expression in Bindegewebszellen in vivo niedrig, erhöht sich allerdings während einer Inflammation (Rubin et al., 1988), oder nach Explantation in Gewebekultur (Terracio et al., 1988).

Typisch für RTK, induziert die Ligandenbindung eine Rezeptor-Dimerisierung, wodurch eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten ermöglicht wird (Heldin and Westermark, 1999). Für die Ligandenbindung ist die Ig-Domäne 2 am wichtigsten, analog zu VEGF, das mit hoher Affinität an die Ig-Domäne 2 des VEGFR-1 bindet, einer RTK mit sieben extrazellulären Ig-Domänen (Wiesmann et al., 1997; Heldin and Westermark, 1999). Während die Rezeptordimerisierung durch Ligandenbindung induziert wird, wird der

2. Einleitung

dimere Rezeptor-Komplex zusätzlich über die Ig-Domäne 4 durch eine direkte Rezeptor-Rezeptor-Interaktion stabilisiert. Die von PDGF auf die Zielzellen ausgeübten Effekte können Zellwachstum, Chemotaxis, Actin-Reorganisation und Hemmung der Apoptose bewirken (Heldin and Westermark, 1999).

2.2.3 Intrazelluläre Signaltransduktion

Eine wichtige Funktion der Autophosphorylierung von Tyrosinresten außerhalb der Kinasedomäne stellt die Erzeugung von Andock-Stellen für Signalmoleküle dar, die eine *Src-Homology 2* (SH2)-Domäne enthalten, während Phosphorylierung innerhalb der Kinasedomäne essentiell für die Kinaseaktivität des Rezeptors ist. Diese SH2-Domäne ist ein in vielen Proteinen vorhandenes, konserviertes Motiv, das phosphoryliertes Tyrosin binden kann. Jedes Molekül mit einer SH2-Domäne, das an PDGFR bindet, initiiert einen Signaltransduktionsweg (Pawson and Scott, 1997; Heldin and Westermark, 1999). Innerhalb weniger Minuten nach Autophosphorylierung kommt es zur Aktivierung – über die SH2-Bindungsdomäne – diverser Signalenzyme, einschließlich der Tyrosinkinase-Familie *Cellular and Sarcoma* (Src), PI3K, *Rat Sarcoma* (RAS) und Phospholipase C γ 1 (PLC1) (Kypta et al., 1990; Tallquist and Kazlauskas, 2004).

Die Aktivierung von PI3K, welcher eine fundamentale Bedeutung für die intrazelluläre Signaltransduktion zukommt, beinhaltet zwei relevante Schritte: Zuerst erfolgt die Translokation der PI3K vom Zytosol zur Plasmamembran, wodurch die Kinase Zugang zu membranständigen Substraten erhält. Der zweite notwendige Schritt ist die Akkumulation von aktiviertem Ras, das an die katalytische Untereinheit von PI3K bindet (Tallquist and Kazlauskas, 2004). Das bevorzugte Substrat der PI3K, welche von vielen verschiedenen Signalen aktiviert wird und über eine große Anzahl von Downstream-Effektormolekülen zahlreiche Zellantworten vermittelt, ist Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), das zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) phosphoryliert wird (Vanhaesebroeck et al., 1997).

2. Einleitung

Die PI3K-/Akt-Signalkaskade begünstigt Wachstum, Überleben und Metabolismus von Tumorzellen (Engelman, 2009). In benignen Meningiomen werden Akt und P70S6K exprimiert, durch Phosphorylierung aktiviert und vermitteln die Signaltransduktion von PDGF-Rezeptoren nach Bindung von PDGF-BB (Johnson et al., 2002).

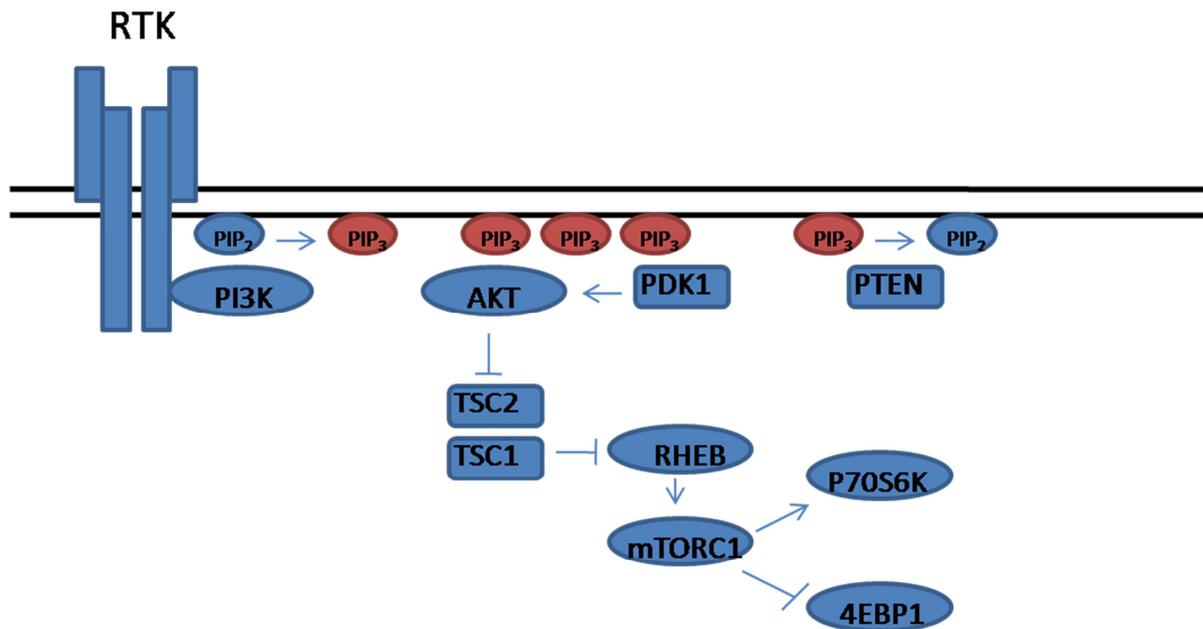


Abb. 9 Schematische Darstellung des PI3K-Akt-mTOR-Signaltransduktionswegs. PI3K generiert an der Plasmamembran durch Phosphorylierung von PIP₂ den *Second Messenger* PIP₃. Die Phosphatase PTEN hingegen dephosphoryliert PIP₃ und terminiert dadurch die PI3K-vermittelten Signale. Akt und PDK1 werden über direkte Bindung an PIP₃ zur Plasmamembran rekrutiert, wo Akt durch Phosphorylierung von PDK1 aktiviert wird. Akt wiederum inaktiviert TSC2, wodurch RHEB mTORC1 aktivieren kann, welches P70S6K und 4EBP1 phosphoryliert. Für Einzelheiten siehe Text. RTK Rezeptor-Tyrosinkinase. Modifiziert nach Engelman, 2009

Eine schematische Darstellung des PI3K-Akt-mTOR-Signalwegs zeigt Abb. 9. Wie weiter oben beschrieben, konvertiert die PI3K, nachdem sie durch eine RTK, wie dem PDGFR, aktiviert worden ist, in der Plasmamembran PIP₂ zu PIP₃. Die PIP₃-Akkumulation wird indes durch den Tumorsuppressor *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) antagonisiert. Genetische Mutationen in PTEN sind u.a. mit Prostata- und Mamma-Karzinom, Glioblastom und verschiedenen Tumor-Syndromen assoziiert (Li et al., 1997; Wullschleger et al., 2006; Engelman, 2009). Trotz der sehr hohen Häufigkeit aktivierender Mutationen in p110 α , der katalytischen Untereinheit von PI3K, scheint die Deletion von PTEN den häufigsten

2. Einleitung

Aktivierungsmechanismus des PI3K-Signalwegs in humanen Tumoren darzustellen (Shaw and Cantley, 2006).

Akt, eine auch Proteinkinase B (PKB) genannte Serin-Threoninkinase, und *Phosphoinositide-dependent Protein Kinase 1* (PDK1) werden über direkte Bindung an PIP₃ zur Plasmamembran rekrutiert, was in der Phosphorylierung und Aktivierung von Akt durch PDK1 resultiert. Aktiviertes Akt wiederum phosphoryliert mehrere zelluläre Proteine, darunter *Tuberous Sclerosis 2* (TSC2), welches dadurch funktionell inaktiviert wird, wodurch *Ras Homologue Enriched in Brain* (RHEB) in GTP-gebundenem Zustand akkumulieren und *Mammalian Target of Rapamycin Complex 1* (mTORC1) aktivieren kann (Engelman, 2009). Die *Tuberous Sclerosis* Proteine TSC1 und TSC2 wirken als Heterodimer und regulieren negativ die Signalübertragung über mTOR. Mutationen in TSC1 oder TSC2 verursachen die Phakomatose Tuberöse Sklerose (Kwiatkowski, 2003).

Eines der bedeutendsten Downstream-Effektormoleküle von Akt ist mTORC1, in welchem verschiedene Informationen, wie Signale von Wachstumsfaktoren, Sauerstoffspannung, Ernährungs- und Energiezustand der Zelle, integriert werden, um das Zellwachstum zu regulieren. mTOR ist eine Serin-Threoninkinase und existiert in den zwei unterschiedlichen intrazellulären Komplexen mTORC1 und mTORC2. mTORC1 bildet einen Komplex aus mTOR, *Regulatory-associated Protein of mTOR* (Raptor), LST8 und *AKT1 Substrate* (AKTS1) (Kim et al., 2002; Engelman, 2009). Aktivierter mTORC1 reguliert durch Phosphorylierung von p70-S6-Kinase (P70S6K) und *4E-binding Protein 1* (4EBP1) die Translation regulatorischer Zellzyklus-Proteine, bestimmter ribosomaler Proteine und Elongationsfaktoren (Engelman, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Überaktivierung von mTOR wesentlich an der Entstehung, Wachstum und Proliferation diverser humaner Tumortypen beteiligt ist (Meric-Bernstam and Gonzalez-Angulo, 2009). Außerdem kontrolliert mTORC1 die Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren, wie z. B. VEGF, indem er *Hypoxia-inducible Factor-1α* (HIF-1α) phosphoryliert (Capdevila et al., 2011). Um zu prüfen, ob tatsächlich der mTOR-Signalweg für durch PDGF vermittelte Effekte von Bedeutung ist, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Inhibitoren von mTOR auf ihre Wirksamkeit getestet.

2. Einleitung

Im Gegensatz zu mTORC2 wird mTORC1 durch Rapamycin (Sirolimus), ein makrozyklisches Lakton, das nach seinem Entdeckungsort, den Osterinseln (Rapa Nui in der Landessprache), benannt wurde, und seine Derivate, wie RAD001 (Everolimus), effektiv inhibiert (Wullschleger et al., 2006; Rini, 2008). Curcumin, der biologisch aktive Inhaltsstoff der Gelbwurz (*Curcuma longa*), bewies ein breites Spektrum an chemopräventiven und antikanzerogenen Eigenschaften in zahlreichen In-vivo- und In-vitro-Studien. Neben einer Reihe anderer molekularer Ziele supprimiert es auch die PI3K-Akt-mTOR-Signalkaskade, indem es sowohl mTORC1 als auch mTORC2 hemmt (Wong et al., 2011).

2.2.4 Physiologische Funktion von PDGF

Genetische Untersuchungen an Mäusen trugen signifikant zu unserem Verständnis der physiologischen Funktionen von PDGF und PDGFR bei. So ergaben phänotypische Analysen von Knockout-Mäusen, dass sie eine Schlüsselrolle für die Embryonalentwicklung spielen. Als spezifische Zellen, die in ihrer Genese auf PDGF-Signale angewiesen sind, wurden u.a. Perizyten, Mesangiumzellen und alveoläre, glatte Muskelprogenitorzellen identifiziert (Hoch and Soriano, 2003; Betsholtz, 2004).

Da vor der Verfügbarkeit genetischer Maus-Mutanten verschiedene In-vitro-Studien einen wichtigen mitogenen Effekt von PDGF-A auf Vorläuferzellen von Oligodendrozyten nahe legten (Noble et al., 1988; Raff et al., 1988; Richardson et al., 1988), überraschte es kaum, dass lebend zur Welt gekommene PDGF-A-Knockout-Mäuse unter einer gravierenden Hypomyelinisierung neuronaler Projektionen im ZNS litten. Auch PDGFR- α -Mutanten besaßen diesen Phänotyp. Proliferation und Migration von Oligodendrozyten hängt empfindlich von PDGF-A ab, welcher im gesamten ZNS von Neuronen und Astrozyten exprimiert wird (Yeh et al., 1991; Betsholtz, 2004).

Ferner ist PDGF relevant für die Kontrolle des interstitiellen Gewebedrucks, wahrscheinlich durch Modulation der Interaktion zwischen Bindegewebszellen und extrazellulärer Matrix. Expressionsanalysen von PDGF und PDGFR beim Wundheilungsprozess und die Wirkung

2. Einleitung

von PDGF auf die beteiligten Zelltypen unterstreichen zudem den wichtigen Beitrag von PDGF an der Wundheilung. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass PDGF-BB die Heilung von Dekubitalulcera fördert (Robson et al., 1992; Heldin and Westermark, 1999).

2.2.5 Rolle von PDGF und PDGFR in der Tumorgenese

PDGF und PDGFR sind an der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt. Studien zur Atherosklerose und Restenose nach perkutaner transluminaler Coronar-Angioplastie (PTCA) fanden eine Überexpression von PDGF und seinen Rezeptoren in diesen Läsionen (Heldin and Westermark, 1999; Li et al., 2011), daneben wurde eine ähnliche Korrelation für einige fibrotische Entitäten der Lunge, Niere, Leber und des Knochenmarks beschrieben (Heldin and Westermark, 1999). Insbesondere für tumorassoziierte Prozesse, einschließlich der autokrinen Wachstumsstimulation von Tumorzellen, der Stimulation der Tumorangiogenese und der Regulation von Zellen des Tumorstromas, besitzen PDGF und PDGFR eine herausragende Bedeutung (Ostman, 2004).

Die ersten Hinweise auf eine autokrine Stimulation durch den PDGF-Rezeptor als einen Mechanismus der Zelltransformation lieferten die Entdeckung, dass die PDGF-B-Kette und das Onkogenprodukt des *Simian Sarcoma Virus* (SSV) v-Sis homolog sind (Doolittle et al., 1983; Waterfield et al., 1983), und der nachfolgende Beweis der transformatorischen Kapazität von PDGF-B-cDNA (Clarke et al., 1984; Gazit et al., 1984; Josephs et al., 1984). Weitere Untersuchungen ergaben ähnliche Ergebnisse für PDGF-AA, -CC und -DD.

Für unterschiedliche Neoplasien konnte eine Assoziation mit aktivierenden Mutationen in den PDGF- und PDGFR-Genen hergestellt werden. Dazu zählen die beiden seltenen dermatologischen Tumorerkrankungen Dermatofibrosarcoma protuberans und das verwandte Juvenile Riesenzellfibroblastom (Ostman, 2004), außerdem gastrointestinale Stromatumoren (GIST), für die in einer Untergruppe eine *Gain-of-Function*-Mutation im PDGFR- α -Gen nachgewiesen wurde (Heinrich et al., 2003), und das idiopathische hypereosinophile Syndrom, bei welchem als Konsequenz einer Deletion auf Chromosom 4

2. Einleitung

ein PDGFR- α -Fusionsgen (*Fip1-like*(FIP1L1)-PDGFR- α) entsteht, was in einer konstitutiven Tyrosinkinase-Aktivität resultiert (Cools et al., 2003). Ferner wurde für eine Untergruppe der BCR-ABL-negativen chronischen myeloischen Leukämie eine Translokation des PDGFR- β , sowie eine Aktivierung des PDGFR- α in anderen myeloproliferativen Krankheitsbildern nachgewiesen (Ostman, 2004). Das Glioblastoma multiforme, einer der aggressivsten ZNS-Tumoren, wird anhand genetischer Veränderungen in, durch PTEN-Mutationen und *Epidermal Growth Factor*-Rezeptor(EGFR)-Amplifikation charakterisierte, primäre und sekundäre Formen mit autokriner PDGFR-Aktivierung und p53-Mutationen unterteilt (Maher et al., 2001). Generell deutet eine Reihe an Untersuchungen darauf, dass autokrine PDGFR-Stimulation kausal mit der Entstehung von Hirntumoren verknüpft ist. Für viele dieser Erkrankungen, bei denen PDGF und PDGFR eine herausragende pathogenetische Rolle spielen, erwies sich die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie z.B. Imatinib, als erfolversprechendes Therapiekonzept (Levitzki, 2004).

Zusätzlich wird eine Beteiligung der PDGF-Isoformen an der Tumorangiogenese postuliert (Li et al., 2003; Ostman, 2004). In Biopsien unterschiedlicher Tumorgewebe ließen sich PDGFR- β -positive Perizyten nachweisen und in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass PDGF die Rekrutierung von Perizyten an Tumorgefäße reguliert (Ostman, 2004). Basierend auf der Erkenntnis, dass die tumorselektive Aufnahme von Chemotherapeutika mit dem interstitiellen Gewebedruck im Tumorstroma, welches im Übermaß den PDGFR- β exprimiert, invers korreliert, wurde in diversen Studien eine pharmakologische Inhibition des PDGFR als potentielle therapeutische Strategie identifiziert, die Effektivität einer Chemotherapie zu steigern (Jain, 2001; Pietras et al., 2001; Pietras et al., 2002; Pietras et al., 2003).

2.3 VEGF-Familie

VEGF-A - üblicherweise als VEGF bezeichnet - reguliert die physiologische Angiogenese während der Embryogenese und spielt ebenso für die tumorassoziierte Angiogenese eine entscheidende Rolle (Ferrara et al., 2003). Die VEGF-Familie strukturell verwandter

2. Einleitung

Wachstumsfaktoren besteht aus VEGF-A, -B, -C, -D und *Placental Growth Factor* (PlGF) (Kerbel, 2008). In-vitro fördert VEGF das Wachstum von arteriellen, venösen und lymphatischen Endothelzellen (Ferrara et al., 2003) und induziert in In-vivo-Modellen eine ausgeprägte angiogenetische Reaktion (Leung et al., 1989), während VEGF-C und -D vor allem in der Lymphangiogenese involviert sind (Karkkainen et al., 2002). Auf Grund der Fähigkeit, die Gefäßpermeabilität zu modulieren, auch als *Vascular Permeability Factor* bekannt, besteht eine signifikante Korrelation zwischen VEGF und entzündlichen Prozessen. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Hochregulation von VEGF bei der Entstehung von Hirnödemen impliziert.

Durch alternatives *Splicing* werden aus dem humanen VEGF-A-Gen vier verschiedene Isoformen generiert, wovon die dominierenden Isoformen VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ frei zirkulieren, wobei ein Teil des sezernierten VEGF₁₆₅ an die extrazelluläre Matrix und Zelloberfläche gebunden bleibt und von Plasmin in ein bioaktives Fragment gespalten werden kann (Ferrara et al., 2003).

Die hauptsächlich parakrine Wirkung von VEGF wird primär über den VEGFR-2, einer RTK, vermittelt, welcher vermehrt von Endothelzellen und zirkulierenden, aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Progenitorzellen exprimiert wird. Die genaue Rolle von VEGFR-1 (*Fms-like-tyrosine Kinase* (Flt-1)), einer verwandten RTK, in der VEGF-vermittelten Angiogenese ist unklar. VEGF-C und -D dienen als Liganden von VEGFR-3 (Flt-4), einem weiteren Mitglied derselben RTK-Familie. Zusätzlich kann VEGF₁₆₅ an Neuropilin-Rezeptoren binden, die als Korezeptoren mit VEGFR-2 interagieren (Ferrara et al., 2003; Kerbel, 2008). Aktivierung von VEGFR-2 mündet in einer Kaskade verschiedener Signalwege, was in der Hochregulierung die Proliferation und Migration von Endothelzellen verstärkender Gene resultiert (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006).

Die VEGF-Expression wird durch eine Vielzahl epigenetischer Faktoren, wie z.B. Sauerstoffspannung, pH, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, gesteuert, aber auch genetische Veränderungen, die zu einer amplifizierten Expression führen, wurden beschrieben (Kerbel, 2008). Die Expression von VEGF-mRNA wird mittels des

2. Einleitung

Transkriptionsfaktors *Hypoxia-inducible Factor 1* (HIF-1), dessen Untereinheit HIF-1 α O₂-abhängig degradiert wird, durch Hypoxie induziert (Semenza, 2003). Beim Von-Hippel-Lindau(VHL)-Syndrom, einer durch multiple Hämangioblastome der Retina und des Cerebellums gekennzeichneten Phakomatose, kommt es durch Inaktivierung des VHL-Gens zu einem konstitutiv aktivierten HIF-1 (Ferrara et al., 2003).

VEGF kann u.a. von Tumorzellen, Makrophagen und vaskulären glatten Muskelzellen gebildet werden. Durch PDGF stimulierte Endothelzellen, die PDGFR- β exprimieren, bilden ebenfalls VEGF, was zu einer autokrinen Modulation der Endothelzellfunktion führt. Die VEGF-Induktion wird dabei durch Aktivierung des PI3K-Signaltransduktionswegs vermittelt (Wang et al., 1999). Ferner konnte gezeigt werden, dass PDGF-B Angiogenese und Wachstum von Gliomen anregt, indem es auch die VEGF-Expression im Tumorendothel stimuliert (Guo et al., 2003). Generell erscheint die Inhibition von VEGF und VEGFR als aussichtsreiches, onkologisches Behandlungskonzept mit signifikanter antitumoröser Wirkung (Kerbel, 2008).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Erkenntnisse zur Biologie von Meningiomen, den häufigsten primären ZNS-Tumoren, zu gewinnen, für die in einer Untergruppe von Patienten bislang keine adäquate Therapie verfügbar ist. Meningiome sind gut vaskularisiert und exprimieren VEGF und VEGFR. Ferner unterstreichen verschiedene Untersuchungen die Relevanz des durch PDGFR- β aktivierten PI3K-Akt-Signalwegs in Meningiomen (Mawrin and Perry, 2010; Wen et al., 2010), so dass ich, unter Berücksichtigung der in Gliomen und normalen Endothelzellen beobachteten Induktion der VEGF-Expression durch PDGF (Wang et al., 1999; Guo et al., 2003), den Effekt verschiedener PDGF-Isoformen auf die Zellproliferation und VEGF-Sekretion in humanen Meningiomen *in vitro* näher beleuchten wollte. Außerdem interessierte ich mich für die Expression von PDGFR- α und - β und die Aktivierung der PI3K-Akt-mTOR-Signalkaskade durch PDGF. Schließlich sollte eine mögliche Wirkung von Curcumin und RAD001 auf Proliferation und VEGF-Sekretion der

2. Einleitung

Meningiomzellen überprüft werden. Beide Substanzen können die PI3K-Akt-mTOR-Signaltransduktion inhibieren und erwiesen sich in einer Reihe von Studien als aussichtsreich in der Tumorbehandlung (Meric-Bernstam and Gonzalez-Angulo, 2009; Wong et al., 2011).

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen

3.1.1 Geräte und Materialien

Die benutzten Geräte und Materialien sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 4 Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|---|
| Blotter Novex® Semi-Dry Blotter | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Brutschrank Heraeus Instruments Typ BB 6220 O2 | Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Bunsenbrenner Fireboy plus | Integra Biosciences (Fernwald, Deutschland) |
| Eismaschine ZBE-150 | Ziegra (Isernhagen, Deutschland) |
| Elektrophoresenetztteil Blue Power 500 | SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland) |
| Elektrophoresenetztteil Power PAC 1000 | Biorad (Hercules, CA, USA) |
| Elektrophoresesystem XCell Sure Lock™ | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Gefrierschrank Öko Arctic | AEG (Nürnberg, Deutschland) |
| Gefrierschrank HFU-686 Herafreeze | Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Gefriertruhe HFC-586 Herafreeze | Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Kryostat CM 30505 | Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland) |
| Kühl-Gefrierkombination | Liebherr (Biberach an der Riss, Deutschland) |
| Kühl-Thermomixer KTMR-133 | Haep Labor Consult (Bovenden, Deutschland) |
| Microplaterreader MR 5000 | Dynatech (Denkendorf, Deutschland) |
| Mikroskop Axioscop 2 | Carl Zeiss (Jena, Deutschland) |
| Mikroskop IMT-2 | Olympus (Hamburg, Deutschland) mit UV-Licht von Olympus (100W High Pressure Mercury Burner) |
| Mikrowelle | Siemens (München, Deutschland) |
| Multipipette Multipipette® plus | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Neubauer Zählkammer | Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland) |
| Pipette Pipetus® | Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland) |
| Pipetten Reference®, variable Volumina | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Präzisionswaage AT261 | Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz) |
| Schüttelgerät Duomax 1030 | Heidolph (Schwabach, Deutschland) |
| Spektrophotometer DU-600 | Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) |
| Spektrophotometer Smartspec™ Plus | Biorad (Hercules, CA, USA) |
| Sterile Werkbank LaminAir® HB 2472 | Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Super PAP Pen | Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) |
| Szintillationszähler LS 6000 IC | Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) |
| Thermoblock Techne DriBlock DB2A | Bibby Scientific (Staffordshire, UK) |
| Thermocycler T3 | Biometra (Göttingen, Deutschland) |
| Vortex-Gerät Genie 2™ | Bender & Hobein (Zürich, Schweiz) |
| Wasserbad Typ 1004 | Gesellschaft für Laborbedarf (Burgwedel, Deutschland) |
| Zentrifuge Biofuge Primo | Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) |

3. Material und Methoden

| Gerät | Hersteller |
|------------------------------------|----------------------------------|
| Zentrifuge Centrifuge 5415R | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |

Tabelle 5 Verwendete Materialien

| Material | Hersteller |
|--|---|
| Biomax MR Film | Kodak (Stuttgart, Deutschland) |
| Blottingpapier 3MM | Whatman International (Meidstone, UK) |
| Costar EIA Plate | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| Einweghandschuh Semper Guard Latex | Sempermed (Wien, Österreich) |
| Einweghandschuh Semper Guard Nitril | Sempermed (Wien, Österreich) |
| Hybond ECL Nitrocellulose Membrane | Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) |
| Hyperfilm ECL | Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) |
| Insulinspritzen Micro Fine+ U-40 | Beckton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) |
| Multipipettenspitzen | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Multiwell Platten | Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) |
| Parafilm® | Pechiney Plastic Packaging (Menasha, WI, USA) |
| Pasteurpipetten | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| PCR-Reaktionsgefäße | Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland) |
| Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| PP-Röhrchen | Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich) |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Serologische Pipetten | TPP (Trasadingen, Schweiz) |
| SuperFrost® Plus Objektträger | Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland) |
| Zellkulturflaschen | TPP (Trasadingen, Schweiz) |
| Zellschaber | TPP (Trasadingen, Schweiz) |
| Zentrifugenröhrchen | TPP (Trasadingen, Schweiz) |

3.1.2 Chemikalien und Lösungen

Die benutzten Chemikalien und Lösungen sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 6 Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|---------------------------------|--|
| Acridinorange | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Agarose | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ampuwa Wasser | Frisenius (Deutschland) |
| Anti-Kaninchen IgG (IHC) | Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) |
| Anti-Kaninchen IgG (WB) | Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) |
| Anti-Maus IgG (WB) | Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) |
| Anti-Ziege IgG (IHC) | Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) |
| β-Actin-Antikörper | Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) |
| β-Mercaptoethanol | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| BSA | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |

3. Material und Methoden

| Chemikalie | Hersteller |
|--|--|
| Cell Lysis Buffer NP40 | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Chloroform | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| CoCl₂ | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Collagenase | Worthington Biochem Corp. (Lakewood, NJ, USA) |
| Curcumin | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| D-Glukose | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| DAB | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| DEPC | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| DMSO | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| DNase | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| dNTP-Mix | MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| DuoSet® ELISA Development System | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| ECL Plus Western Blotting Detection System | Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) |
| Entwicklerlösung | Kodak (Stuttgart, Deutschland) |
| Essigsäure | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| Ethanol 70% | Medizet (München, Deutschland) |
| Ethanol 96% | Medizet (München, Deutschland) |
| Ethanol 100% | Medizet (München, Deutschland) |
| EDTA | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| Ethidiumbromid | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| FCS | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Ficoll 400 | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| 5X First-strand Buffer | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Fixierlösung | Kodak (Stuttgart, Deutschland) |
| ³H-Thymidin | Perkin-Elmer (Boston, MA, USA) |
| HCL | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Hexanucleotid-Mix | Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN, USA) |
| HIF-1α-Antikörper | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| Hyaluronidase | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Insulin Actrapid HM | Novo (Mainz, Deutschland) |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| KCL | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat) | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| L-Glutamin | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| Marker 1kb Plus DNA Ladder | Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) |
| MagicMark™ XP Western Protein Standard | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| MEM-Vitamine | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| MgCl₂ (Magnesiumchlorid) | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| Milchpulver | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| mTOR-Antikörper | Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) |
| Na-Acetat | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| NaCl | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Na-Citrat | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| Na₂H₂PO₄·2H₂O (Dinatriumphosphatdihydrat) | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| Na-Selenit | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| Novex® 4-12% Tris-Glycine Gel | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Novex® Tris-Glycine SDS Running Buffer | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |

3. Material und Methoden

| Chemikalie | Hersteller |
|---|--|
| Novex® Tris-Glycine SDS Transfer Buffer | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Paraformaldehyd | MERCK (Darmstadt, Deutschland) |
| Partricin | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| PBS | Gibco Europe (Karlsruhe, Deutschland) |
| PDGF-AA (human) | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| PDGF-AB (human) | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| PDGF-BB (human) | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| PDGFR-α-Antikörper (IHC) | Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) |
| PDGFR-β-Antikörper (IHC) | Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) |
| Penicillin + Streptomycin | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| Pferdeserum | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Phenol | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Phospho-Akt Pathway Sampler Kit | Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) |
| Phospho-mTOR-Antikörper | Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) |
| Polyacrylamid | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Precision Plus Protein Dual Color Standards | Biorad (Hercules, CA, USA) |
| Protease Inhibitor Cocktail | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Proteine Assay Dye Reagent | Biorad (Hercules, CA, USA) |
| RAD001 | Novartis (Nürnberg, Deutschland) |
| Reagent Diluent (1% BSA in PBS, pH=7,2 - 7,4, 0,2μm filtriert) | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| Reverse Transkriptase (SuperScript™ II) | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Roti®-Histokitt | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Roti®-Histol | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Roti®-Load 1 | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Stop Solution (2N H₂SO₄) | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| Substrate Solution (1:1 Mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidin)) | R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) |
| Taq DNA-Polymerase | MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| Toluidinblau | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Transferrin | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Trichloressigsäure | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Trijodthyronin (T3) | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| TRIS-Glycin 10% Gel | Anamed (Darmstadt, Deutschland) |
| TRIS | ICN Pharmaceuticals (Aurora, OH, USA) |
| Triton® X-100 | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| TRizol®-Reagenz | Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) |
| Trypsin-EDTA (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA) | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Trypsin-Inhibitor | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Tween® 20 (Polysorbat-20) | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Ultima Gold Scintillation Solution | Packard Bioscience (Gromingen, Netherlands) |
| VECTASTAIN® ABC-Kit | Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) |
| VEGF-Primer | MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) |
| Wasserstoff-Peroxid | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| WST-1-Reagenz | Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN, USA) |
| Xylencyanol | Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) |
| Xylol | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |

3. Material und Methoden

Tabelle 7 Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen

| Lösung | Zusammensetzung |
|---|--|
| Acridinorange-Ethidiumbromid-Färbelösung | 50µl Acridinorange (200mg/l) 50µl Ethidiumbromid (10mg/l) 900µl PBS |
| Collagenase-Mix 1000 U/ml | In 100ml HDB: 4g Collagenase: 10mg Trypsin-Inhibitor 100mg Hyaluronidase 400mg BSA 500µl DNase |
| DEPC-Wasser | 200µl DEPC/l deionisiertes Wasser |
| HDB (HEPES- Puffer) | HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure): 5,95g/l NaCl: 8g/l KCl: 0,37g/l NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O: 0,12g/l Glucose: 1,982g/l Partricin 25µg/ml: 10ml/l Penicillin/Streptomycin 10 ⁵ U/l : 10 ml/l Mit NaOH pH auf 7,3 titrieren |
| Loading Buffer (für Agarosegel) | 10g Ficoll 400 25mg Bromphenolblau 25mg Xylene cyanol 4ml 0,5M EDTA pH = 8 Mit destilliertem Wasser auf 50ml auffüllen |
| Lösung (Solution) D | 4M Guanidinthiocyanat: 250g/337ml 0,75M Na-Citrat (pH=7,0): 17,6ml/337ml 10% Sarkosyl: 26,4ml/337ml gelöst in 293ml DEPC 180µl β-Mercaptoethanol/25ml vor Gebrauch hinzufügen |
| Paraformaldehyd 4% | Paraformaldehyd: 4g/100ml Na-Phosphat-Puffer: 20ml/100ml Ampuwa Wasser: 80ml pH auf 7,4 mit 1M NaOH titrieren Auf 56°C erhitzen, filtern und vor Gebrauch kühlen |
| TB | TRIS: 12,114g/l pH = 7,6 |
| TBS | TRIS: 2,42g/l NaCl: 8g/l pH = 7,6 |
| TBST | TBS + 0,1% Tween® 20 |
| TRIS-Acetat-EDTA (TAE) | 242g TRIS 57,1ml Essigsäure 100ml 0,5M EDTA pH = 8 Mit destilliertem Wasser auf 1l auffüllen |
| TRIS-HCL | 1mM TRIS: 121,14g/l HCL |
| Wash Buffer | 0.05 % Tween® 20 in PBS, pH 7,2 – 7,4 |

3. Material und Methoden

3.1.3 Humanes Tumorgewebe

Die Tumorpräparate humanen Ursprungs stammten aus den neurochirurgischen Kliniken der Technischen Universität München, der Ludwig Maximilians Universität München und des Schwarzwald-Baar Klinikums Villingen-Schwenningen. Tabelle 8 zeigt Alter und Geschlecht der Patienten, von denen die Resektate stammten, sowie den zugehörigen Proliferationsindex und den histologischen Typ des Gewebes. Nicht alle Tumoren lieferten verwertbare Ergebnisse, da es in seltenen Fällen zu Kontaminationen oder technischen Problemen in der Zellkultur gekommen war.

Tabelle 8 Patientendaten, Proliferationsindex, In-situ-Lokalisation und Histologie des verwendeten Tumorgewebes

| Tumor | Patientenalter in Jahren | Ki-67-/Mib1- Proliferations- Index | Geschlecht | Histopathologischer Typ | Lokalisation in-situ |
|------------|-----------------------------|--|------------|----------------------------|---|
| M1 | 37 | 5 % | m | MM (WHO Grad I) | parasellär |
| M2 | 50 | unbekannt | m | MM (WHO Grad I) | rechts frontobasal |
| M3 | 62 | 1 – 2 % | w | TM (WHO Grad I) | links frontotemporal |
| M4 | 77 | 3 % | w | MM (WHO Grad I) | rechter Kleinhirnbrückenwinkel |
| M5 | 79 | 3 % | w | MM (WHO Grad I) | linkes Keilbein |
| M6 | 79 | 1 – 2 % | w | FM (WHO Grad I) | rechter Kleinhirnbrückenwinkel |
| M7 | 49 | 5 % | m | MM (WHO Grad I) | rechts frontal |
| M8 | 65 | < 1 % | m | MM (WHO Grad I) | links frontobasal |
| M9 | 65 | 7 – 8 % | m | MM (WHO Grad I) | links temporal |
| M10 | 62 | 7 % | w | MM (WHO Grad I) | Falxregion links frontal |
| M11 | 70 | unbekannt | m | MM (WHO Grad I) | unbekannt |
| M12 | 66 | unbekannt | w | MM (WHO Grad I) | unbekannt |
| M13 | 77 | unbekannt | w | MM (WHO Grad I) | unbekannt |
| M14 | 71 | 7 – 10 % | m | AM (WHO Grad II) | rechtes Keilbein |
| M15 | 70 | unbekannt | w | TM (WHO Grad I) | unbekannt |
| M16 | 68 | 3 % | w | MM (WHO Grad I) | Falxregion links frontobasal |
| M17 | 72 | unbekannt | w | AGM (WHO Grad I) | unbekannt |
| M18 | 79 | 7 – 10 % | m | MM (WHO Grad I) | links frontotemporal |
| M19 | 37 | < 10 % | w | MM (WHO Grad I) | linkes Keilbein |
| M20 | 62 | > 10 % | w | AM (WHO Grad II) | linker Kleinhirnbrückenwinkel |
| M21 | 76 | 30 % | m | AM (WHO Grad II) | Kleinhirnbrückenwinkel und Tentorium |
| M22 | 50 | unbekannt | m | MM (WHO Grad I) | unbekannt |
| M23 | 66 | unbekannt | w | MM (WHO Grad I) | unbekannt |
| M24 | 69 | 1 – 2 % | w | MM (WHO Grad I) | rechts parasagittal |

m männlich, *w* weiblich, *AGM* angiomatöses Meningiom, *AM* atypisches Meningiom, *FM* fibroblastisches Meningiom, *MM* meningotheliales Meningiom, *TM* transitionales Meningiom

3.2 Methoden

Alle angewandten Methoden waren im Labor etabliert und die Arbeitsgruppe hatte bereits auf dem Gebiet der Meningiomforschung diverse Publikationen veröffentlicht (Pagotto et al., 1995; Tichomirowa et al., 2008).

3.2.1 Zellkulturmethoden

Alle Arbeiten mit Zellkulturen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Als Kulturmedium wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) verwendet, das zusätzlich 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2 mmol/l L-Glutamin und 0,5 mg/l Partricin, 10^5 U/ml Penicillin-Streptomycin, 40 U/l Insulin, 20 ng/l Natriumselenit, 5 mg/l Transferrin, 30 pM Trijodthyronin, 2 mM MEM-Vitamine und 10 ml/l nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS) enthielt.

3.2.1.1 Präparation des Tumorgewebes

Der Transport der Tumorpräparate von der Klinik ins Institut erfolgte gekühlt in mit Tumormedium gefüllten Zentrifugenröhrchen. Zwischen der operativen Entfernung des Tumors und der Tumorpräparation vergingen ca. 16 – 24h. Vor der Präparation erfolgte die Anonymisierung und Dokumentation der zugehörigen Daten, wobei jedem Tumor eine laufende Nummer zugeordnet wurde.

Als erster Schritt wurde das Tumorgewebe mehrfach mit glucosehaltigem HDB+-Puffer gespült, bis die Pufferlösung einen klaren Aspekt hatte. Daraufhin wurde das Gewebe mit einem Skalpell auf einer Glaspetrishale in kleine Stücke geschnitten, wovon ein Teil für spätere Experimente, wie IHC (s. 3.2.3.1) oder RNA-Extraktionen (s. 3.2.4.1), mittels Trockeneis schockgefroren und bei -80° C aufbewahrt wurde. Das verbliebene Tumorgewebe wurde anschließend in eine Enzymlösung (Collagenase-Mix) gegeben und bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Der Verdauungsprozess betrug abhängig von der

3. Material und Methoden

Tumorbeschaffenheit 30 – 90 min und wurde mechanisch durch wiederholtes, vorsichtiges Auf- und Abziehen in einer silikonbeschichteten Pasteurpipette unterstützt. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde durch zweimaliges Zentrifugieren bei 1.200 U/min für jeweils 4min, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren in Zellkulturmedium von Resten der Enzymlösung befreit. Nach der Zugabe von Acridinorange-Ethidiumbromid-Färbelösung zu einem Aliquot der Zellsuspension wurden im UV-Licht die lebenden Zellen in einer Neubauer Zählkammer per Mikroskop gezählt.

Acridinorange wird als Lebendfarbstoff von vitalen Zellen aufgenommen und färbt die Zellkerne grün. Ethidiumbromid dagegen wird von der Zelle nur durch eine geschädigte Zellmembran aufgenommen und färbt den Zellkern orange. Bei Rotfärbung der Zellen liegen entweder Nekrose oder Apoptose in einem späten Stadium vor (Halle, 2005).

3.2.1.2 Primärzellkultur

Es bewährte sich, die durch die Tumorpräparation gewonnenen Zellen initial als *Monolayer* mit 20 ml Zellkulturmedium je Flasche und einer Zelldichte von ca. 10^5 /ml in Zellkulturflaschen auf einer Fläche von 75 cm² im Brutschrank bei 37° C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ zu kultivieren. Bei Bedarf wurde, abhängig von der Zellproliferation, das Kulturmedium gewechselt.

3.2.1.3 Subkultivierung (Passagieren/Splitten) der Zellkulturen

Wenn sich unter dem Mikroskop ein konfluentes Wachstum der adhärennten Zellen gezeigt hatte, erfolgte die Subkultivierung. Benötigte Medien und Trypsin-EDTA-Lösung wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37° C erwärmt (optimale Temperatur für die Trypsinwirkung). Das Zellkulturmedium wurde verworfen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben. Nach ca. fünfminütiger Inkubation bei 37° C und kräftigem Beklopfen der Zellkulturflasche lösten sich die Zellen ab. Zur Beendigung der enzymatischen Reaktion wurde FCS-haltiges Zellkulturmedium (mindestens 8 ml) hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipette durch

3. Material und Methoden

Auf- und Abziehen vorsichtig vom Boden der Kulturflasche abgespült und in einem Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 1.200 U/min zentrifugiert, um das Trypsin-EDTA zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Für die Zellzählung in der Neubauer Kammer und die Vitalitätsbestimmung mit Acridinorange/Ethidiumbromid wurde ein Aliquot abgenommen. Die Zellen konnten daraufhin im gewünschten Verhältnis passagiert und in neuen sterilen Zellkulturgefäßen kultiviert werden oder standen für weitere Zellkulturversuche zur Verfügung.

3.2.1.4 Stimulations- und Inhibitionsversuche

Die, wie in 3.2.1.3 beschrieben, gezählten und resuspendierten Zellen wurden für verschiedene Experimente in 6-, 48- und 96-Well-Platten oder Petrischalen ausgesät. Für die spätere Messung der VEGF-Sekretion mittels ELISA (s. 3.2.3.2) oder für die Proliferationsbestimmung durch den ^3H -Thymidineinbau (s. 3.2.1.7) wurden die Zellen auf 48-Well-Platten, abhängig von der vorhandenen Zellzahl, in einer Dichte von 20.000 bis 100.000 Zellen je *Well* in 500 μl Zellkulturmedium je *Well* ausgesät, wobei die äußersten *Wells* einer Platte keine Zellen enthielten und nur mit 500 μl PBS befüllt waren, und 24h lang im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die inzwischen angewachsenen Zellen, nach etwa fünfstündiger Serumdeprivation, mit 500 $\mu\text{l}/\text{Well}$ PDGF-AA, -AB oder -BB, das in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml in Kulturmedium mit 0,1% oder 1% FCS gelöst war, stimuliert (in dieser Arbeit wurden für alle Versuche humane PDGF-Isoformen benutzt). Jeweils vier *Wells* wurden mit den unterschiedlichen Konzentrationen oder ausschließlich mit dem Kulturmedium mit 0,1% resp. 1% FCS zur Gewinnung von Basalwerten beschickt (für eine schematische Darstellung s. Abb. 10).

Nach 24h, 48h oder 72h Inkubation wurden die abpipettierten Überstände bei -20°C für die weitere Messung durch den VEGF-ELISA aufbewahrt oder es wurde direkt mit dem ^3H -Thymidineinbau fortgefahren. Analog wurden für Inhibitionsversuche RAD001, welches in Kulturmedium mit 10% FCS 10^{-7} bis 10^{-11} M vorlag, wobei für die Basalwerte Kulturmedium mit 10% FCS und 10^{-8} M DMSO verwendet wurde, oder Curcumin, das in Kulturmedium mit

3. Material und Methoden

10% FCS 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M oder 20 μ M vorlag, wobei für die Basalwerte Kulturmedium mit 10% FCS und 3% DMSO verwendet wurde, benutzt.

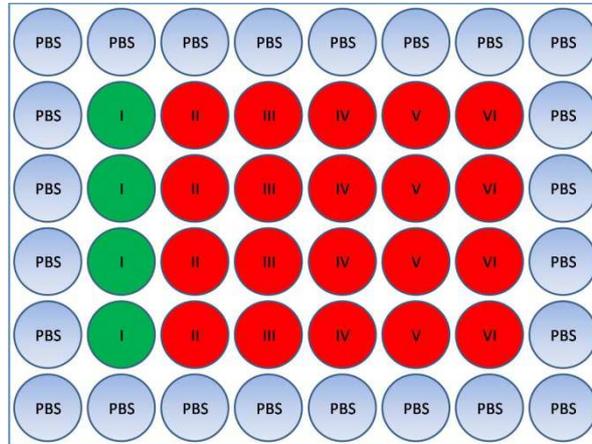


Abb. 10 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit einer 48-Well-Platte. In den mit PBS gekennzeichneten Feldern befanden sich 500 μ l PBS. Die römischen Ziffern geben die entsprechende Condition an. Die grünen Felder oder Condition I dienten in der Regel der Messung von Basalwerten. Am Beispiel von PDGF-AA lauteten die Conditions wie folgt: (I) Kulturmedium mit 1% FCS, (II) 0,1 ng/ml PDGF-AA, (III) 0,5 ng/ml PDGF-AA, (IV) 1 ng/ml PDGF-AA, (V) 5 ng/ml PDGF-AA, (VI) 10 ng/ml PDGF-AA (jeweils 500 μ l/Well und (II)-(VI) in Kulturmedium mit 1% FCS)

Für die Wachstumsbestimmung durch den WST1-Assay (s. 3.2.1.6) wurden die Zellen auf 96-Well-Platten in einer Dichte von 2.000 bis 10.000 Zellen je Well in 100 μ l Kulturmedium je Well ausgesät, wobei die äußersten Wells einer Platte keine Zellen enthielten und nur mit 100 μ l PBS befüllt waren, und 24h lang im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die inzwischen angewachsenen Zellen, nach etwa fünfstündiger Serumdeprivation, mit 100 μ l je Well PDGF-AA, -AB oder -BB, das in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml in Kulturmedium mit 0,1% oder 1% FCS gelöst war, stimuliert. Jeweils sechs oder zehn Wells wurden mit den unterschiedlichen Konzentrationen oder ausschließlich mit dem Kulturmedium mit 0,1% bzw. 1% FCS zur Gewinnung von Basalwerten beschickt. Nach 24h, 48h oder 72h wurde mit dem WST1-Assay begonnen. Wie im vorhergehenden Absatz beschrieben, wurden auch bei der Wachstumsbestimmung für Inhibitionsversuche RAD001 und Curcumin benutzt.

3. Material und Methoden

Für Proteinextraktionen (s. 3.2.2.1) wurden die Zellen auf Petrischalen in einer Zelldichte von 250.000 – 1.000.000 Zellen je Petrischale in 6 ml Kulturmedium je Petrischale ausplattiert und bis zum Anwachsen im Brutschrank inkubiert. Es folgte über Nacht ein *Serum Wash-out* mit FCS-freiem Medium. Im Anschluss wurden die Zellen mit jeweils 6 ml je Petrischale PDGF-AA oder -BB, das in einer Konzentration von 10 ng/ml in FCS-freiem Medium gelöst worden war, stimuliert. Zudem wurden als Kontrolle zwei Petrischalen nur mit FCS-freiem Medium befüllt. Nach jeweils 5, 10, 15 und 30 min Inkubationszeit wurde die Stimulation durch sofortiges Ablegen der Petrischale auf Eis und Absaugen des Mediums gestoppt. Nach gleichem Schema wurden die Zellen außerdem mit 250 μ M CoCl₂ für 3h behandelt. CoCl₂ ist eine weit verbreitete Chemikalie, die benutzt wird, um hypoxische Bedingungen zu imitieren, und kann in humanen Zellen HIF-1 aktivieren (Torii et al., 2011).

Für RNA-Extraktionen (s. 3.2.4.1) wurden die Zellen auf 6-Well-Platten in einer Zelldichte von ca. 250.000 Zellen je Well in 1 – 2 ml Kulturmedium ausgesät und 24h im Brutschrank inkubiert. Als nächstes wurden drei Wells mit jeweils 1 ml PDGF-AA oder -BB, das in einer Konzentration von 10 ng/ml in Medium mit 1% FCS gelöst worden war, und drei Wells mit jeweils 1 ml Medium mit 1% FCS als Kontrolle für 24h stimuliert. Nach gleicher Vorgehensweise wurde anstatt PDGF 10⁻⁷ M RAD001, das in Medium mit 10% FCS gelöst war, zur Inhibition benutzt.

3.2.1.5 Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer

Die Zellzählung wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer durchgeführt. Sie besteht aus einer rechteckigen, dicken Spezialglasgrundplatte, in deren mittlerem Drittel sich vier Längsspalten, die parallel zu den kurzen Seiten laufen, befinden. Durch Auflage eines Deckglases entsteht zwischen der Grundplatte und dem Deckglas ein 0,1 mm tiefer Kapillarspalt in den die zu zählende Zellsuspension pipettiert wird. Für die Zellzählung sind vier in 16 Quadrate unterteilte Großquadrate mit einer Fläche von jeweils 1 mm² vorhanden. Die in den Quadraten liegenden Zellen werden unter dem Mikroskop gezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

3. Material und Methoden

$$\text{Zellen } \mu\text{l}^{-1} = \frac{(\text{Anzahl gezählter Zellen}) \times (\text{Verdünnung})}{(\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}) \times (\text{Volumen über Quadrat})}$$

3.2.1.6 WST1-Assay zur Proliferationsbestimmung

Der WST1-Assay (*Water Soluble Tetrazolium Assay*) ist eine indirekte Methode zur Quantifizierung der Zellproliferationsrate. Das Prinzip beruht auf der enzymatischen Umwandlung des WST1-Farbstoffes (ein Tetrazolium-Salz) in viablen Zellen durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase in das dunkelrote Formazan, dessen Lichtabsorption photometrisch bei einer Wellenlänge zwischen 420 und 480 nm gemessen werden kann. Dabei korreliert die Aktivität mitochondrialer Enzyme mit der Proliferationsrate der Zelle und kann aus der photometrisch ermittelten Zunahme an Formazan abgeleitet werden.

Die Zellen waren zuvor, wie in 3.2.1.4 beschrieben, in 96-Well-Platten für 24h, 48h oder 72h stimuliert oder inhibiert worden. Unter abgedunkelten Bedingungen wurden jeweils 10 $\mu\text{l}/\text{Well}$ WST-1 Reagenz hinzugegeben und die Platten unter Lichtausschluss im Brutschrank inkubiert. Nach jeweils 15, 30, 60 und 120 min wurde der Farbumschlag im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.2.1.7 ^3H -Thymidin-Inkorporationsversuch zur Proliferationsbestimmung

Prinzip: Beim ^3H -Thymidineinbau handelt es sich um ein quantitatives Verfahren zur Proliferationsbestimmung, bei dem die Aktivität des in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus eingebauten, mit ^3H (Tritium) radioaktiv markierten Nukleosids Thymidin im γ -Counter gemessen wird.

Die Zellen waren zuvor, wie in 3.2.1.4 beschrieben, in 48-Well-Platten für 24h, 48h oder 72h stimuliert oder inhibiert worden. Anschließend wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

3. Material und Methoden

- 1 mCi ^3H -Thymidin-Stammlösung 1:100 mit Kulturmedium (FCS-Gehalt entsprechend vorausgegangener Stimulation/Inhibition) verdünnen (entspricht einer Aktivität von 0,37 MBq oder 10 μCi)
- 4h vor Stimulations-/Inhibitionsende 50 μl dieser Lösung je Well zugeben
- 4h im Brutschrank inkubieren
- Medium abpipettieren (im Radioaktivlabor)
- 500 μl /Well eiskalte 10%ige Trichloressigsäure (TCA) zugeben
- 1h auf Eis im Kühlschrank inkubieren
- TCA entfernen
- 500 μl /Well Triton-NaOH (0,1% Triton; 0,5 M NaOH) zugeben und über Nacht bei 4° C inkubieren
- Platten rütteln
- Überstände in jeweils ein Szintillationsgefäß pipettieren
- 4,5 ml Ultima Gold™ Szintillationslösung hinzugeben
- Vortexen
- Röhrchen in Rack des γ -Counters stellen

Gemessen wurden die Szintillationen/min (*Counts per Minute* = cpm), wobei das Programm für die automatische Messung aller Proben so eingestellt war, dass jede Probe 4 min lang gemessen wurde. Darauf folgte die statistische Auswertung der erhobenen Messdaten.

Der Arbeitsbereich wurde vor und nach dem Experiment mittels Wischtest auf radioaktive Kontaminationen überprüft und alle Materialien, die mit dem radioaktiven Stoff in Berührung kamen, als solche gekennzeichnet und gesondert entsorgt.

3.2.2 Proteinchemische Methoden

3.2.2.1 Proteinextraktion

Die Zellen waren zuvor, wie unter 3.2.1.4 ausgeführt, in Petrischalen ausgesät und stimuliert bzw. inhibiert worden. Nach Ende der Inkubation wurden die Schalen auf Eis gelegt und das Medium verworfen. Die Proteinextraktion wurde nach folgender Vorgehensweise durchgeführt:

- Zellen mit 4° C kaltem PBS waschen
- 1,5 ml 4° C kaltes PBS hinzugeben und Zellen mit Zellschaber von der Schale abkratzen
- Zellsuspension in Eppendorf Reaktionsgefäß überführen und in Tischzentrifuge bei 4° C für 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- Proteaseinhibitor-Cocktail 1:100 mit *Cell Lysis Buffer* (Zellysepuffer) verdünnen und Zellpellet in, abhängig von der Zellzahl, ca. 100 µl resuspendieren
- Zellsuspension mit Insulinspritze (feine Kanüle) 15x auf- und abziehen, um Zellmembran aufzubrechen
- Zellsuspension in Tischzentrifuge bei 4° C für 5 min bei 13.000 U/min zentrifugieren
- Bei -20° C einfrieren oder für weitere Analysen benutzen

3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bio-Rad Protein-Assay

Zur Messung der Konzentration der nach dem in 3.2.2.1 dargestellten Verfahren gewonnenen Proteine wurde der auf der von Bradford (Bradford, 1976) entwickelten Methode basierende Protein-Assay von Bio-Rad verwendet. Die optische Dichte eines Farbstoffes, dessen Absorptionsmaximum sich von 465 nm zu 595 nm verschiebt, wenn eine Bindung an ein Protein auftritt, wird photometrisch gemessen. Außerdem wird eine Standardkurve durch eine Verdünnungsreihe mit BSA erzeugt. Folgendes Versuchsprotokoll wurde benutzt (alle Proben wurden als Duplikate gemessen):

3. Material und Methoden

- Standardproben herstellen (1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 20 µg/ml BSA in deionisiertem Wasser verdünnt)
- 2 µl der zu messenden Probe mit 798 µl deionisiertem Wasser mischen
- 200 µl/Probe *Proteine Assay Dye Reagent* hinzugeben und mit Vortex mischen
- Für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren (innerhalb einer Stunde Proben messen)
- Absorption jeder Probe mit Spektrophotometer bei 595 nm messen

3.2.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Trennung von Proteinen im elektrischen Feld. Dabei wandern die durch Natriumdodecylsulfat denaturierten und negativ geladenen Proteine durch ein Polyacrylamidgel als Trennmedium und werden der Größe nach aufgetrennt (große Proteine bewegen sich durch das Gel langsam, während die Migration kleiner Proteine schneller erfolgen kann).

Für die Elektrophorese, die in einem Elektrophorese-Gerät von BioRad gemäß den Herstellerangaben durchgeführt wurde, wurden vorgefertigte 10%-Tris-Glycin-Gele von Anamed und Novex® 4-12% Tris-Glycin-Gele von Invitrogen benutzt. Die nach der in 3.2.2.1 beschriebenen Methode erhaltenen und eingefrorenen Proben waren zuvor auf Eis aufgetaut worden. Es wurden jeweils 100 µg/20µl (zur Bestimmung der Proteinkonzentration s. 3.2.2.2) des zu untersuchenden Proteingemischs, welches vorher mit 2,5µl Roti®-Load 1 vermischt und für 5 min auf 95° C erhitzt worden war, je Tasche in das Gel geladen. Als Proteinmarker kamen *MagicMark™ XP Western Protein Standard* oder *Precision Plus Protein Dual Color Standards* zum Einsatz. Die Elektrophorese fand mit Novex® *Tris-Glycine SDS Running Buffer* für ca. 2h bei einer Spannung von 130 V statt (Netzteil Power PAC 1000 von Biorad).

3.2.3 Immunologische Methoden

3.2.3.1 Immunhistochemie (IHC)

Für die IHC wurden 8 µm dicke Schnitte des humanen Meningiomgewebes, das zuvor schockgefroren worden war (s. 3.2.1.1), mit dem Kryostat angefertigt und auf *SuperFrost®* Plus Objektträger (jeweils zwei Schnitte/Objektträger), die mit einer positiv geladenen Beschichtung versehen sind, übertragen. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie nach folgendem Verfahren fixiert:

- Schnitte für 5 min in 4% Paraformaldehyd bei 4° C tauchen
- 2x für jeweils 2,5 min mit PBS waschen
- In 70% Ethanol für 4 min tauchen

Die auf diese Weise fixierten Schnitte wurden in 96% Ethanol bei 4° C gelagert.

Die IHC erlaubt die Untersuchung von Expression und Lokalisation eines bestimmten Proteins in Gewebeschnitten und beruht auf der Bindung eines spezifischen Primärantikörpers an ein Epitop des gesuchten Antigens. Zur Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes wird ein gegen die Fc-Region des Primärantikörpers gerichteter biotinylierter Sekundärantikörper eingesetzt (sog. indirekte Methode), an welchen der peroxidase-gekoppelte Avidin-Biotin-Komplex (ABC) binden kann, wodurch das am Ende zugegebene Chromogen DAB in Anwesenheit von H₂O₂ oxidiert wird und präzipitiert. Die daraus resultierende Braunfärbung lässt sich im Lichtmikroskop beobachten.

Der Sekundärantikörper ist jeweils spezifisch für das Tier, in welchem der primäre Antikörper produziert wurde bzw. von dem die B-Zellen für das Hybridom stammten. In dieser Arbeit wurden Primärantikörper gegen PDGFR- α und - β benutzt (für eine vollständige Liste s. Tabelle 9), ferner das VECTASTAIN® ABC-Kit. Die IHC erfolgte nach folgendem Protokoll:

3. Material und Methoden

- Schnitte in TBS für 5 min waschen
- Mit PAP Pen (Stift) wasserabweisende Barriere um Gewebe ziehen
- Zum Blockieren 30 min bei Raumtemperatur mit 60 µl/Schnitt Serum des Tiers inkubieren, in welchem der Sekundärantikörper hergestellt wurde
- Serum abschütteln und 60 µl je Schnitt in TBS verdünnten (Verdünnung für Anti-PDGFR- α -Antikörper 1:200 und für Anti-PDGFR- β -Antikörper 1:300) Primärantikörper zugeben (als Kontrolle nur TBS ohne Primärantikörper) und über Nacht bei 4° C oder 3h bei Raumtemperatur inkubieren
- Schnitte 3x für 5 min in TBS waschen
- Mit 60 µl/Schnitt 1:300 in TBS verdünnten Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 3x für 5 min in TBS waschen
- ABC-Kit mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufwärmen, Lösung A und Lösung B mit TB, abhängig von der benötigten Menge, nach Herstellerangaben mischen und 60 µl/Schnitt zugeben. Für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 3x für 5 min in TBS waschen
- Schnitte bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss mit einer Lösung aus 2 ml DAB, 98 ml TB und 33 µl H₂O₂ für 1,5min inkubieren

Nach folgender Vorgehensweise schloss sich die Gegenfärbung der Präparate mit Toluidinblau an, welches selektiv Zellkerne blau färbt:

- Schnitte für 4 min in TBS und 5min in destilliertem Wasser waschen
- Für 5 min in Toluidinblau tauchen
- 2x in destilliertes Wasser eintauchen
- Für 0,5 min in 70% Ethanol mit 4 Tropfen Essigsäure tauchen
- Für 1 min in 96% Ethanol tauchen
- Für 2 min in 100% Ethanol tauchen
- Für 5 min in Roti®-Histol oder Xylol tauchen
- Mit Roti®-Histokitt Deckglas aufkleben und über Nacht austrocknen lassen

3. Material und Methoden

Die so hergestellten Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop und der *AxioVision* Bildanalysesoftware ausgewertet und digitale Abzüge von ihnen erstellt. Der DAB-Abfall wurde vorschriftsgemäß entsorgt.

Tabelle 9 Bei der Immunhistochemie verwendete Antikörper mit Isotyp und Speziesreaktivität

| Primärantikörper | Biotinylierter Sekundärantikörper |
|---|--|
| Anti-PDGFR-α-Antikörper, 200 μg/ml Kaninchen-IgG, gegen Maus/Mensch/Ratte | Anti-Kaninchen-Antikörper, Ziegen-IgG |
| Anti-PDGFR-β-Antikörper, 200μg/ml polyklonales Ziegen-IgG, gegen Maus/Mensch/Ratte | Anti-Ziege-Antikörper, Pferde-IgG |

3.2.3.2 VEGF-ELISA

Zur quantitativen Messung von humanem VEGF (den sezernierten Formen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅) wurde ein Sandwich-ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) eingesetzt. Der ELISA ist eine geeignete Methode, um gelöste Substanzen in Serum, Urin und Zellüberständen nachzuweisen. Er zählt zu den Immunassay-Verfahren und macht sich die Bindung zweier spezifischer Antikörper an den nachzuweisenden Stoff (das Antigen) zu Nutze, wobei die beiden Antikörper unterschiedliche Bindungsstellen am Antigen besitzen. Der erste, monoklonale Antikörper (*Coating Antibody*) wird an eine 96-Well-Mikrotiterplatte gebunden. Gibt man nun die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen – in unserem Falle VEGF – zu, so wird dieses über den Antikörper an die Platte gebunden und die ungebundenen Bestandteile der Probe lassen sich durch Waschen entfernen. Durch Zugabe des polyklonalen zweiten Antikörpers (*Detection Antibody*), welcher ebenfalls spezifisch für VEGF und an welchen ein Enzym gekoppelt ist (der biotinylierte Antikörper bindet die in einem späteren Schritt zugegebene Streptavidin-HRP) entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex – daher auch der Name „Sandwich“. Nach erneutem Waschen werden als Substrat H₂O₂ und ein Chromogen (TMB) hinzugefügt, das bei der durch die Peroxidase katalysierten Reaktion zu einem farbigen Endprodukt oxidiert wird, wobei die photometrisch messbare Farbintensität proportional zur initial gebundenen Menge an VEGF ist (s. Abb. 11).

3. Material und Methoden

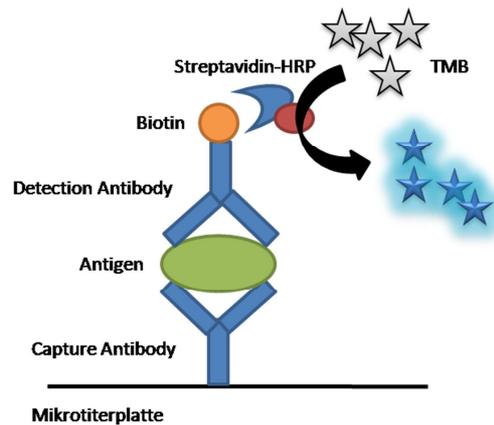


Abb. 11 Prinzip des Sandwich-ELISA. Das gesuchte Antigen wird über den *Capture Antibody* an die Mikrotiterplatte gebunden. Der biotinylierte *Detection Antibody* bindet das enzym-konjugierte Streptavidin (Streptavidin-Biotin-Bindung), wodurch das Chromogen (TMB) in einen photometrisch messbaren Farbstoff umgewandelt wird.

Die, wie unter 3.2.1.4 dargestellt, eingefrorenen Zellüberstände wurden auf Eis aufgetaut und die VEGF-Konzentration mit Hilfe des *DuoSet® ELISA Development System (R&D Systems)* bestimmt. Zur Berechnung der VEGF-Konzentration in den Messproben wurde für jeden ELISA, in zweifacher Ausführung, mit einer Verdünnungsreihe (bestehend aus sieben Verdünnungsschritten mit einem Verdünnungsfaktor von jeweils 2, beginnend bei einer Konzentration von 500 pg/ml, und *Reagent Diluent* als Lösungsmittel) von Standardproben eine Standardkurve erzeugt.

Der ELISA wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 96-Well-Mikrotiterplatte (Costar EIA) mit Parafilm® versiegeln und über Nacht bei Raumtemperatur mit 100 µl/Well *Capture Antibody* (1 µg/ml in PBS) inkubieren.
- 3x Waschen der Platte mit 400 µl/Well Wash Buffer (Waschpuffer)
- Blockierung („blocken“) der Platte durch Inkubieren mit 300 µl/Well *Reagent Diluent* für mindestens 1h bei Raumtemperatur
- 3x Waschen der Platte mit 400 µl/Well Wash Buffer
- 100 µl/Well Standard oder zu messende Probe zugeben. Mit Parafilm® versiegeln und 2h bei Raumtemperatur inkubieren
- 3x Waschen der Platte mit 400 µl/Well Wash Buffer

3. Material und Methoden

- 100 µl/*Well Detection Antibody* (100 ng/ml in *Reagent Diluent*) hinzugeben. Mit Parafilm® versiegeln und 2h bei Raumtemperatur inkubieren
- 3x Waschen der Platte mit 400 µl/*Well Wash Buffer*)
- 100 µl/*Well Streptavidin-HRP* (1:200 in *Reagent Diluent* verdünnt) hinzugeben, die Platte lichtundurchlässig abdecken und für 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 3x Waschen der Platte mit 400 µl/*Well Wash Buffer*
- 100 µl/*Well Substrate Solution* (Substratlösung, 1:1 Mischung aus *Color Reagent A* (H₂O₂) und *Color Reagent B* (TMB) hinzugeben, die Platte lichtundurchlässig abdecken und für 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 50 µl/*Well Stop Solution* (Stopplösung, 2N H₂SO₄) hinzugeben und Platte vorsichtig schütteln
- Optische Dichte sofort im *Microplate Reader* photometrisch bei 540 nm mit Wellenlängenkorrektur messen

Die gewonnenen Daten wurden anschließend statistisch ausgewertet.

3.2.3.3 Western Blot

Beim Western Blot werden die zuvor durch Gelelektrophorese (s. 3.2.2.3) separierten, negativ geladenen Proteine in einem senkrecht zum Gel verlaufenden elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran (*Hybond ECL Nitrocellulose Membrane*) übertragen und immobilisiert, wo sie für weitere Untersuchungen, z.B. für einen immunologischen Nachweis, leicht zugänglich sind. Der Western Blot wurde mit *Novex® Tris-Glycine SDS Transfer Buffer* in einer dafür vorgesehenen Vorrichtung, in welcher das die Proteine enthaltene Gel auf der Nitrozellulose-Membran, von jeweils einem Schwamm und einem Blottingpapier 3MM zusammengehalten, lag, von BioRad gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei einer ca. dreistündigen Laufzeit wurde eine Spannung von 30V gewählt (Netzteil Power PAC 1000 von Biorad). Anschließend wurde die Membran in einem geeigneten Plastikschildchen auf ein Schüttelgerät gelegt und mit TBST gewaschen. Um den erfolgreichen Proteintransfer zu kontrollieren, wurde die Membran mit Ponceau S, einem

3. Material und Methoden

unspezifischen Farbstoff, welcher reversibel an die Proteine bindet, angefärbt. Für die Immundetektion mittels spezifischer Antikörper wurde nach folgendem Versuchsprotokoll vorgegangen:

- Membran mit destilliertem Wasser waschen, bis rote Farbe verschwunden ist
- Membran 2h lang mit 5% Milchpulver in TBST blockieren
- Flüssigkeit verwerfen und 10 ml des 1. Antikörper, gelöst in TBST mit 2,5% Milchpulver, zugeben (für Einzelheiten s. Tabelle 10)
- Behälter mit Parafilm® Verschließen und über Nacht bei 4° C oder 2h lang bei Raumtemperatur inkubieren
- Flüssigkeit verwerfen
- Membran 3x mit TBST für jeweils 5 min waschen
- 10 ml des 2. Antikörpers, gelöst in TBST mit 2,5% Milchpulver, zugeben (für Einzelheiten s. Tabelle 10)
- 1,5h bei Raumtemperatur inkubieren
- Flüssigkeit verwerfen und Membran 3x für 5 min mit TBST waschen
- Als Substratlösung jeweils 750 µl von Lösung A und Lösung B des *ECL Plus Western Blotting Detection System* mischen und Membran damit bedecken
- 2 min lang bei Raumtemperatur inkubieren
- Substratlösung verwerfen
- In Autoradiographie-Kassette Biomax MR Film/Hyperfilm ECL belichten (Belichtungszeit abhängig von Intensität der Lumineszenz)
- Film in Entwicklerlösung tauchen, bis Banden erscheinen, zusätzlich ca. 2 min in Fixierlösung halten und 30 min trocknen lassen
- Membran bei -20° C aufbewahren oder sofort mit dem *Stripping* fortfahren
- Membran zum *Stripping* 2x mit Tris-HCL für jeweils 30 min waschen
- Mit destilliertem Wasser spülen; jetzt kann die Membran erneut blockiert und nach obigem Protokoll mit neuen Antikörpern behandelt werden

Die Immundetektion basiert auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung zwischen dem zu untersuchenden Protein und dem 1. Antikörper, an dessen Fc-Region wiederum der

3. Material und Methoden

sekundäre Antikörper bindet. Dieser ist gegen eine ganze Immunglobulin-Klasse – und zwar spezifisch für das Tier, in welchem der primäre Antikörper produziert wurde bzw. von dem die B-Zellen für das Hybridom stammten – gerichtet und mit einer HRP konjugiert, welche in Anwesenheit von H₂O₂ die Oxidation des in der Substratlösung enthaltenen Lumigen PS-3 Acridan katalysiert, das unter intensiver Chemolumineszenz weiter reagiert. Die auf dem autoradiographischen Film resultierenden Banden ermöglichen eine semiquantitative Beurteilung der Expression der untersuchten Proteine. Als Kontrolle der vorhandenen Proteinmenge wurde zusätzlich auf jeder Membran β -Actin, ein konstitutiv exprimiertes Strukturprotein, dargestellt.

Tabelle 10 Verwendete Antikörper beim Western Blot.

| Antigen | 1. Antikörper | 2. Antikörper (HRP-konjugiert) |
|---|---|--|
| β-Actin, MG: 43kDa | H: Cell Signaling Technology, R: Mensch/Maus/Ratte V: 1:10000 | Anti-Maus-IgG, H: Cell Signaling Technology V: 1:2000 |
| HIF1-α, MG: 120kDa | H: R&D Systems, R: Mensch/Maus/Ratte, U: Maus, V: 1:400 | Anti-Maus-IgG, H: Cell Signaling Technology V: 1:2000 |
| Phospho-Akt (Ser473), MG: 60kDa | H: Cell Signaling Technology, R: Mensch/Maus/Ratte, U: Kaninchen, V: 1:1000 | Anti-Kaninchen-IgG, H: Amersham Biosciences, V: 1:2000 |
| Phospho-Akt (Thr308), MG: 60kDa | H: Cell Signaling Technology, R: Mensch/Maus/Ratte, U: Kaninchen, V: 1:1000 | Anti-Kaninchen-IgG, H: Amersham Biosciences, V: 1:2000 |
| Phospho-mTOR (Ser2448), MG: 289kDa | H: Cell Signaling Technology, R: Mensch/Maus/Ratte, U: Kaninchen, V: 1:1000 | Anti-Kaninchen-IgG, H: Amersham Biosciences, V: 1:2000 |
| Phospho-PDK1 (Ser241), MG: 58-68kDa | H: Cell Signaling Technology, R: Mensch/Maus/Ratte, U: Kaninchen, V: 1:1000 | Anti-Kaninchen-IgG, H: Amersham Biosciences, V: 1:2000 |
| Phospho-PTEN (Ser380), MG: 54kDa | H: Cell Signaling Technology, R: Mensch/Maus/Ratte, U: Kaninchen, V: 1:1000 | Anti-Kaninchen-IgG, H: Amersham Biosciences, V: 1:2000 |

H: Hersteller, MG: Molekulargewicht, R: Reaktivität, U: Ursprung, V: Verdünnung der Arbeitslösung

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion waren die auf 6-Well-Platten kultivierten Zellen, wie unter 3.2.1.4 dargestellt, stimuliert resp. inhibiert worden. Die Arbeiten fanden unter einem Abzug statt und zudem wurden stets Einmalhandschuhe und Sichtschutz getragen.

3. Material und Methoden

Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination durch RNase wurden eingehalten. Die RNA-Extraktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Überstand abnehmen, 1 ml/Well TRIzol®-Reagenz hinzugeben und Zelllysate zum Homogenisieren mit Pipette mehrfach auf- und abziehen
- Für 10 min bei $\leq 12.000g$ und $4^\circ C$ zentrifugieren, Überstände in neue Probenröhrchen (aus Polypropylen) überführen
- Für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Zur Phasenseparation 200 μl Chloroform zugeben, Probenröhrchen für 15s per Hand kräftig schütteln und für 3min bei Raumtemperatur inkubieren. Danach für 15 min bei $\leq 12.000g$ und $4^\circ C$ zentrifugieren. Die Lösung trennt sich dadurch in eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine farblose wässrige Phase, welche die RNA enthält
- Zügig oberste Phase in neues Probenröhrchen pipettieren, ohne die Interphase zu berühren, und 0,5 ml Isopropylalkohol zugeben, um die RNA zu präzipitieren. Für 10 min bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend für 10 min bei $\leq 12.000g$ und $4^\circ C$ zentrifugieren (präzipitierte RNA wird als Pellet sichtbar)
- Überstand verwerfen, 1 ml 75% Alkohol (in DEPC-Wasser) hinzugeben, um RNA zu waschen, mit Vortex-Maschine mischen und für 5 min bei $\leq 7.500g$ und $4^\circ C$ zentrifugieren
- Überstand verwerfen und RNA-Pellet für 5 - 10min an der Luft trocknen lassen (RNA sollte nicht vollständig trocknen).
- RNA in 30 μl DEPC-Wasser resuspendieren und für 10 min bei $60^\circ C$ inkubieren

Für die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration der Proben wurde 1 μl der erhaltenen RNA-Lösung mit DEPC-Wasser 1:60 verdünnt und in einer Quarzküvette die Absorption bei $\lambda_1 = 260 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 280 \text{ nm}$ gemessen, wobei der Quotient der bei 260 nm und der bei 280 nm gemessenen optischen Dichte, als Maß der Verunreinigung der Probe, zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Der Konzentrationsfaktor betrug 40.000.

3. Material und Methoden

3.2.4.2 Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion

Da die bei der PCR eingesetzte DNA-abhängige Polymerase nur DNA repliziert, wurde mit einer reversen Transkriptase (*SuperscriptTM II*), einer RNA-abhängigen Polymerase, die nach dem in 3.2.4.1 dargestellten Verfahren gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben. Als Zufallsprimer diente ein Hexanucleotid-Mix. Folgendes Versuchsprotokoll kam zum Einsatz:

- In nuclease-freiem Probenröhrchen 1 µg RNA mit DEPC-Wasser auf ein Zielvolumen von 10 µl auffüllen
- 2 µl Hexanucleotid-Mix hinzugeben
- 1 µl dNTP-Mix (2 mM) hinzugeben
- 4 µl 5X *First-Strand Buffer* hinzugeben
- 2 µl DTT (0,1M) zugeben
- Inhalt vorsichtig mischen und bei 25° C für 2 min inkubieren
- 1 µl (200 U) *SuperScriptTM II* hinzugeben und Lösung vorsichtig mit Pipette auf- und abziehen
- Bei 25°C für 10 min inkubieren
- Bei 42° C für 50 min inkubieren
- Bei 95° C für 5 min inkubieren, um Reaktion zu inaktivieren

Die so erhaltene cDNA konnte für die PCR genutzt werden.

Die PCR ist eine äußerst empfindliche Methode, um spezifische Nukleotidsequenzen in einer Probe nachzuweisen. Sie läuft mit Hilfe eines Thermocyclers in sequentiellen Zyklen ab, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht:

1. Denaturierung: Durch Inkubation bei 95° C werden die DNA-Stränge aufgetrennt. Im ersten Zyklus dauerte die Inkubation 5 min, in den darauf folgenden Zyklen 30s.
2. Primerhybridisierung (*Annealing*): Die für das Gen, das amplifiziert werden soll, spezifischen und von der Taq-Polymerase als Startsequenz benötigten

3. Material und Methoden

Oligonucleotide (sog. Primer) lagern sich an die DNA an. Dieser Schritt erfolgte bei 60° C für 30s.

3. Elongation: Bei 72° C verlängert die Taq-Polymerase, am 3'-Ende des angelagerten Primers beginnend, den fehlenden Strang. Auch dieser Schritt dauerte 30s.

Dadurch kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des durch die Primer festgelegten, zu amplifizierenden DNA-Fragments ab dem 2. Zyklus. Nach Ablauf des letzten Zyklus fand eine weitere Inkubation für 10min bei 72° C statt, wonach die Reaktionsgefäße auf 4° C gekühlt wurden. Die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammende Taq-Polymerase ist sehr hitzebeständig und übersteht unbeschadet die bei der PCR vorkommenden Inkubationen bis zu 95° C. Aus Tabelle 11 sind die Volumina und Konzentrationen der für die PCR gebrauchten Reagenzien, die in spezielle, auf Eis gekühlte PCR-Reaktionsgefäße für den Thermocycler pipettiert wurden, ersichtlich. Die Primer waren vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt worden und cDNA und Taq-Polymerase wurden erst am Schluss hinzugefügt. Schließlich wurden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gesetzt und ein passendes Programm ausgewählt, welches bis zum Ende der PCR automatisch ablief.

Tabelle 11 Für die PCR verwendeter Reaktionsansatz

| |
|--|
| 8,95 µl destilliertes Wasser |
| 1,5 µl 10x PCR-Puffer |
| 0,9 µl MgCl ₂ (25 mM) |
| 1,5 µl dNTP-Mix (2 mM) |
| 0,5 µl Primer (<i>Sense</i> , 10 pmol/µl) |
| 0,5 µl Primer (<i>Antisense</i> , 10 pmol/µl) |
| 1 µl cDNA |
| 0,15 µl Taq-Polymerase |

Als Negativkontrolle wurde statt cDNA destilliertes Wasser verwendet. Einen Überblick über die eingesetzten Primer zeigt Tabelle 12. Die optimale Zyklusanzahl wurde empirisch mittels Gradienten-PCR (einer Serie von PCRs steigender Zyklusanzahl und anschließender Überprüfung des amplifizierten Fragments) ermittelt.

3. Material und Methoden

Tabelle 12 Sequenzen der für die PCR verwendeten Primer, Produktlänge des amplifizierten cDNA-Fragments, gewählte Temperatur für das *Annealing* und Anzahl der PCR-Zyklen

| Gen | Primer-Sequenz | Produktlänge [bp] | Annealing-Temperatur [°C] | Zyklusanzahl |
|---------------------------|---|-------------------|---------------------------|--------------|
| β-Actin | Sense 5´- ACGGGGTCACCCACACTGT GC-3´ Anti-sense 5´- CTAGAAGCATTTCGCGGTGG ACGAT-3´ | 660 | 60° | 33 |
| VEGF₁₆₅ | Sense 5´-TCT GCT GTC TTG GGT GCA TTG-3´ Anti-sense 5´-TGA TCC GCA TAA TCT GCA TGG-3´ | 320 | 60° | 35 |

Nach vollendeter PCR wurden die Proben mit 4 µl *Loading Buffer* gemischt und zur Visualisierung des amplifizierten cDNA-Fragments 16 µl davon in ein 1,3%-iges Agarose-Gel (s.a. 3.2.4.3) geladen und bei 120V für ca. 30 min elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt (Southern Blot, eingesetztes Netzteil war Blue Power 500 von SERVA Electrophoresis). Bei diesem Verfahren hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente durch das Trennmedium von ihrer Größe ab. Zusätzlich wurden 10 µl 1 kb *Plus DNA Ladder* in das Gel geladen, um später eine Größenabschätzung der separierten Fragmente zu ermöglichen. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, wodurch sich sein Anregungsspektrum verschiebt, und kann mit UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional zur DNA-Menge ist, erlauben die unter UV-Beleuchtung erstellten digitalen Abzüge des Gels einen semiquantitativen Nachweis der Transkription des untersuchten Gens.

3.2.4.3 Herstellung eines Agarose-Gels

Für die Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten wurde ein 1,3%-iges Agarosegel nach folgendem Protokoll hergestellt:

- 1,95 g Agarose mit 150 ml Tris-Acetat-EDTA in Erlenmeyerkolben mischen
- In Mikrowelle bei 700 W erhitzen, bis Flüssigkeit klar geworden ist

3. Material und Methoden

- Ca. 20 ml destilliertes Wasser hinzugeben
- Ca. 10 min lang abkühlen lassen
- 60 µl Ethidiumbromid hinzufügen
- Flüssigkeit in Form für Gel gießen und eventuell entstandene Bläschen austreichen
- Kamm für *Wells* einsetzen
- Wenn Flüssigkeit zu Gel erstarrt ist, Kamm und Seitenbegrenzung herausnehmen und Tris-Acetat-EDTA in Form füllen, bis Gel bedeckt wird

Die Vorschriften im Umgang mit Ethidiumbromid wurden strengstens eingehalten.

3.2.5 Statistik

Die bei den Untersuchungen mit ELISA, WST-1-Assay und ³H-Thymidineinbau generierten Daten wurden mit IBM® SPSS® *Statistics* 19 statistisch ausgewertet, wobei jedes Einzelerperiment mindestens mit Vierfachwerten durchgeführt worden war. Differenzen zwischen den Mittelwerten wurden durch eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt. Für Post-hoc-Mehrfachvergleiche wurde der Bonferroni-Test angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von PDGFR- α und - β

In den von den resezierten Meningiomen angefertigten Präparaten wurde immunhistochemisch die Expression des PDGFR- α und - β untersucht. Für fünf (25%) der 20 untersuchten Tumoren konnten weder PDGFR- α noch PDGFR- β nachgewiesen werden (s. Abb. 13 für M11). Zwölf (60%) waren positiv für PDGFR- α , ebenfalls 12 (60%) für PDGFR- β und 9 (45%) für beide Rezeptorsubtypen. Auf Abb. 12 sind Schnitte von M2 und M7 zu sehen. Eine vollständige Übersicht der Ergebnisse zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen zur Expression von PDGFR- α und - β

| Tumor | PDGFR- α | PDGFR- β |
|------------|-----------------|----------------|
| M2 | + | + |
| M3 | (+) | + |
| M4 | + | + |
| M5 | + | + |
| M6 | - | + |
| M7 | (+) | + |
| M8 | + | - |
| M9 | - | - |
| M10 | + | + |
| M11 | - | - |
| M12 | - | - |
| M13 | - | - |
| M15 | - | (+) |
| M16 | + | + |
| M17 | + | + |
| M18 | - | + |
| M19 | - | - |
| M20 | + | - |
| M22 | + | + |
| M24 | + | - |

+ Rezeptor nachweisbar, (+) einzelne Zellen positiv für Rezeptor, - Rezeptor nicht nachweisbar

Diejenigen Meningiome, für die keine IHC vorliegt, konnten mangels ausreichenden Gewebes nicht untersucht werden.

4. Ergebnisse

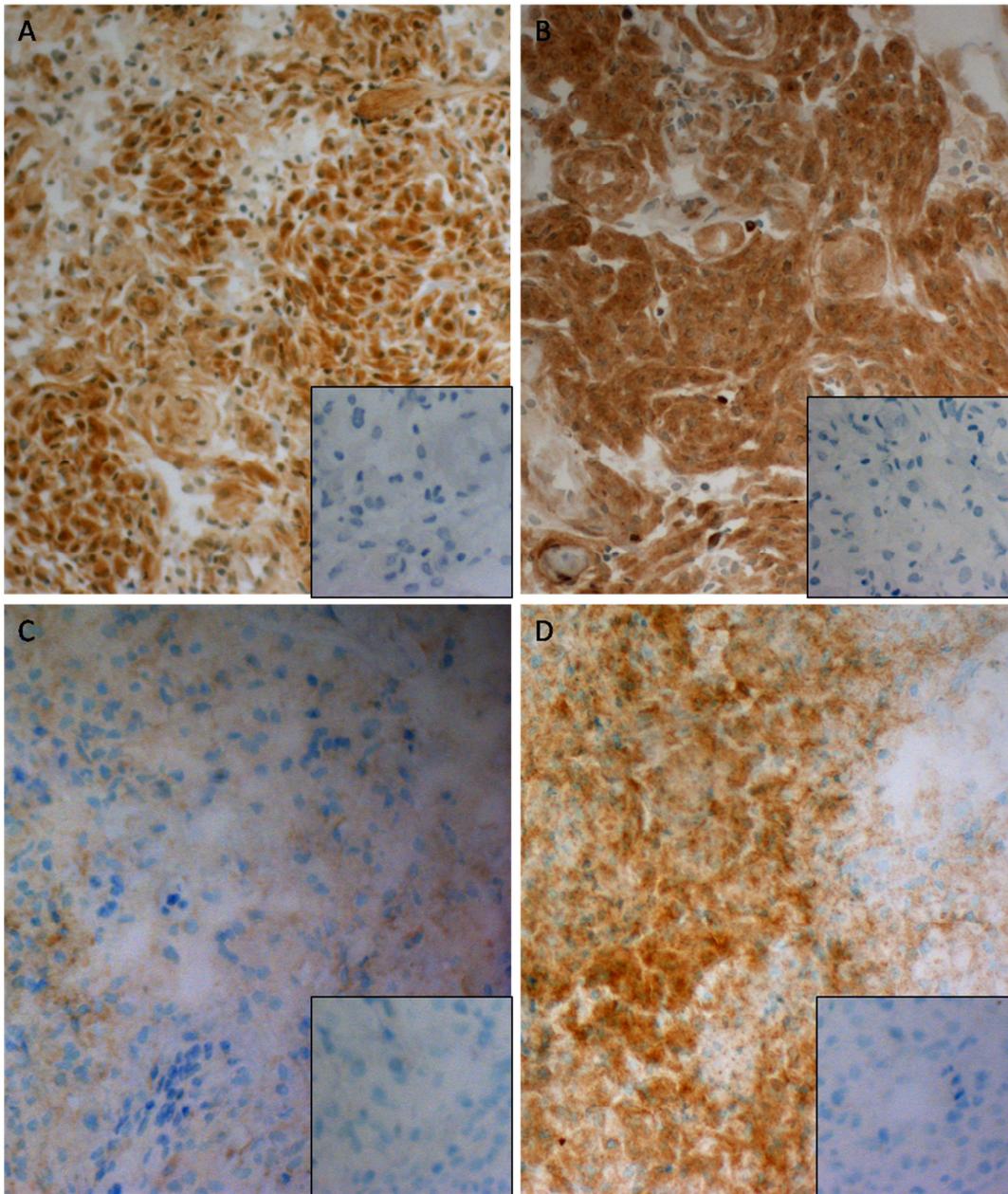


Abb. 12 Expression von PDGFR- α und - β in humanen Meningiomen. A positive Immunoreaktivität für PDGFR- α in M2, B positive Immunoreaktivität für PDGFR- β in M2, C stellenweise positive Immunoreaktivität für PDGFR- α in M7, D positive Immunoreaktivität für PDGFR- β in M7. Kleines Fenster zeigt jeweils Negativkontrolle und alle Bilder in 20x Vergrößerung.

4. Ergebnisse

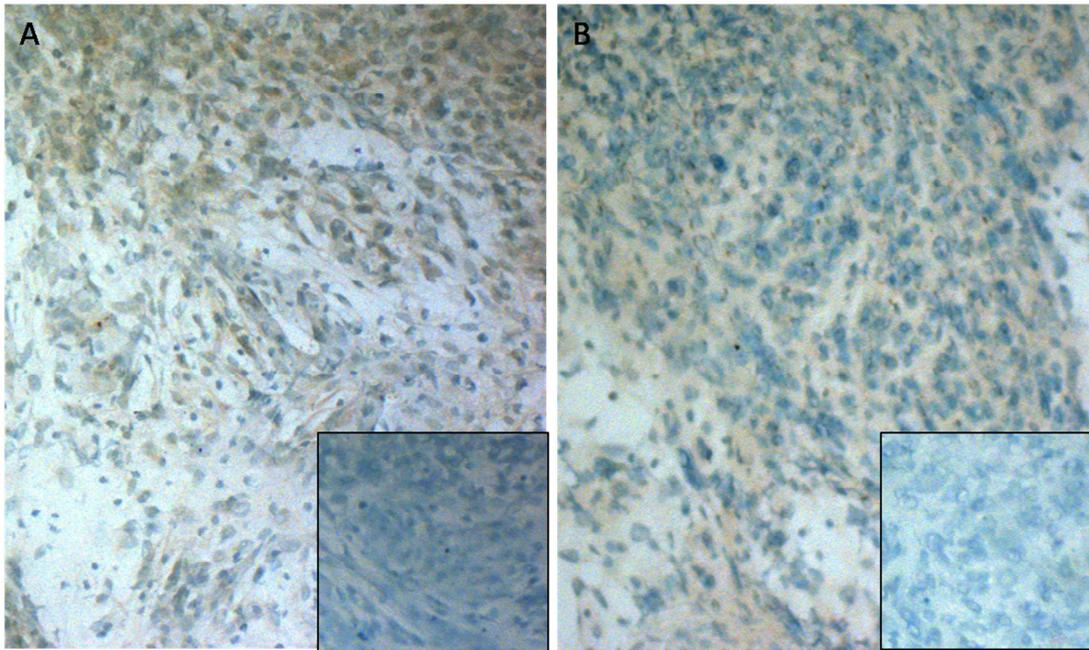


Abb. 13 Expression von A PDGFR- α und B PDGFR- β in M11 nicht nachweisbar. Kleines Fenster zeigt jeweils Negativkontrolle und alle Bilder in 20x Vergrößerung.

4.2 Wirkung von PDGF-AA, -AB, -BB und RAD001 auf die VEGF-Sekretion

Um einen möglichen Einfluss von PDGF auf die VEGF-Sekretion nachzuweisen, inkubierte ich die Meningiomzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der drei PDGF-Isoformen PDGF-AA, -AB und -BB und bestimmte mittels ELISA die VEGF-Konzentration in den Zellüberständen. Kultivierung mit PDGF-AB-haltigem Medium bewirkte in M2 nach 24h (s. Abb. 14) und 72h und in M3 nach 72h (s. Abb. 15) eine, bezogen auf den Basalwert statistisch signifikante, konzentrationsabhängige Inhibition der VEGF-Sekretion. Die Inkubation mit PDGF-AA führte ebenfalls zu einer signifikanten Inhibition in den Meningiomen M3 nach 48h (s. Abb. 16), M4 nach 72h (s. Abb. 17), M5 nach 24h (s. Abb. 18) und M18 nach 24h (s. Abb. 19).

4. Ergebnisse

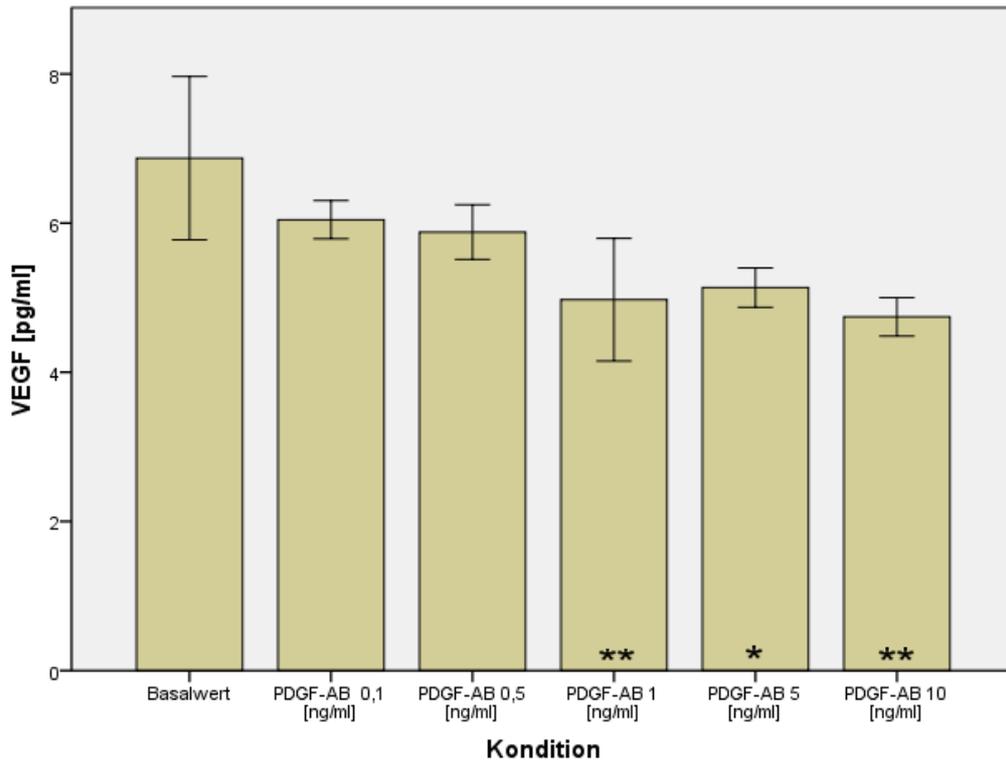


Abb. 14 Wirkung von PDGF-AB auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M2. Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-AB kam es in den Konditionen 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-AB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

Indes ließ M5 einen Trend zur Stimulation der VEGF-Sekretion durch PDGF-AA erkennen ($p = 0,065$ bei 10 ng/ml relativ zum Basalwert). Inkubation mit PDGF-BB erzielte in den Meningiomen M4 und M5 nach 72h, M11 (s. Abb. 20) und M13 (s. Abb. 21) nach 48h und M18 nach 24h eine konzentrationsabhängige, inhibitorische Wirkung, welche statistisch signifikant war. Während es in M4 nach 48h, in M5 (s. Abb. 22) nach 24h und 48h und in M7 (s. Abb. 23, Abb. 24 und Abb. 25) nach 24h, 48h und 72h zu einer signifikanten Stimulation kam. In den restlichen untersuchten Meningiomen konnte kein signifikanter Effekt von PDGF-AA, PDGF-AB oder PDGF-BB auf die VEGF-Sekretion nachgewiesen werden.

Inkubation der Meningiomzellen mit RAD001 verursachte in M23 (s. Abb. 26) und in M24 nach 24h eine signifikante Inhibition der VEGF-Sekretion, wohingegen M22 nur einen schwachen Trend zur Inhibition erkennen ließ. Eine Übersicht aller Daten findet sich in Tabelle 14.

4. Ergebnisse

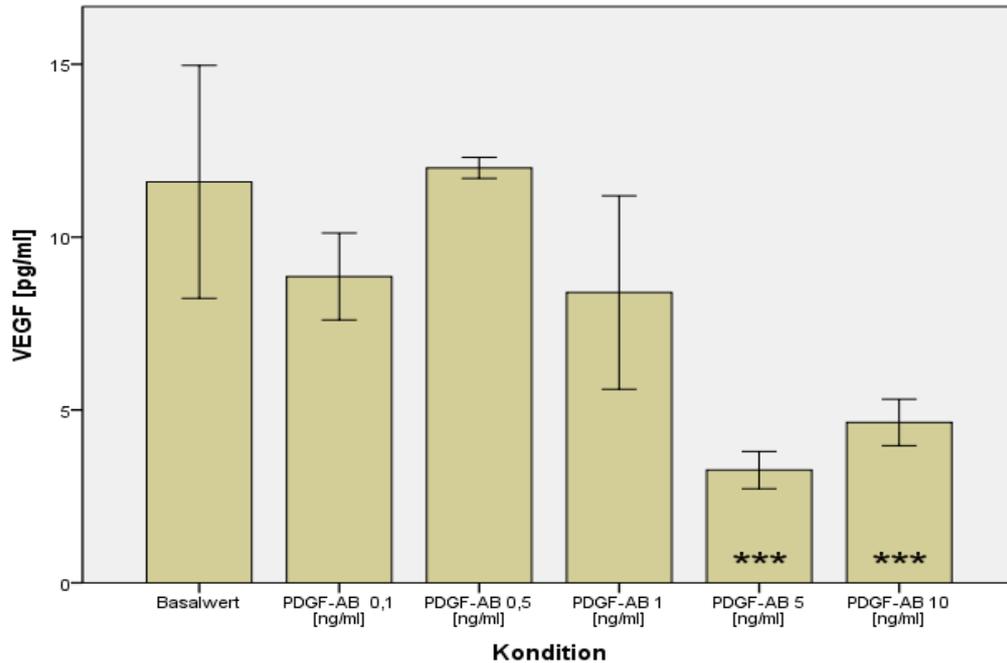


Abb. 15 Wirkung von PDGF-AB auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M3. Nach Inkubation für 72h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-AB kam es in den Konditionen 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-AB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

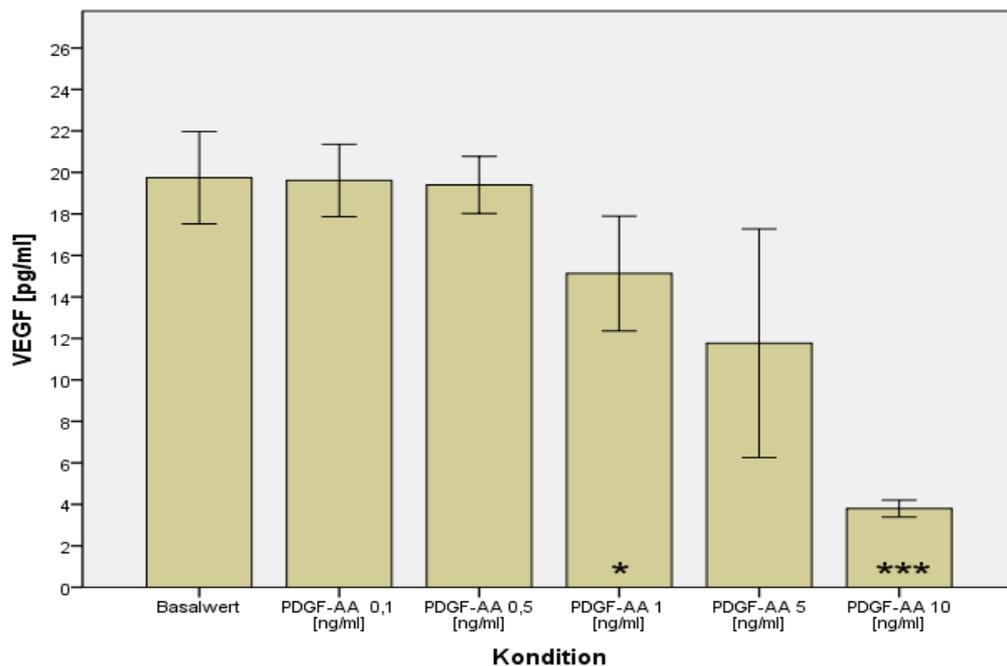


Abb. 16 Wirkung von PDGF-AA auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M3. Nach Inkubation für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-AA kam es in den Konditionen 1 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-AA verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

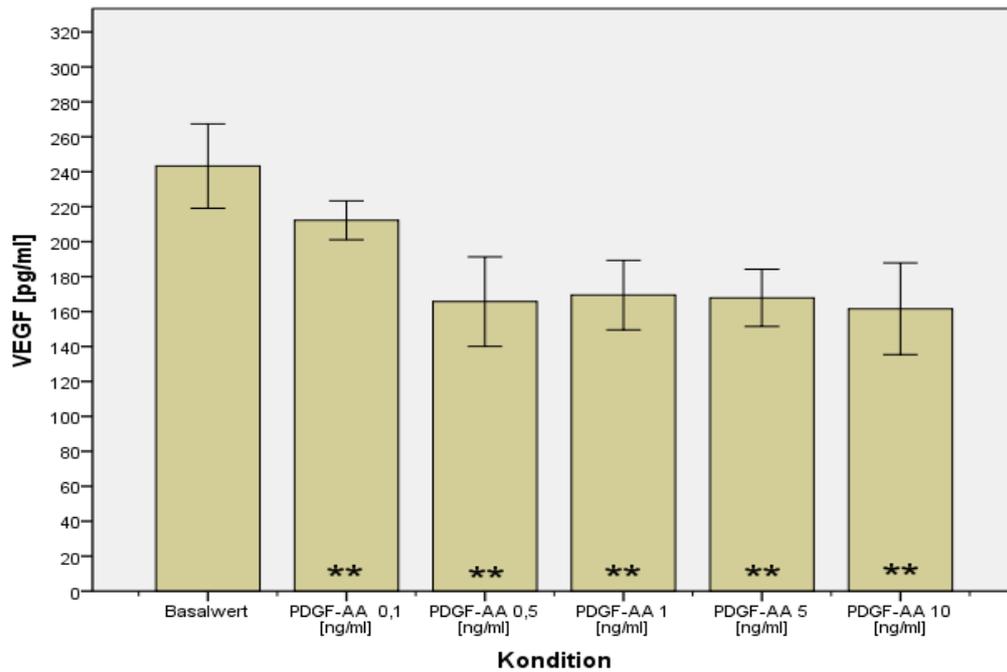


Abb. 17 Wirkung von PDGF-AA auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M4. Nach Inkubation für 72h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-AA kam es in den Konditionen 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-AA verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

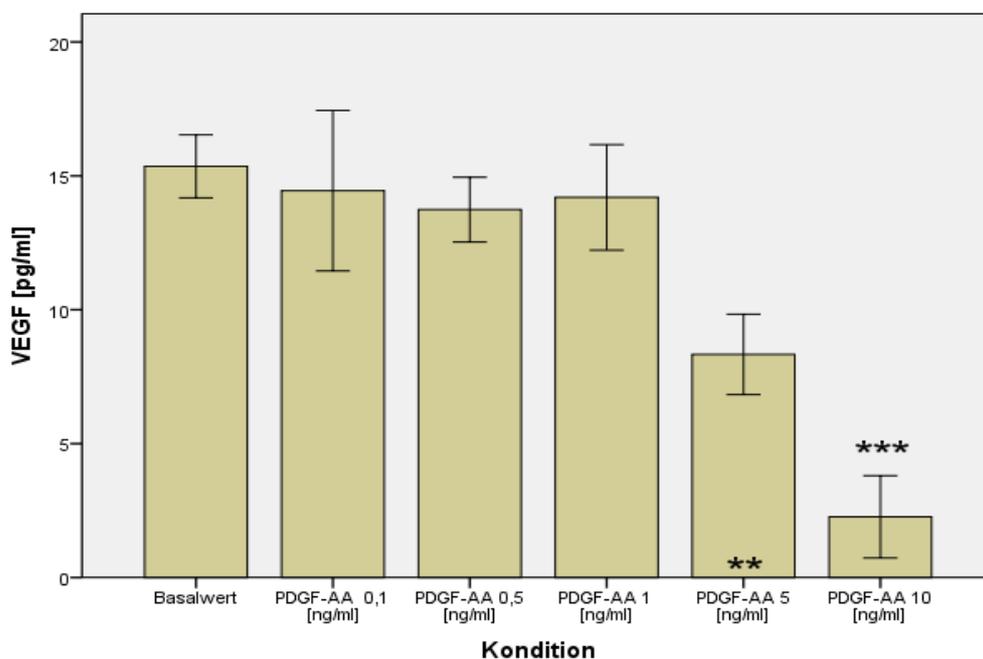


Abb. 18 Wirkung von PDGF-AA auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M5. Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-AA kam es in den Konditionen 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-AA verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

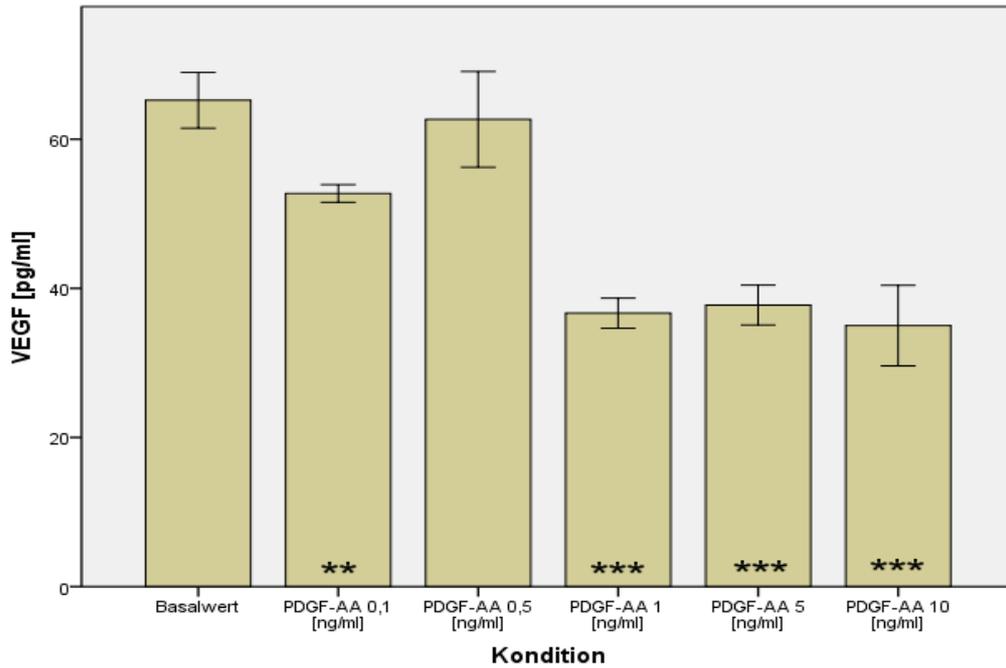


Abb. 19 Wirkung von PDGF-AA auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M18. Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-AA kam es in den Konditionen 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-AA verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

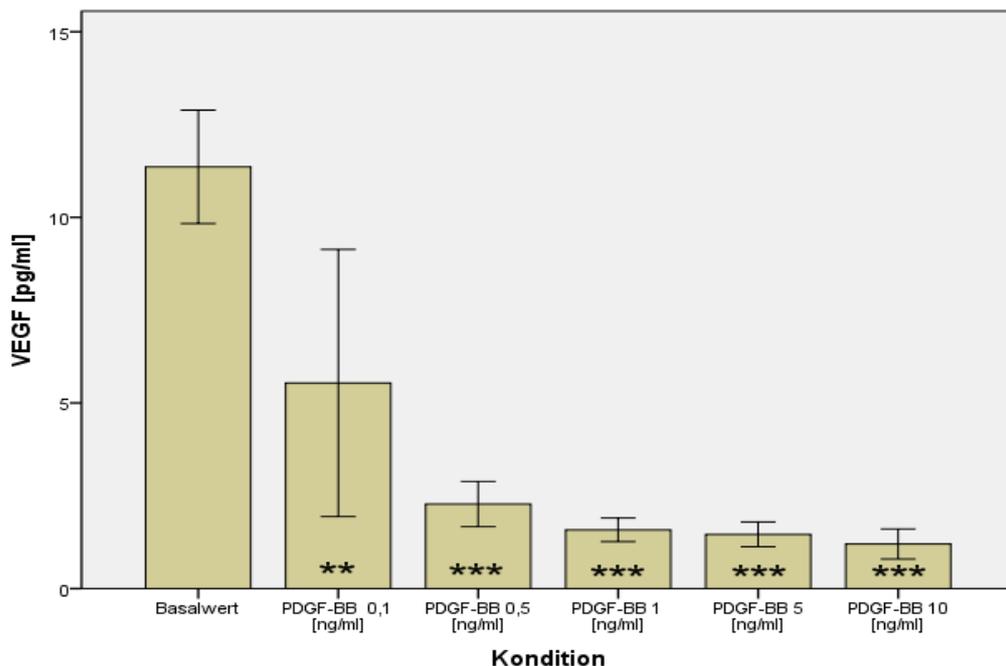


Abb. 20 Wirkung von PDGF-BB auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M11. Nach Inkubation für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

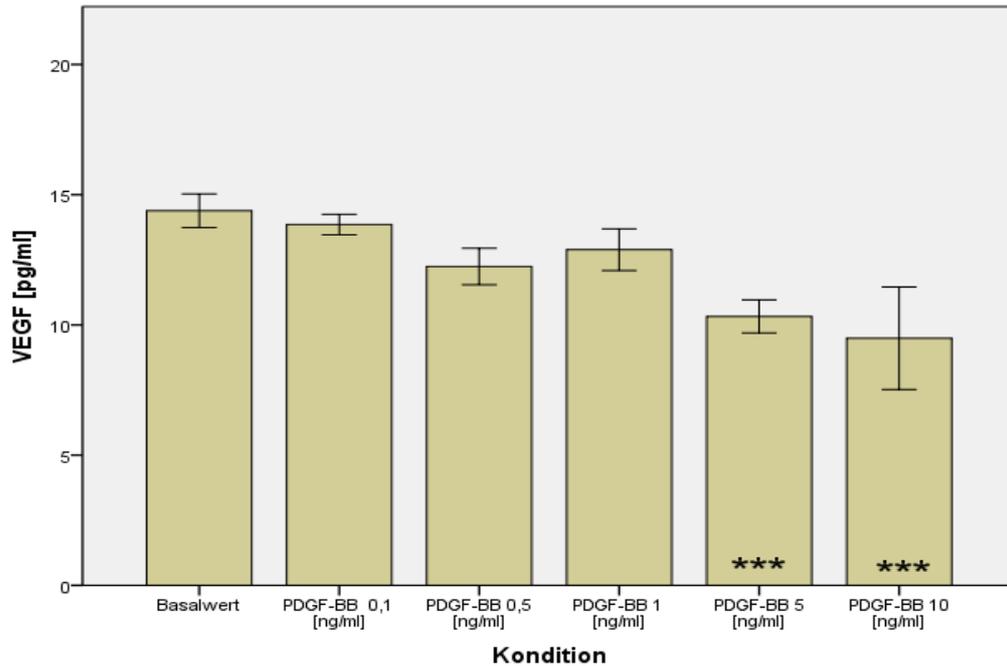


Abb. 21 Wirkung von PDGF-BB auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M13. Nach Inkubation für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

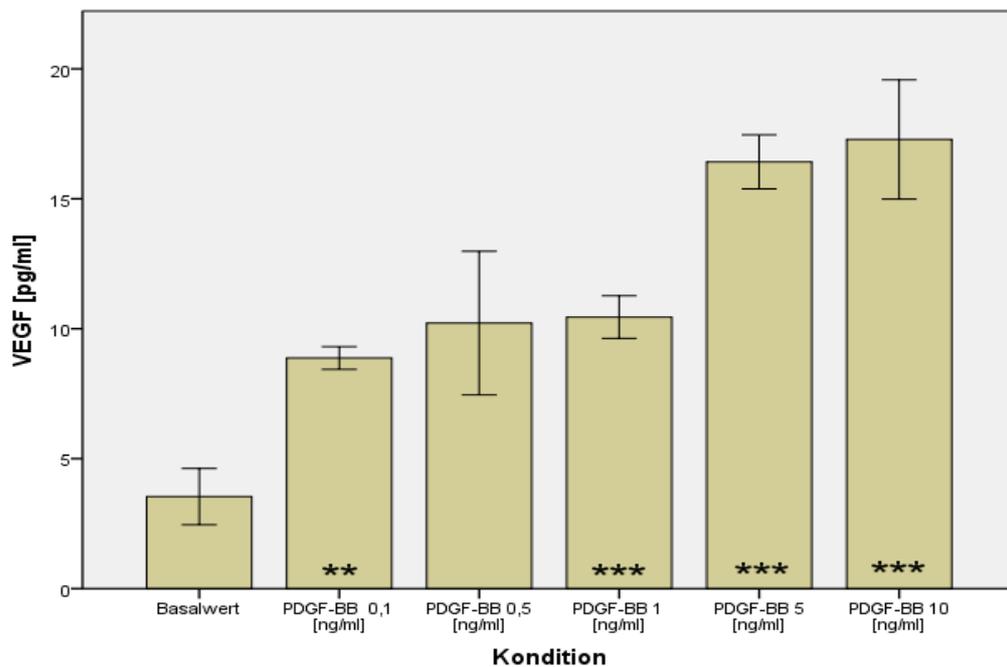


Abb. 22 Wirkung von PDGF-BB auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M5. Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

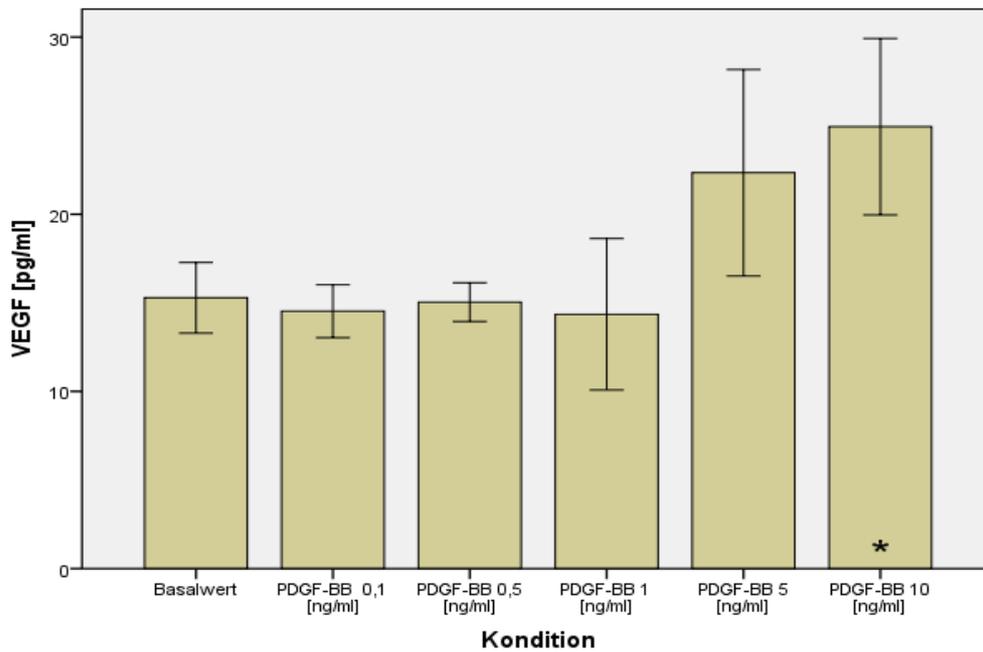


Abb. 23 Wirkung von PDGF-BB auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M7. Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in der Kondition 10 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

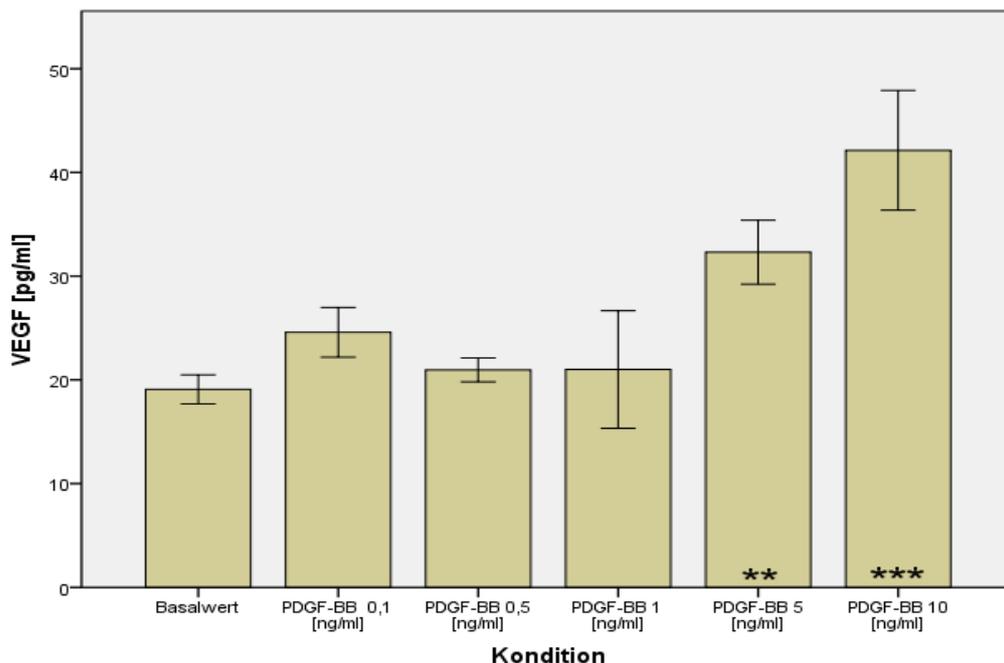


Abb. 24 Wirkung von PDGF-BB auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M7. Nach Inkubation für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

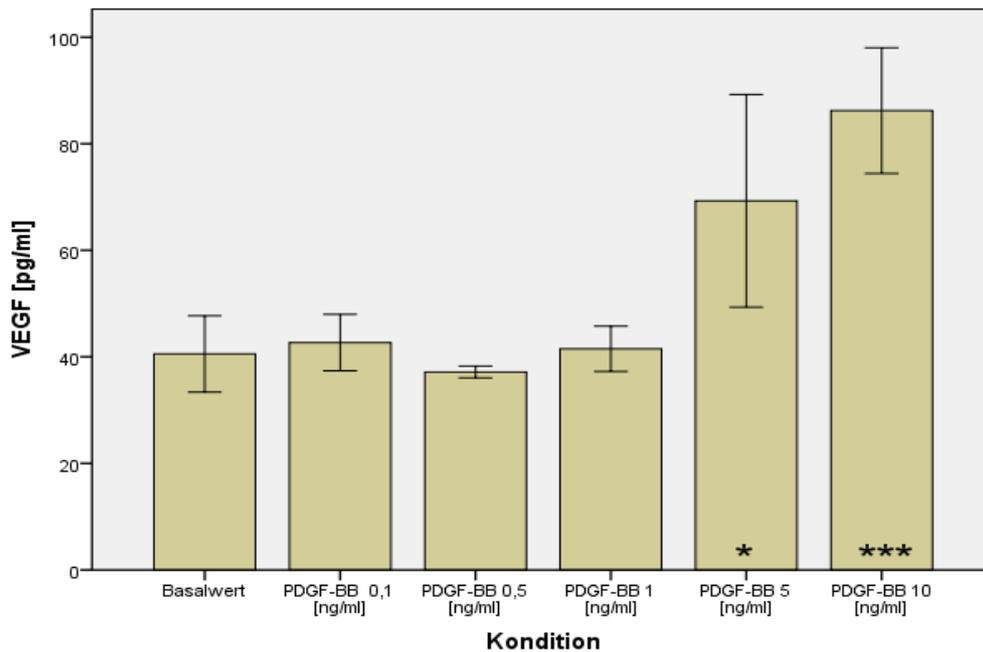


Abb. 25 Wirkung von PDGF-BB auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M7. Nach Inkubation für 72h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

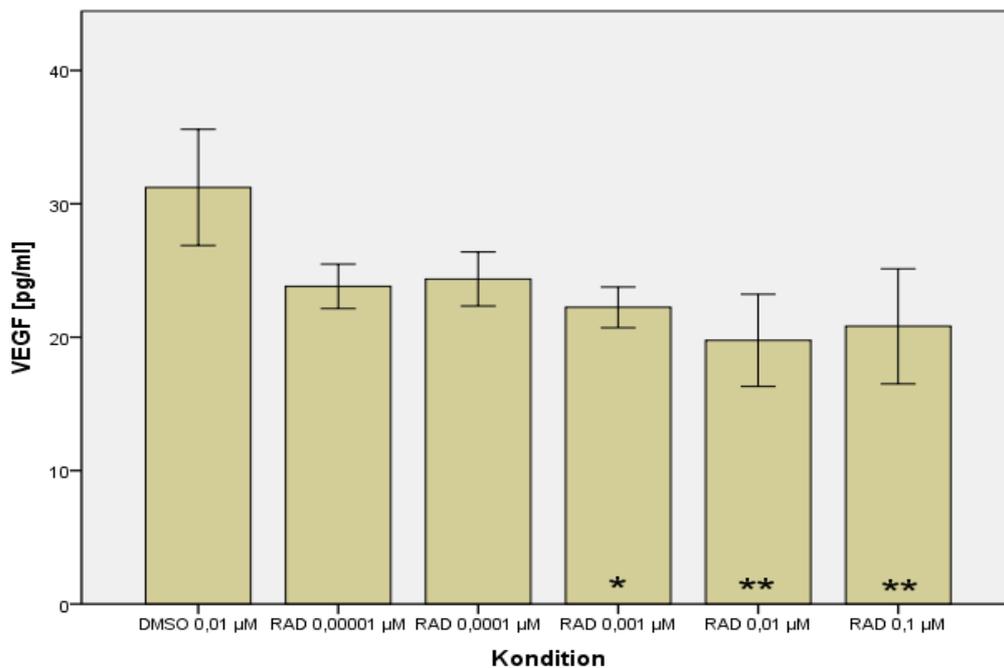


Abb. 26 Wirkung von RAD auf die VEGF-Sekretion (jeweils Mittelwert \pm SD dargestellt) von M23. Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von RAD001 kam es in den Konditionen 0,001 μM , 0,01 μM und 0,1 μM RAD001 zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (10%) Kulturmedium mit 0,01 μM DMSO verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

Tabelle 14 Zusammenfassung der von den einzelnen Meningiomen erhobenen Daten zur VEGF-Sekretion mit Angabe von Inkubationsdauer, Mittelwert der basalen VEGF-Sekretion und des maximalen Effekts auf Stimulation bzw. Inhibition und der Kondition, bei welcher dieser auftrat, sowie Angabe des entsprechenden p-Werts

| Tumor | Inkubationszeit | Basale VEGF-Sekretion [pg/ml] (SD) | Maximaler Effekt [pg/ml] (SD) und Kondition | p-Wert |
|-----------|-----------------|------------------------------------|---|---------|
| M1 | 24h | 17,105 (6,225) | 21,098 (3,948), PDGF-AB 1 ng/ml | 1,000 |
| M2 | 24h | 6,871 (1,095) | 4,667 (0,278), PDGF-AB 10 ng/ml | 0,001 |
| M2 | 48h | 4,480 (0,664) | 5,221 (0,599), PDGF-AB 0,5 ng/ml | 0,346 |
| M2 | 72h | 3,787 (0,222) | 2,527 (0,392), PDGF-AB 10 ng/ml | 0,008 |
| M3 | 48h | 19,744 (2,224) | 3,797 (0,410), PDGF-AA 10 ng/ml | < 0,001 |
| M3 | 48h | 22,214 (13,867) | 13,408 (3,674), PDGF-AB 5 ng/ml | 1,000 |
| M3 | 72h | 11,599 (3,340) | 3,261 (0,539), PDGF-AB 5 ng/ml | < 0,001 |
| M3 | 48h | 12,749 (2,855) | 14,211 (1,402), PDGF-BB 0,1 ng/ml | 1,000 |
| M3 | 72h | 16,372 (2,052) | 31,697 (21,718), PDGF-BB 0,5 ng/ml | 0,674 |
| M4 | 24h | 28,823 (4,423) | 31,642 (4,188), PDGF-AA 5 ng/ml | 1,000 |
| M4 | 48h | 153,138 (14,275) | 125,041 (12,067), PDGF-AA 0,5 ng/ml | 0,736 |
| M4 | 72h | 243,248 (24,134) | 161,586 (26,226), PDGF-AA 10 ng/ml | 0,001 |
| M4 | 24h | 25,710 (1,897) | 21,251 (8,612), PDGF-BB 10 ng/ml | 1,000 |
| M4 | 48h | 144,902 (10,268) | 195,284 (12,792), PDGF-BB 10 ng/ml | 0,037 |
| M4 | 72h | 151,010 (9,860) | 107,842 (7,240), PDGF-BB 1 ng/ml | 0,001 |
| M5 | 24h | 15,354 (1,177) | 2,270 (1,538), PDGF-AA 10 ng/ml | < 0,001 |
| M5 | 48h | 15,828 (0,566) | 9,402 (3,830), PDGF-AA 0,5 ng/ml | 0,083 |
| M5 | 72h | 17,816 (3,028) | 26,545 (6,385), PDGF-AA 10 ng/ml | 0,065 |
| M5 | 24h | 3,540 (1,086) | 17,284 (2,297), PDGF-BB 10 ng/ml | < 0,001 |
| M5 | 48h | 23,001 (4,105) | 39,014 (4,764), PDGF-BB 5 ng/ml | 0,003 |
| M5 | 72h | 32,680 (1,463) | 23,158 (3,697), PDGF-BB 10 ng/ml | 0,012 |
| M7 | 24h | 15,386 (0,370) | 13,435 (0,887), PDGF-AA 1 ng/ml | 1,000 |
| M7 | 48h | 18,466 (1,857) | 25,338 (4,289), PDGF-AA 10 ng/ml | 0,108 |
| M7 | 72h | 23,718 (3,253) | 28,165 (13,175), PDGF-AA 10 ng/ml | 1,000 |
| M7 | 24h | 15,287 (1,994) | 24,944 (4,982), PDGF-BB 10 ng/ml | 0,028 |

4. Ergebnisse

| Tumor | Inkubationszeit | Basale VEGF-Sekretion [pg/ml] (SD) | Maximaler Effekt [pg/ml] (SD) und Kondition | p-Wert |
|------------|-----------------|------------------------------------|---|---------|
| | | | ng/ml | |
| M7 | 48h | 19,079 (1,403) | 42,131 (6,779), PDGF-BB 10 ng/ml | < 0,001 |
| M7 | 72h | 40,535 (7,170) | 86,217 (11,785), PDGF-BB 10 ng/ml | < 0,001 |
| M11 | 24h | 8,397 (0,661) | 7,291 (0,330), PDGF-AA 10 ng/ml | 1,000 |
| M11 | 48h | 21,567 (4,011) | 16,946 (2,001), PDGF-AA 1 ng/ml | 1,000 |
| M11 | 24h | 6,917 (0,290) | 6,184 (0,454), PDGF-BB 0,1 ng/ml | 1,000 |
| M11 | 48h | 11,269 (1,538) | 1,200 (0,406), PDGF-BB 10 ng/ml | < 0,001 |
| M13 | 24h | 10,826 (0,988) | 8,628 (1,276), PDGF-AA 10 ng/ml | 0,268 |
| M13 | 48h | 15,923 (0,826) | 13,230 (0,814), PDGF-AA 5 ng/ml | 0,115 |
| M13 | 24h | 11,465 (2,320) | 9,380 (1,338), PDGF-BB 0,5 ng/ml | 1,000 |
| M13 | 48h | 14,387 (0,648) | 9,491 (1,968), PDGF-BB 10 ng/ml | < 0,001 |
| M16 | 24h | 20,868 (1,424) | 18,594 (2,268), PDGF-AA 5 ng/ml | 1,000 |
| M16 | 24h | 23,991 (2,871) | 16,197 (2,127), PDGF-BB 1 ng/ml | 0,230 |
| M18 | 24h | 65,219 (3,737) | 35,005 (5,406), PDGF-AA 10 ng/ml | < 0,001 |
| M18 | 24h | 20,655 (2,857) | 6,154 (3,515), PDGF-BB 10 ng/ml | 0,005 |
| M22 | 24h | 91,722 (34,798)a | 32,026 (7,958), RAD001 0,001 μ M | 0,485 |
| M23 | 24h | 31,229 (4,353)a | 19,762 (3,459), RAD001 0,01 μ M | 0,001 |
| M24 | 24h | 9,852 (2,834)a | 6,161 (0,174), RAD001 0,01 μ M | 0,045 |

a Zur Bestimmung des Basalwerts wurden die Zellen mit 0,01 μ M DMSO in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium inkubiert. Die anderen Konditionen waren 0,00001/0,0001/0,001/0,01 und 0,1 μ M RAD001 in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium.

4.3 Wirkung von PDGF-AA und -BB auf die VEGF-Transkription

Mit Hilfe reverser Transkription und anschließender PCR wurde der Einfluss von PDGF auf die VEGF-Transkription untersucht. Wie in Abb. 27 zu erkennen, korrelierten, relativ zur Kontrolle, verminderte VEGF-mRNA-Level in M22 mit PDGF-AA-Inkubation und in M23 mit Inkubation von PDGF-AA oder PDGF-BB.

4. Ergebnisse

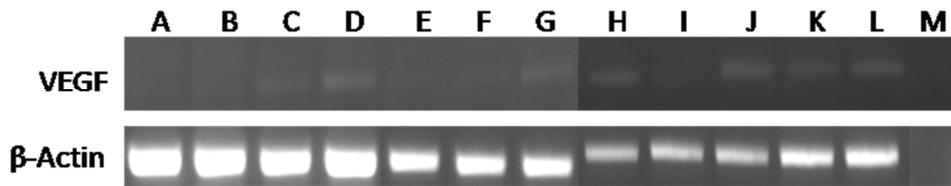


Abb. 27 Southern Blot der durch die PCR amplifizierten cDNA-Fragmente. A und B Probe von M22 nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-AA für 24h, C und D Negativkontrolle von M22, E und F Probe von M23 nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-AA für 24h, G und H Negativkontrolle von M23, I und J Probe von M23 nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-BB für 24h, K und L M23 Negativkontrolle, M Negativkontrolle (H₂O). Als Referenz der cDNA-Menge wurde zusätzlich β-Actin bestimmt.

4.4 Wirkung von PDGF-AA, -BB, RAD001 und

Curcumin auf die Proliferation

4.4.1 Resultate des ³H-Thymidin-Einbaus

Als Maß für die Proliferationsrate wurde mit Hilfe des ³H-Thymidin-Einbaus die DNA-Synthese der Zellen nach Inkubation mit PDGF-AA, -BB, RAD001 und Curcumin für 24h oder 48h gemessen. Dabei konnte für PDGF-AA kein Effekt nachgewiesen werden. PDGF-BB induzierte in M5 (s. Abb. 28) nach 48h, M23 (s. Abb. 29) und M24 (s. Abb. 30) nach jeweils 24h eine signifikante Stimulation. RAD001 bewirkte in M22 (s. Abb. 31), M23 (s. Abb. 32) und M24 (s. Abb. 33) nach jeweils 24h eine signifikante Inhibition. Für Curcumin wurde in M22, M23 (s. Abb. 34) und M24 (s. Abb. 35) nach jeweils 24h in den Konzentrationen 20 μM oder 30 μM eine Inhibition und in den Konzentrationen 1 μM, 5 μM oder 10 μM eine Stimulation beobachtet. Eine Übersicht aller Daten bietet Tabelle 15.

4. Ergebnisse

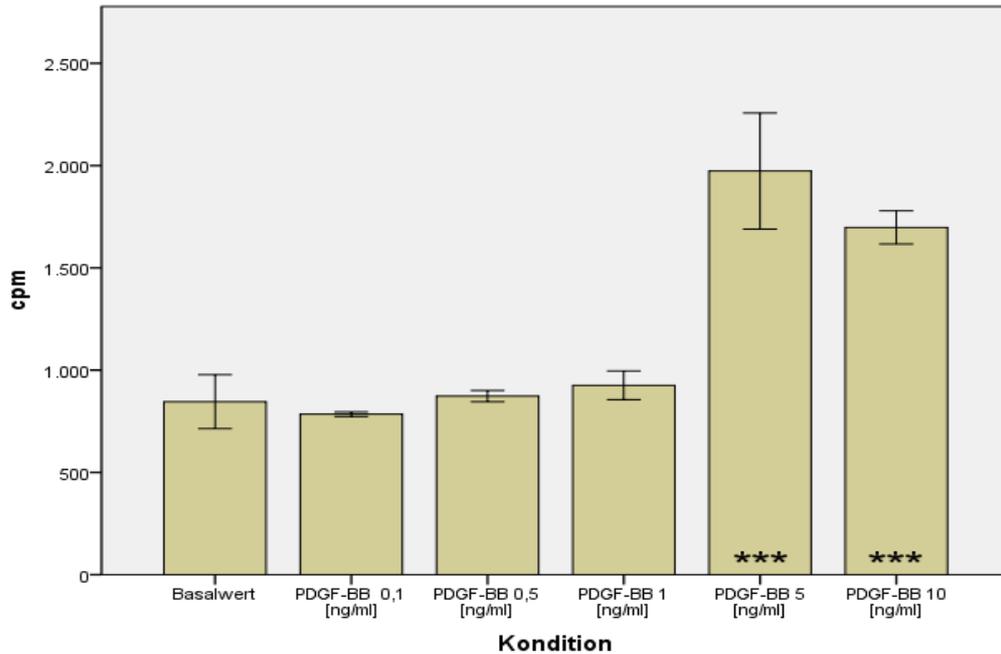


Abb. 28 Wirkung von PDGF-BB auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation von M5 (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD, cpm steht für *Counts per Minute*). Nach Inkubation für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

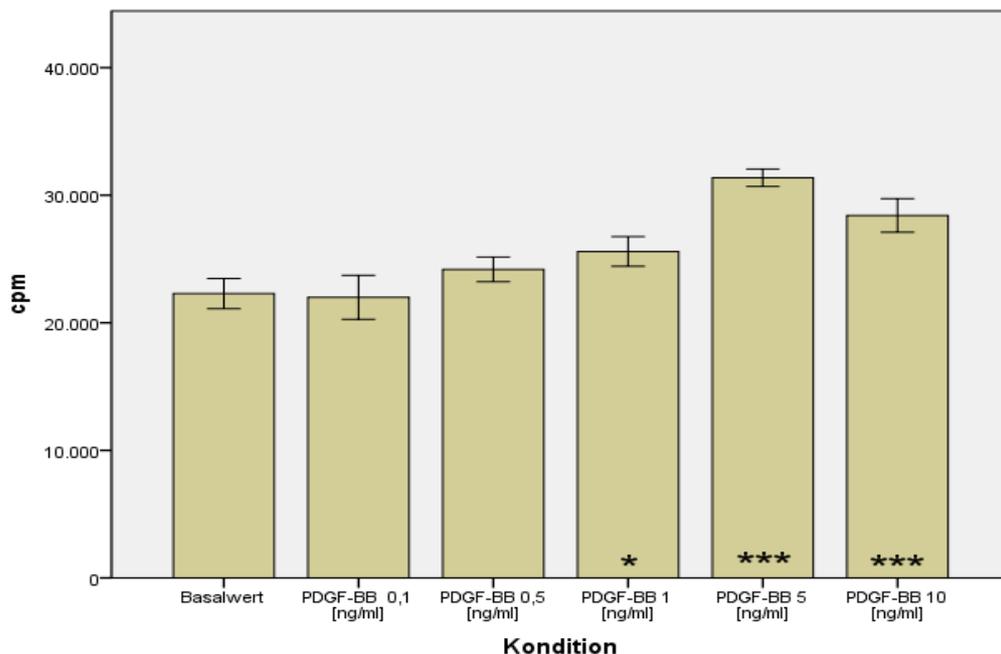


Abb. 29 Wirkung von PDGF-BB auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation von M23 (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD, cpm steht für *Counts per Minute*). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

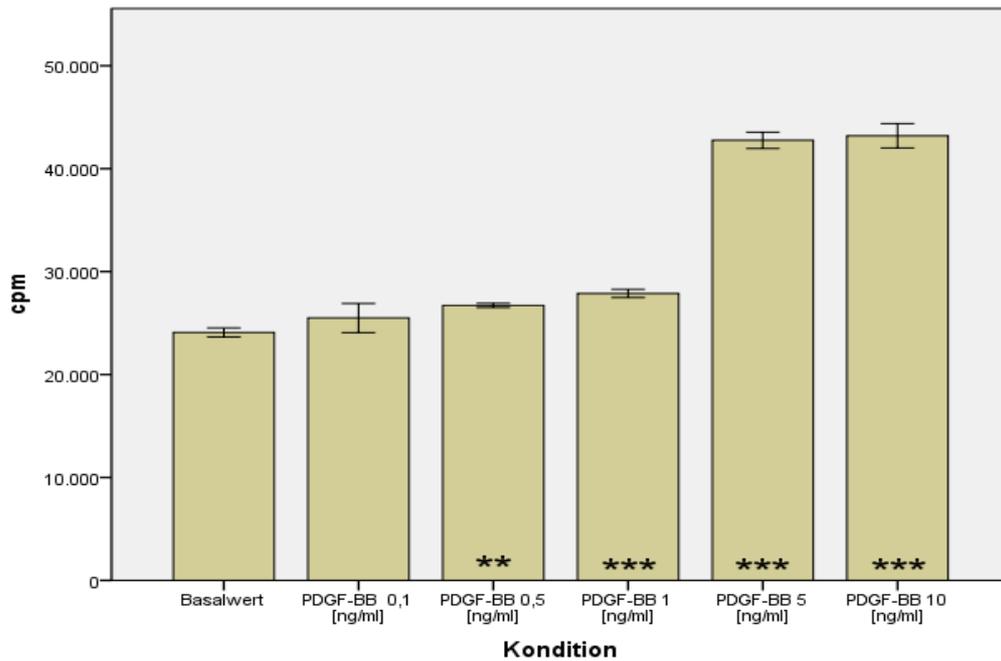


Abb. 30 Wirkung von PDGF-BB auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation von M24 (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD, cpm steht für *Counts per Minute*). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

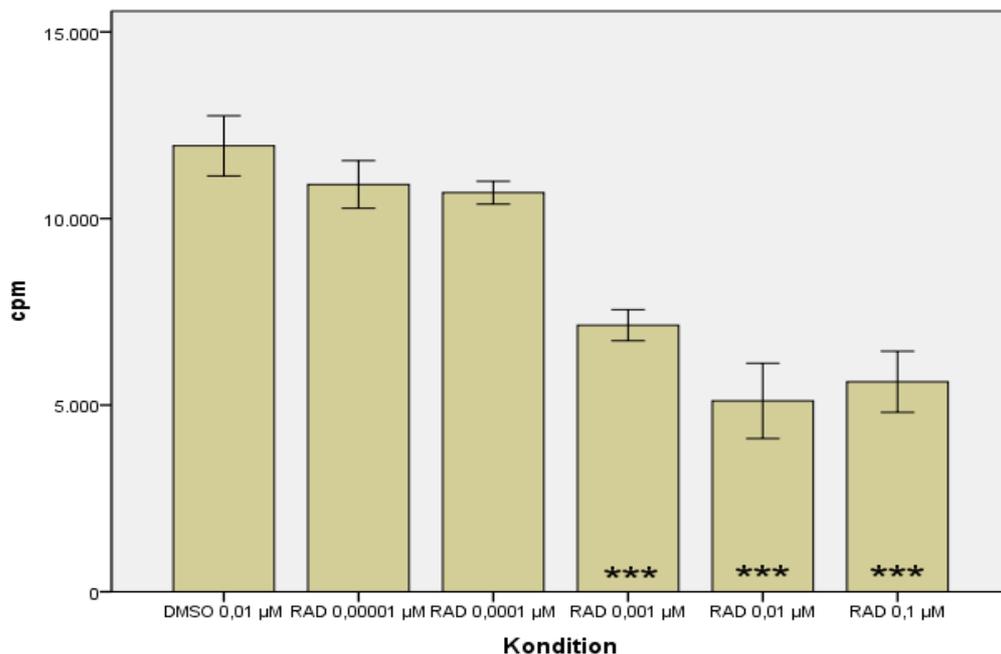


Abb. 31 Wirkung von RAD001 auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation von M22 (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD, cpm steht für *Counts per Minute*). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von RAD001 kam es in den Konditionen 0,001/0,01 und 0,1 μM zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (10%) Kulturmedium mit 0,01 μM DMSO verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

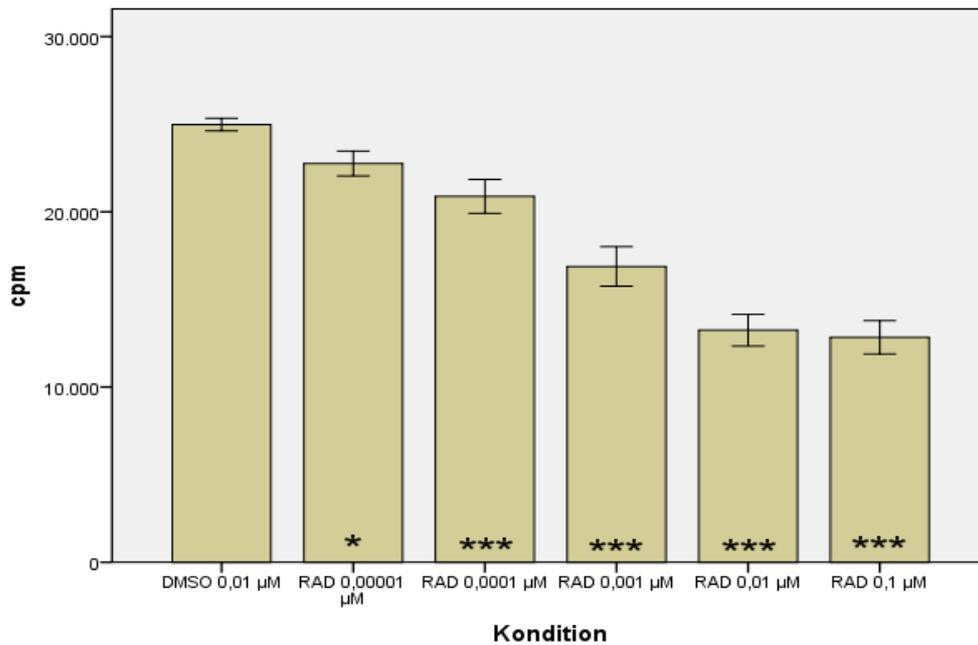


Abb. 32 Wirkung von RAD001 auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation von M23 (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD, cpm steht für *Counts per Minute*). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von RAD001 kam es in den Konditionen 0,00001/0,0001/0,001/0,01 und 0,1 μM zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (10%) Kulturmedium mit 0,01 μM DMSO verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

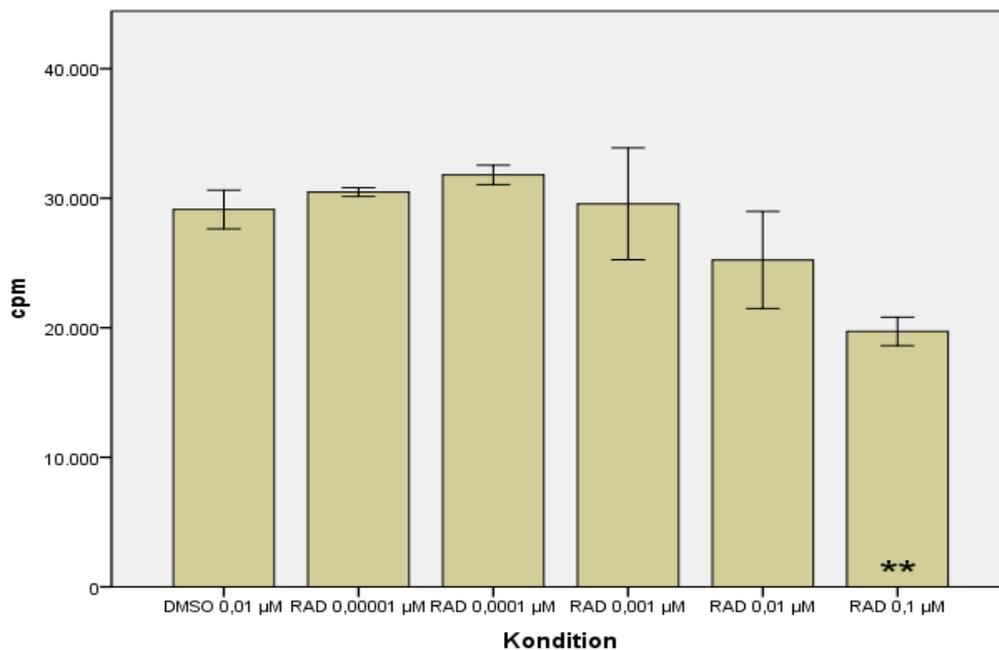


Abb. 33 Wirkung von RAD001 auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation von M24 (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD, cpm steht für *Counts per Minute*). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von RAD001 kam es in der Kondition 0,1 μM zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (10%) Kulturmedium mit 0,01 μM DMSO verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

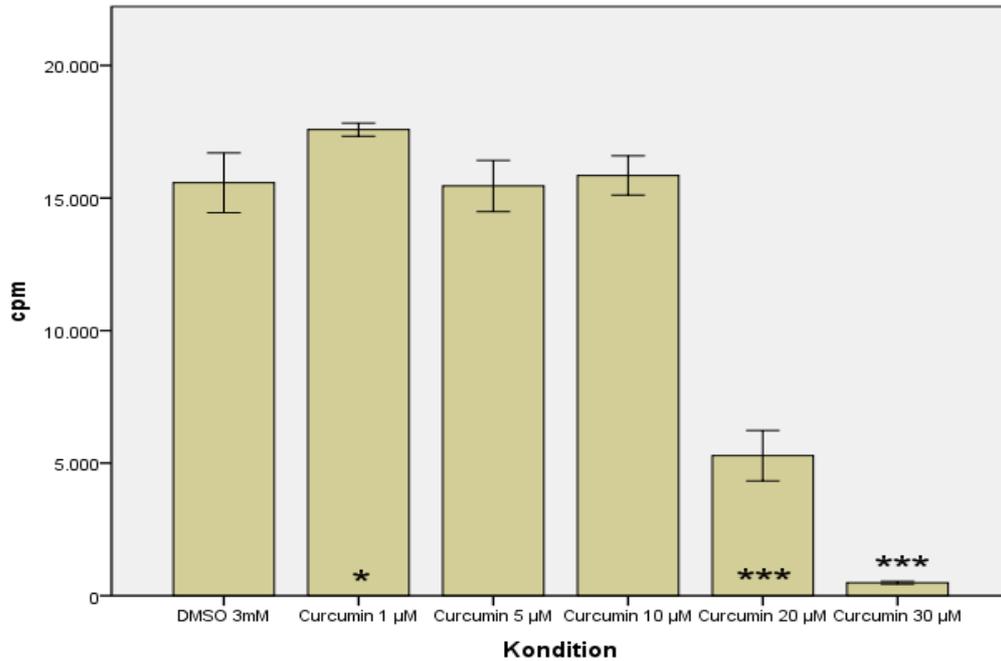


Abb. 34 Wirkung von Curcumin auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation von M23 (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD, cpm steht für *Counts per Minute*). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von Curcumin kam es in der Kondition 1 μM zu einer Stimulation und in den Konditionen 20 μM und 30 μM zu einer Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (10%) Kulturmedium mit 3 mM DMSO verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

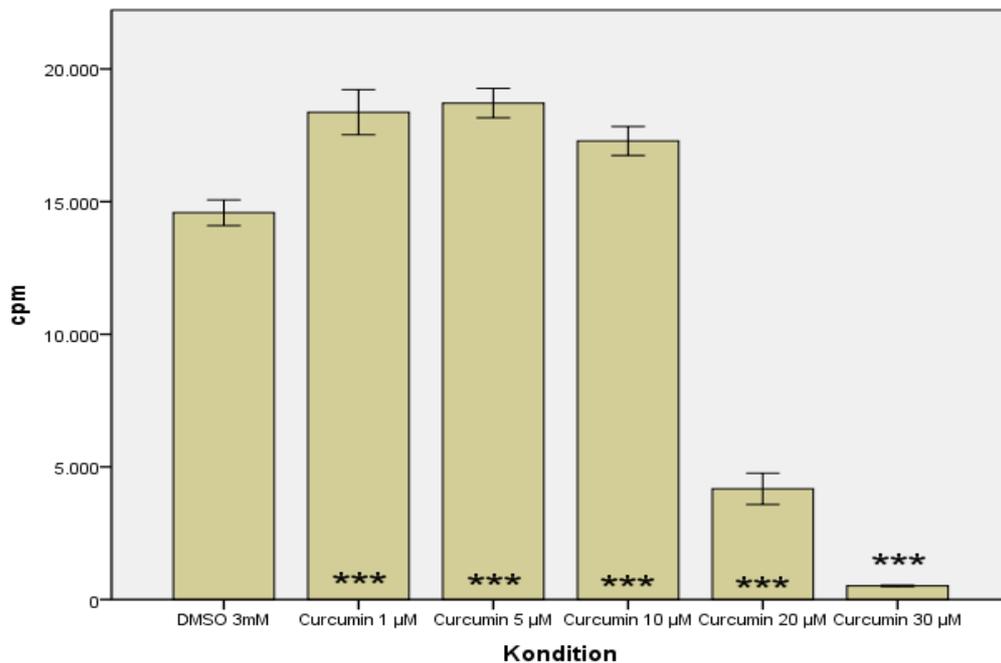


Abb. 35 Wirkung von Curcumin auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation von M24 (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD, cpm steht für *Counts per Minute*). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von Curcumin kam es in den Konditionen 1 μM , 5 μM und 10 μM zu einer Stimulation und in den Konditionen 20 μM und 30 μM zu einer Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (10%) Kulturmedium mit 3 mM DMSO

4. Ergebnisse

verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

Tabelle 15 Zusammenfassung der von den einzelnen Meningiomen erhobenen Daten zur ^3H -Thymidin-Inkorporation mit Angabe von Inkubationsdauer, Mittelwert der basalen Inkorporationsrate (gemessen als *Counts per Minute* (cpm)), des maximalen Effekts auf Stimulation bzw. Inhibition und der Kondition, bei welcher dieser auftrat, sowie Angabe des entsprechenden p-Werts

| Tumor | Inkubationszeit | Basalwert [cpm] (SD) | Maximaler Effekt [cpm] (SD) und Kondition | p-Wert |
|------------|-----------------|----------------------------------|--|---------|
| M5 | 48h | 965,00 (116,99) | 794,63 (169,56), PDGF-AA 5 ng/ml | 0,811 |
| M5 | 48h | 845,81 (132,11) | 1973,31 (284,05), PDGF-BB 5 ng/ml | < 0,001 |
| M22 | 24h | 5063,63 (420,47) ^a | 7505,34 (274,58), Curcumin 1 μM | < 0,001 |
| M22 | 24h | 11946,65 (805,74) ^b | 5112,71 (1007,51), RAD 0,01 μM | < 0,001 |
| M23 | 24h | 22293,28 (1184,23) | 31372,23 (677,84), PDGF-BB 5 ng/ml | < 0,001 |
| M23 | 24h | 15577,39 (1128,17) ^a | 489,00 (55,85), Curcumin 30 μM | < 0,001 |
| M23 | 24h | 24981,3375 (361,97) ^b | 12835,10 (952,73), RAD 0,1 μM | < 0,001 |
| M24 | 24h | 24066,25 (430,05) | 43193,05 (1180,71), PDGF-BB 10 ng/ml | < 0,001 |
| M24 | 24h | 14581,56 (484,38) ^a | 515,26 (24,89), Curcumin 30 μM | < 0,001 |
| M24 | 24h | 29128,23 (1497,36) ^b | 19717,97 (1103,38), RAD 0,1 μM | 0,005 |

^a Zur Bestimmung des Basalwerts wurden die Zellen mit 3 mM DMSO in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium inkubiert. Die anderen Konditionen waren 1/5/10/20 und 30 μM Curcumin in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium.

^b Zur Bestimmung des Basalwerts wurden die Zellen mit 0,01 μM DMSO in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium inkubiert. Die anderen Konditionen waren 0,00001/0,0001/0,001/0,01 und 0,1 μM RAD001 in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium.

4.4.2 Resultate des WST-1-Assays

Mit dem WST-1-Assay wurde die Proliferationsrate ermittelt, nachdem die Zellen für 24h, 48h oder 72h mit PDGF-AA, -BB, Curcumin, RAD001, RAD001 + PDGF-AA oder RAD001 + PDGF-BB inkubiert worden waren. So ergab sich für PDGF-AA eine signifikante Stimulation der Proliferation in den Meningiomen M3 nach 48h und M4 (s. Abb. 36) nach 24h und 72h. In M11 ließ sich zudem eine schwache Stimulation nachweisen ($p = 0,058$). M16 zeigte nach 24h Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-AA eine signifikante Stimulation, welche durch Zugabe von 0,1 μM RAD001 revertiert wurde (s. Abb. 37). In M5 (s. Abb. 38) führte PDGF-AA hingegen

4. Ergebnisse

zu einer signifikanten Inhibition nach 48h. Für PDGF-BB ließ sich in M5 (s. Abb. 39) und M13 (s. Abb. 40) nach 48h eine signifikante Stimulation beobachten.

In den Konzentrationen 20 μ M und 30 μ M induzierte Curcumin in Meningiom M22 nach 24h eine signifikante Stimulation. RAD001 führte in M16 zu einer schwachen ($p = 0,096$) und in M23 (s. Abb. 41) zu einer statistisch signifikanten Inhibition. In den restlichen untersuchten Tumoren konnte für PDGF-AA, -AB, -BB oder RAD001 kein signifikanter Effekt festgestellt werden. Eine Übersicht aller Daten zeigt Tabelle 16.

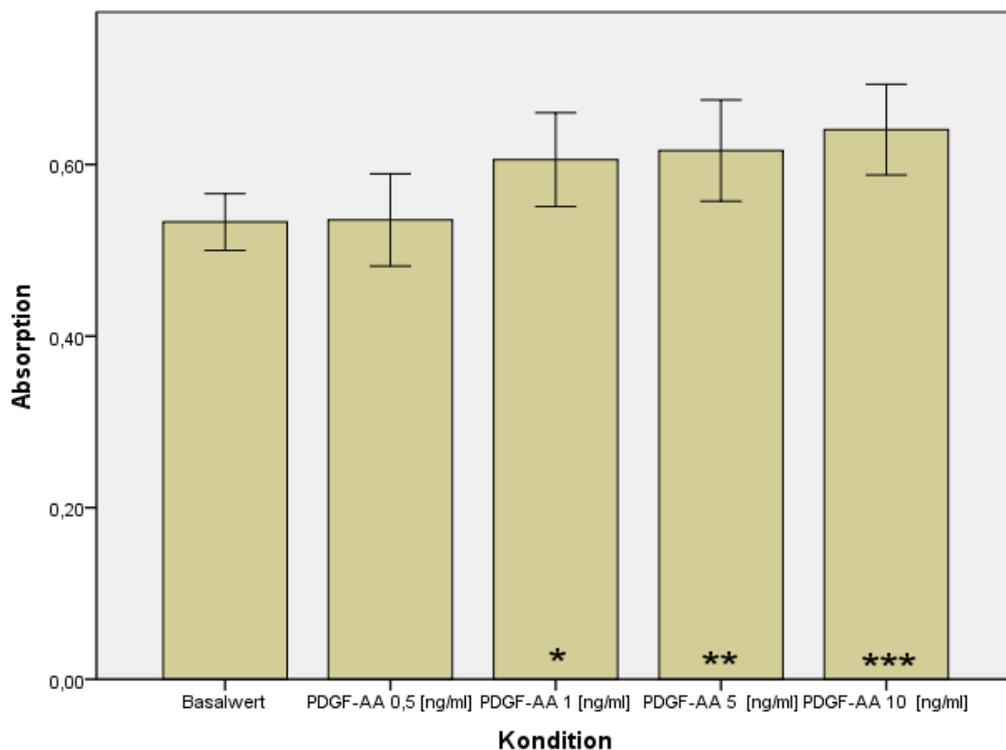


Abb. 36 Wirkung von PDGF-AA auf die Proliferation von M4. Dargestellt ist die während des WST-1-Assays gemessene Absorption (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-AA kam es in den Konditionen 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-AA verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

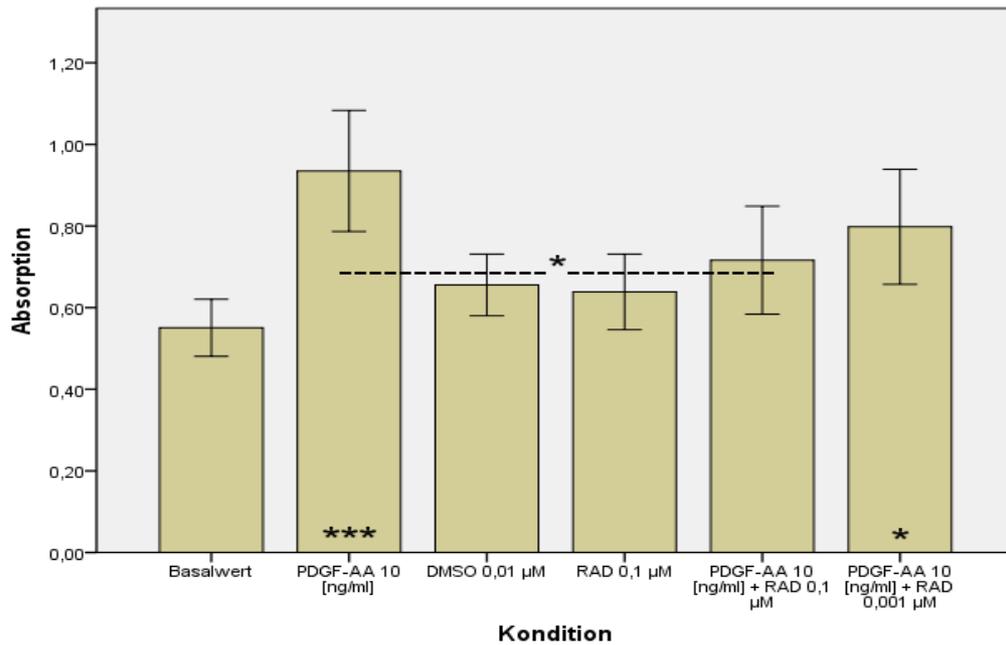


Abb. 37 Wirkung von PDGF-AA und RAD001 auf die Proliferation von M16. Dargestellt ist die während des WST-1-Assays gemessene Absorption (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konditionen kam es bei 10 ng/ml PDGF-AA zu einer signifikanten Stimulation (relativ zum Basalwert und 0,01 μ M DMSO), die durch Zugabe von 0,1 μ M RAD001 revertiert wurde. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

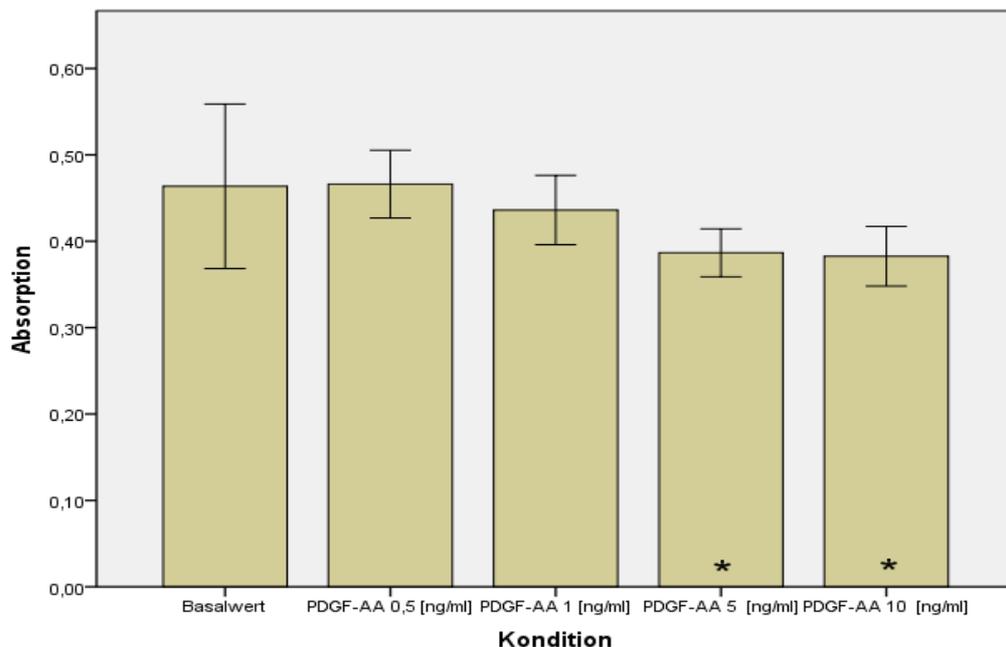


Abb. 38 Wirkung von PDGF-AA auf die Proliferation von M5. Dargestellt ist die während des WST-1-Assays gemessene Absorption (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD). Nach Inkubation für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-AA kam es in den Konditionen 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-AA verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

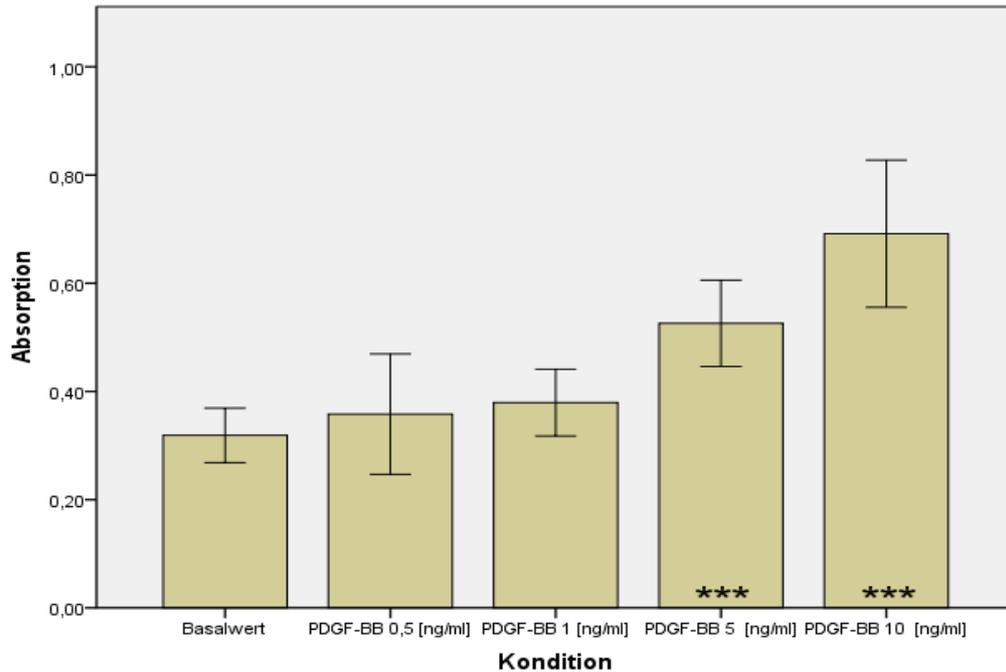


Abb. 39 Wirkung von PDGF-BB auf die Proliferation von M5. Dargestellt ist die während des WST-1-Assays gemessene Absorption (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD). Nach Inkubation für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

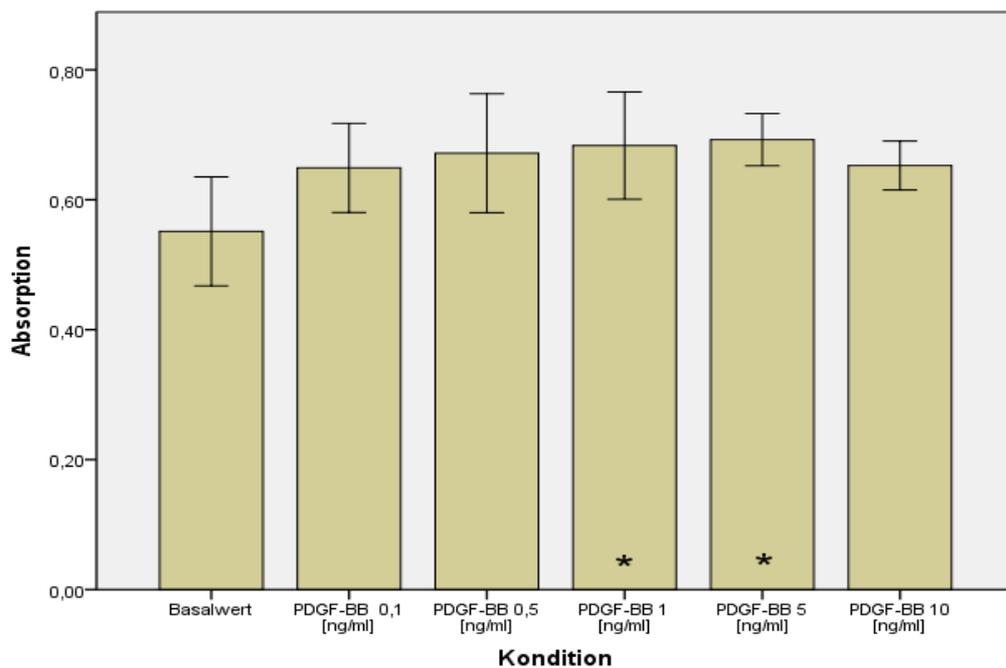


Abb. 40 Wirkung von PDGF-BB auf die Proliferation von M13. Dargestellt ist die während des WST-1-Assays gemessene Absorption (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD). Nach Inkubation für 48h mit den angegebenen Konzentrationen von PDGF-BB kam es in den Konditionen 1 ng/ml und 5 ng/ml zu einer signifikanten Stimulation. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (1%) Kulturmedium ohne PDGF-BB verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

4. Ergebnisse

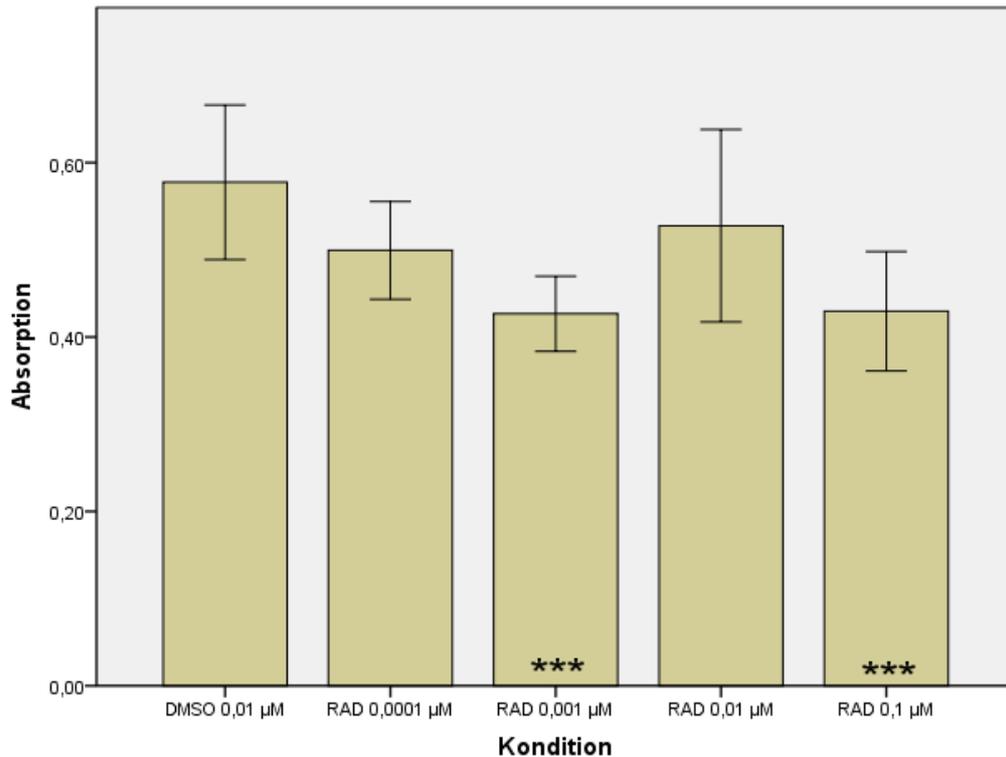


Abb. 41 Wirkung von RAD001 auf die Proliferation von M23. Dargestellt ist die während des WST-1-Assays gemessene Absorption (Balken repräsentieren Mittelwert \pm SD). Nach Inkubation für 24h mit den angegebenen Konzentrationen von RAD001 kam es in den Konditionen 0,001 μ M und 0,1 μ M zu einer signifikanten Inhibition. Für den Basalwert wurde FCS-haltiges (10%) Kulturmedium mit 0,01 μ M DMSO verwendet. Die Differenz der Mittelwerte bzgl. Basalwert war auf dem Niveau * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ signifikant.

Tabelle 16 Zusammenfassung der durch den WST-1-Assay ermittelten Daten mit Angabe von Inkubationsdauer, Mittelwert der basalen Absorption, des maximalen Effekts auf Stimulation bzw. Inhibition und der Kondition, bei welcher dieser auftrat, sowie Angabe des entsprechenden p-Werts

| Tumor | Inkubationszeit | Mittelwert Basalwert [Absorption] (SD) | Maximaler Effekt [Absorption] (SD) und Kondition | p-Wert |
|-----------|-----------------|--|--|---------|
| M3 | 48h | 0,576 (0,066) | 0,656 (0,071), PDGF-AA 5 ng/ml | 0,024 |
| M3 | 72h | 0,760 (0,114) | 0,713 (0,053), PDGF-BB 10 ng/ml | 1,000 |
| M4 | 24h | 0,533 (0,033) | 0,641 (0,053), PDGF-AA 10 ng/ml | < 0,001 |
| M4 | 72h | 0,479 (0,048) | 0,585 (0,048), PDGF-AA 0,5 ng/ml | < 0,001 |
| M4 | 24h | 0,473 (0,042) | 0,400 (0,033), PDGF-BB 0,5 ng/ml | 0,349 |
| M4 | 72h | 0,619 (0,092) | 0,872 (0,094), PDGF-BB 10 ng/ml | < 0,001 |
| M5 | 48h | 0,464 (0,095) | 0,383 (0,035), PDGF-AA 10 ng/ml | 0,005 |
| M5 | 48h | 0,319 (0,051) | 0,692 (0,136), PDGF-BB 10 ng/ml | < 0,001 |
| M7 | 48h | 0,622 (0,088) | 0,702 (0,062), PDGF-AA 5 ng/ml | 0,664 |

4. Ergebnisse

| Tumor | Inkubationszeit | Mittelwert Basalwert [Absorption] (SD) | Maximaler Effekt [Absorption] (SD) und Kondition | p-Wert |
|------------|-----------------|--|---|---------|
| M7 | 48h | 0,388 (0,092) | 0,471 (0,044), PDGF-BB 10 ng/ml | 0,256 |
| M11 | 48h | 0,636 (0,101) | 0,805 (0,150), PDGF-AA 0,1 ng/ml | 0,058 |
| M11 | 48h | 0,531 (0,040) | 0,647 (0,150), PDGF-BB 5 ng/ml | 0,421 |
| M13 | 48h | 0,519 (0,044) | 0,593 (0,172), PDGF-AA 5 ng/ml | 1,000 |
| M13 | 48h | 0,551 (0,084) | 0,693 (0,040), PDGF-BB 5 ng/ml | 0,025 |
| M16 | 24h | 0,551 (0,070)a | 0,935 (0,148), PDGF-AA 10 ng/ml | < 0,001 |
| M16 | 24h | 0,597 (0,096)b | 1,310 (0,173), PDGF-BB 10 ng/ml + RAD 0,001 µM | < 0,001 |
| M16 | 24h | 0,722 (0,176)c | 0,514 (0,062), RAD001 0,1 µM | 0,096 |
| M18 | 24h | 0,505 (0,090)a | 0,386 (0,022), RAD001 0,1 µM | 0,299 |
| M18 | 24h | 0,696 (0,097)b | 1,127 (0,050), PDGF-BB 10 ng/ml + RAD001 0,001 µM | < 0,001 |
| M18 | 24h | 0,394 (0,017)c | 0,347 (0,030), RAD 0,1 µM | 0,268 |
| M22 | 24h | 0,775 (0,244)d | 1,140 (0,295), Curcumin 20 µM | 0,008 |
| M22 | 24h | 1,697 (0,363)c | 1,928 (0,371), RAD001 0,001 µM | 1,000 |
| M23 | 24h | 0,578 (0,089)c | 0,427 (0,043), RAD001 0,001 µM | < 0,001 |
| M24 | 24h | 0,277 (0,076)c | 0,237 (0,074), RAD001 0,1 µM | 1,000 |

a Zur Bestimmung des Basalwerts wurden die Zellen mit FCS-haltigem (1%) Kulturmedium inkubiert. Die anderen Konditionen waren 10 ng/ml PDGF-AA/0,01 µM DMSO/0,1 µM RAD001/10 ng/ml PDGF-AA + 0,1 µM RAD001 und 10 ng/ml PDGF-AA + 0,001 µM RAD in jeweils FCS-haltigem (1%) Kulturmedium.

b Zur Bestimmung des Basalwerts wurden die Zellen mit FCS-haltigem (1%) Kulturmedium inkubiert. Die anderen Konditionen waren 10 ng/ml PDGF-BB/0,01 µM DMSO/0,1 µM RAD001/10 ng/ml PDGF-BB + 0,1 µM RAD001 und 10 ng/ml PDGF-BB + 0,001 µM RAD001 in jeweils FCS-haltigem (1%) Kulturmedium.

c Zur Bestimmung des Basalwerts wurden die Zellen mit 0,01 µM DMSO in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium inkubiert. Die anderen Konditionen waren 0,00001/0,0001/0,001/0,01 und 0,1 µM RAD001 in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium.

d Zur Bestimmung des Basalwerts wurden die Zellen mit 3 mM DMSO in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium inkubiert. Die anderen Konditionen waren 1/5/10/20 und 30 µM Curcumin in FCS-haltigem (10%) Kulturmedium.

4.5 Untersuchung der Signaltransduktion von PDGF

Um herauszufinden, über welchen Signaltransduktionsweg PDGF in humanen Meningiomen wirkt, wurde die PI3K-Signalkaskade anhand von Western Blots und anschließender Immundetektion nach Stimulation mit PDGF-AA oder PDGF-BB für 5 min, 10 min, 15 min oder 30 min untersucht.

4. Ergebnisse

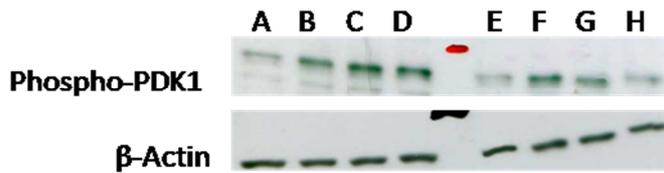


Abb. 42 Immundetektion von Phospho-PDK1 auf einem Western Blot von M18. A Negativkontrolle, B nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-AA für 5 min, C 15 min, D 30 min, E Negativkontrolle, F nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-BB für 5 min, G 15 min, H 30 min. Als Referenz der Proteinmenge wurde zusätzlich β -Actin dargestellt.

Es konnte für M18 eine Zunahme an phosphorylierter PDK1 nach Inkubation mit sowohl 10 ng/ml PDGF-AA für 5, 15 und 30 min, als auch mit 10 ng/ml PDGF-BB für 5 und 15 min gezeigt werden (s. Abb. 42). Ferner ließ sich für M7 (s. Abb. 43) und M18 (s. Abb. 44) ein Zuwachs des an Serin 473 phosphorylierten Akt nach Inkubation mit PDGF-AA für 10, 15 und 30 min und nach Inkubation mit PDGF-BB für 5, 10, 15 und 30 min bzw. nach Inkubation mit PDGF-AA und PDGF-BB für jeweils 5, 15 und 30 min beobachten.

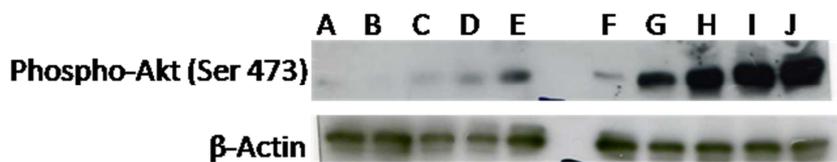


Abb. 43 Immundetektion von Phospho-Akt (Ser473) auf einem Western Blot von M7. A Negativkontrolle, B nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-AA für 5 min, C 10 min, D 15 min, E 30 min, F Negativkontrolle, G nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-BB für 5 min, H 10 min, I 15 min, J 30 min. Als Referenz der Proteinmenge wurde zusätzlich β -Actin dargestellt.

Ebenfalls konnte für das an Threonin 308 phosphorylierte Akt in M18 eine Vermehrung nach Inkubation mit PDGF-AA und PDGF-BB für jeweils 5, 15 und 30 min nachgewiesen werden (s. Abb. 45).

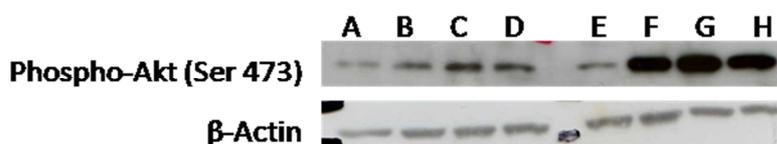


Abb. 44 Immundetektion von Phospho-Akt (Ser473) auf einem Western Blot von M18. A Negativkontrolle, B nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-AA für 5 min, C 15 min, D 30 min, E Negativkontrolle, F nach Inkubation mit 10

4. Ergebnisse

ng/ml PDGF-BB für 5 min, G 15 min, H 30 min. Als Referenz der Proteinmenge wurde zusätzlich β -Actin dargestellt.

In M11 fand sich eine Steigerung an Phospho-mTOR nach Inkubation mit PDGF-AA für 10 und 30 min, sowie nach Inkubation mit PDGF-BB für 5, 10, 15 und 30 min (s. Abb. 46).

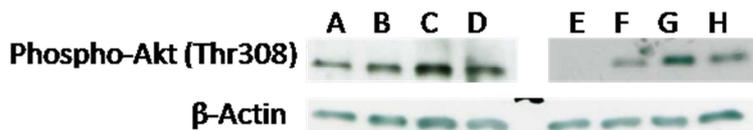


Abb. 45 Immundetektion von Phospho-Akt (Thr308) auf einem Western Blot von M18. A Negativkontrolle, B nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-AA für 5 min, C 15 min, D 30 min, E Negativkontrolle, F nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-BB für 5 min, G 15 min, H 30 min. Als Referenz der Proteinmenge wurde zusätzlich β -Actin dargestellt.

Außerdem ließ sich ein Anstieg des phosphorylierten PTEN in M18 nach Inkubation sowohl mit PDGF-AA, als auch mit PDGF-BB für jeweils 5 und 15 min feststellen (s. Abb. 47). Abb. 48 zeigt einen Western Blot von M22, aus dem hervorgeht, dass Inkubation mit CoCl_2 eine starke Induktion und Inkubation mit PDGF-BB eine schwache Hemmung von HIF-1 α verursachte.

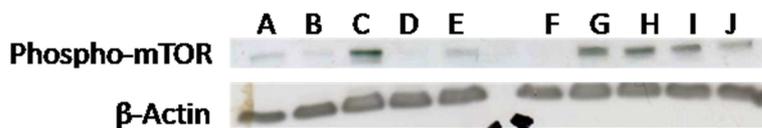


Abb. 46 Immundetektion von Phospho-mTOR (Ser2448) auf einem Western Blot von M11. A Negativkontrolle, B nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-AA für 5 min, C 10 min, D 15 min, E 30 min, F Negativkontrolle, G nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-BB für 5 min, H 10 min, I 15 min, J 30 min. Als Referenz der Proteinmenge wurde zusätzlich β -Actin dargestellt.

Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass PDGF-AA und PDGF-BB in Meningiomzellen den PI3K-Akt-Signaltransduktionsweg aktivieren konnten, jedoch ohne die HIF-1 α -Expression zu stimulieren.

4. Ergebnisse

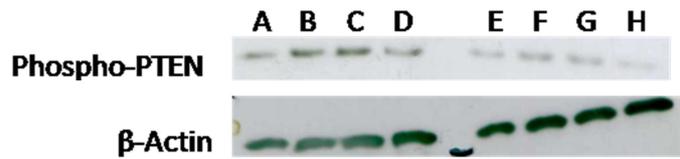


Abb. 47 Immundetektion von Phospho-PTEN auf einem Western Blot von M18. *A* Negativkontrolle, *B* nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-AA für 5 min, *C* 15 min, *D* 30 min, *E* Negativkontrolle, *F* nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-BB für 5 min, *G* 15 min, *H* 30 min. Als Referenz der Proteinmenge wurde zusätzlich β -Actin dargestellt.

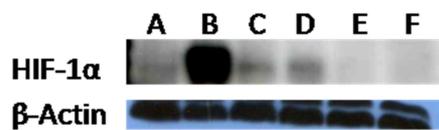


Abb. 48 Immundetektion von HIF-1 α auf einem Western Blot von M22. *A* Negativkontrolle, *B* nach Inkubation mit 250 μ M CoCl₂ für 3h, *C* nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-BB für 6h, *D* Negativkontrolle, *E* nach Inkubation mit 10 ng/ml PDGF-BB für 24h, *F* Negativkontrolle. Als Referenz der Proteinmenge wurde zusätzlich β -Actin dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Expression von PDGF-Rezeptoren

Die Mitglieder der PDGF-Wachstumsfaktorenfamilie wirken über spezifische Rezeptoren als essentielle Stimulatoren der Zellproliferation in vielen Tumoren (Wen et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde in 20 humanen Meningiomen immunhistochemisch die Expression von PDGFR- α und PDGFR- β untersucht (s. Tabelle 13). 60% der untersuchten Meningiome waren dabei positiv für PDGFR- α , ebenso 60% für PDGFR- β und 45% exprimierten beide Rezeptorsubtypen gleichzeitig. Diese Beobachtung war insofern überraschend, als in früheren Studien kein Nachweis der Expression von PDGFR- α gelang (Maxwell et al., 1990; Wang et al., 1990) und in einer weiteren Studie lediglich zwei Meningiome positiv für den α -Rezeptor waren (Yang and Xu, 2001). In diesen Studien wurde zudem die Expression von PDGF-BB gezeigt, was Anlass zur Vermutung einer autokrinen Stimulation des PDGFR- β durch diesen Liganden gab. Analog dazu erscheint es plausibel, dass PDGF-AA, dessen Expression ebenfalls nachgewiesen wurde, zu einer autokrinen Stimulation des PDGFR- α führen könnte und somit möglicherweise an der Tumorgenese beteiligt ist. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass Stimulation mit PDGF-AA in PDGFR- α -exprimierenden Meningiomen zu einer, im WST1-Assay gemessenen, gesteigerten Proliferationsrate führte, die von der Dosis abhing (s. Abb. 36).

Andererseits ergab sich hinsichtlich des PDGFR- β in nur 52,2% der Fälle eine positive Immunoreaktivität, während dies in den weiter oben zitierten Studien nahezu in allen Fällen geschah, wobei die Expression von PDGFR- β nicht zwingend mit einem neoplastischen Phänotyp korreliert, denn PDGFR- β -mRNA konnte auch in Primärzellkulturen von normaler Arachnoidea mater detektiert werden (Wang et al., 1990). Diese Differenzen in der IHC lassen sich möglicherweise auf methodische Unterschiede, z.B. in Sensitivität und Spezifität der eingesetzten Primärantikörper, zurückführen.

Obwohl in vivo manche der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumoren, wie beispielsweise M11, weder PDGFR- α noch - β exprimierten (s. Abb. 13) oder negativ für PDGFR- α (z.B. M18, s. Tabelle 13) waren, konnte in vitro die Inkubation der Zellen mit PDGF-AA oder PDGF-BB signifikante Effekte in verschiedenen Experimenten erzielen. Dieses Phänomen könnte auf einer veränderten Rezeptorexpression der kultivierten Zellen beruhen, wie es für Fibroblasten und glatte Muskelzellen nach Explantation in Gewebekultur beschrieben wurde (Terracio et al., 1988). Ferner lässt sich nicht ausschließen, dass die Zellen den heterodimeren PDGFR- $\alpha\beta$ ausbildeten, welcher durch den Liganden PDGF-BB aktiviert wurde. Über die pathogenetische Relevanz dieses Rezeptors ist allerdings wenig bekannt (Fredriksson et al., 2004).

5.2 PI3K-Akt-mTOR-Signaltransduktionsweg

Seit seiner Entdeckung vor über 20 Jahren wurde der PI3K-Signalweg mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht und in den letzten Jahren stellte sich heraus, dass er einer der am häufigsten betroffenen Signalwege in allen sporadischen Tumorformen ist (Shaw and Cantley, 2006). Auch in Meningiomen fanden sich Hinweise für eine Aktivierung des PI3K-Akt-Signaltransduktionswegs (Johnson et al., 2002), was in Einklang mit den Ergebnissen steht, die ich in den Immunoblots erhielt. In M18 konstatierte ich eine Zunahme von Phospho-PDK1 (s. Abb. 42) und Phospho-Akt (s. Abb. 44 und Abb. 45) nach Stimulation mit 10 ng/ml PDGF-AA oder PDGF-BB. Die Phosphorylierung von Akt erfolgte an – vermittelt durch mTORC2 – Ser473, einem hydrophoben Motiv, und an – durch PDK1 – Thr308 innerhalb der Aktivierungsschleife, was zusammen einer vollständigen Aktivierung dieser Kinase entspricht (Sarbasov et al., 2005; Engelman, 2009). Verglichen mit benignen Meningiomen wurde Phospho-Akt in höheren Mengen in atypischen und anaplastischen Meningiomen nachgewiesen (Mawrin et al., 2005).

Weiterhin beobachtete ich einen Anstieg von Phospho-PTEN (s. Abb. 47) nach Stimulation mit 10 ng/ml PDGF-AA oder PDGF-BB. Phosphorylierung dieses essentiellen Regulators des PI3K-Akt-Signalwegs resultiert in einer reduzierten katalytischen Aktivität gegenüber

5. Diskussion

Lipidsubstraten (Salmena et al., 2008). PTEN gilt nach p53 als der am häufigsten mutierte Tumorsuppressor im Menschen und eine wichtige Studie enthüllte, dass der Verlust von PTEN ein häufiges Ereignis in BRCA1-defizientem Mamma-Karzinom darstellt (Shaw and Cantley, 2006; Saal et al., 2008).

Ebenso ließ sich eine Zunahme des an Ser2448 phosphorylierten mTOR verzeichnen (s. Abb. 46). mTOR, eines der wesentlichen Effektormoleküle des PI3K-Akt-Signalwegs und bedeutender Regulator von Proliferation und Zellwachstum, wird - vermehrt bei konstitutiv exprimiertem Akt - PI3K-abhängig an Ser2448 und Thr2446 phosphoryliert. Dies führte zur Hypothese, dass Akt, zusätzlich zum indirekten Weg über TSC, direkt mTOR regulieren könne (Wullschleger et al., 2006; Engelman, 2009). Jedoch gelang es zwei Gruppen zu zeigen (Chiang and Abraham, 2005; Holz and Blenis, 2005), dass p70-S6-Kinase für die Phosphorylierung an diesen beiden Stellen verantwortlich ist. Allerdings bleibt die Signifikanz dieser potentiellen Feedback-Schleife und, ob es sich um eine positive oder negative Modifikation handelt, unklar (Wullschleger et al., 2006). Dennoch war in einer Studie an 143 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus der immunhistochemisch bestimmte Grad an phosphoryliertem mTOR im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (Hirashima et al., 2010) und in zwei weiteren Studien wurde eine Assoziation des Nierenzellkarzinoms und des Synovialkarzinoms mit hyperphosphoryliertem mTOR entdeckt (Friedrichs et al., 2010; Kruck et al., 2010).

5.3 VEGF-Sekretion

Meningiome sind stark vaskularisierte Tumoren, welche hauptsächlich über meningeale Äste der A. carotis externa versorgt werden (Wen et al., 2010). Inhibition der Tumorangio-genese ist ein zunehmend relevanter Therapieansatz in der Tumorbehandlung geworden (Kerbel, 2008). VEGF und VEGFR, die eine Schlüsselrolle in der Tumorangio-genese innehaben, werden in Meningiomen exprimiert, wobei das Expressionslevel mit steigendem Tumorgrad ansteigt. In atypischen Meningiomen ist es, verglichen mit benignen, zweifach und in malignen zehnfach erhöht (Wen et al., 2010). Für

5. Diskussion

verschiedene Konditionen wurden mittels ELISA die VEGF-Konzentration in Zellüberständen gemessen und es zeigte sich bei den mit PDGF-BB stimulierten Zellen eine dosisabhängige Zunahme der VEGF-Konzentration (s. z.B. Abb. 22 und Abb. 24), in Übereinstimmung mit einer Studie, wo PDGF-BB in einer konzentrations- und zeitabhängigen Weise die Transkription und Sekretion von VEGF in PDGFR- β -exprimierenden Endothelzellen durch Aktivierung des PI3K-Signaltransduktionswegs stimulierte. Das sezernierte VEGF war funktionell in der Lage, Mitogenese und Migration von Endothelzellen anzuregen (Wang et al., 1999). In einer anderen Untersuchung verstärkte die Überexpression von PDGF-B durch Induktion der VEGF-Expression im Tumorendothel die Tumorangiogenese und das Wachstum von Gliomen *in vivo* (Guo et al., 2003). Genetische Studien demonstrierten, dass PDGF-B und PDGFR- β an der Gefäßreifung beteiligt sind, indem sie glatte Muskelzellen und Perizyten an wachsende Gefäße während der Embryonalentwicklung rekrutieren, ein Effekt, der auch in jenen Gliomen und anderen Tumormodellen beobachtet werden konnte (Guo et al., 2003; Ostman, 2004). Zudem inhibierte PDGF-B in Gliomen bei gleichzeitiger Überexpression mit VEGF die VEGF-induzierten Blutungen, welche bei alleiniger VEGF-Überexpression in einer früheren Studie aufgetreten waren, indem es zu einer Zunahme der kapillaren Perizyten gekommen war, wodurch die Reifung der schnell wachsenden Gefäße beschleunigt und Gefäßrupturen verhindert wurden (Guo et al., 2003). Dies zusammen unterstreicht die Bedeutung von PDGF und PDGFR für die Tumorangiogenese.

In einer anderen Studie hatte PDGF-BB in der Meningiomzelllinie CH-157MN keinen statistisch signifikanten Effekt auf die in den Zellüberständen bestimmte VEGF-Sekretion, im Gegensatz zu *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), welche eine deutliche Zunahme der VEGF-Sekretion bewirkten (Tsai et al., 1999).

Bei meinen Untersuchungen zur VEGF-Sekretion trat überraschenderweise neben der stimulatorischen Wirkung in bestimmten Fällen eine Inhibition auf. So kam es nach Inkubation mit PDGF-BB zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der VEGF-Sekretion (s. beispielsweise Abb. 20 und Abb. 21), gleichfalls wurden für PDGF-AB und PDGF-AA ausschließlich inhibitorische Effekte auf die VEGF-Sekretion beobachtet (s. Abb.

5. Diskussion

14. oder Abb. 18). Lederle und Kollegen (Lederle et al., 2006) beschrieben einen dualen, zeitabhängigen Einfluss von PDGF-BB auf Fibroblasten in vivo und in vitro. PDGF-BB induzierte eine frühe, ausgeprägte angiogene Reaktion und endotheliale Zellaktivierung mit Hochregulierung von VEGFR innerhalb der ersten drei Wochen in vivo im HaCaT-Haut-Karzinogenese-Model, gefolgt von einer Herunterregulierung der VEGFR und Stromaaktivität und anschließender Reduktion der Gefäßdichte trotz persistierender PDGF-B-Expression des hyperplastischen Epithels. Ein ähnliches Bild ergaben die im Anschluss durchgeführten Zellkulturversuche mit humanen dermalen Fibroblasten, welche initial nach Stimulation mit PDGF-BB für 72h einen deutlichen Anstieg der VEGF-Expression offenbarten. Indes führte eine Langzeitstimulation mit PDGF-BB über 16 Tage zu einer ausgesprochenen Abnahme der VEGF-Sekretion verglichen mit der Kontrollgruppe. Auch in der vorliegenden Arbeit gab es Anhaltspunkte für eine zeitabhängige Regulation der Stimulation durch PDGF-BB. So bewirkte PDGF-BB in M5 erst nach einer Inkubationsdauer von 72h eine signifikante Inhibition der VEGF-Sekretion, während die Inkubation für 24h und 48h zu einer Stimulation geführt hatte. Ähnlich verhielt sich M4, wo PDGF-BB nach 48h Inkubationsdauer eine Stimulation und nach 72h eine Inhibition der VEGF-Sekretion hervorrief. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass sich in M18 bereits nach 24h Inkubation mit PDGF-BB eine Inhibition einstellte und in M7, M11 und M13 nach 48h. Denkbar als Ursache der VEGF-Inhibition wäre zudem eine Suppression der PDGFR oder des PI3K-Akt-mTOR-Signalwegs auf bislang ungeklärte Weise. Es wäre folglich äußerst interessant, die molekularen Mechanismen, die der durch PDGF-BB und insbesondere auch der durch die beiden Isoformen PDGF-AA und PDGF-AB vermittelten Inhibition der VEGF-Sekretion in humanen Meningiomen zugrunde liegen, zu erforschen.

Die beobachtete inhibitorische Wirkung von PDGF-AA auf die VEGF-Sekretion bestätigend, ergaben RT-PCR-Untersuchungen der VEGF-Transkription in M22 und M23, zur Kontrollprobe verglichen, verminderte VEGF-mRNA-Level nach Inkubation der Zellen mit PDGF-AA. Ein weiterer, dazu passender Befund bestand im Immunoblot von M22, auf dem kein Effekt von PDGF-AA oder PDGF-BB auf die HIF-1 α -Expression nachweisbar war, wohingegen CoCl₂ einen starken Anstieg von HIF-1 α induzierte. HIF-1 α ist die regulatorische Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1, welcher die Transkription an

5. Diskussion

entscheidenden Aspekten der Tumorbiologie beteiligter Zielgene, darunter VEGF, kontrolliert, und welcher Hauptregulator der Sauerstoffhomöostase ist. Die Degradation von HIF-1 α wird primär über O₂-abhängige Mechanismen reguliert und HIF-1 α ist als Folge intratumoraler Hypoxie oder genetischer Veränderungen in den meisten humanen Tumortypen überexprimiert (Semenza, 2003). Die Translation von HIF-1 α wird außerdem von mTORC1 kontrolliert (Shaw and Cantley, 2006), wodurch die Verbindung zum PI3K-Akt-mTOR-Signalweg hergestellt wird. CoCl₂ kann in kultivierten Zellen eine hypoxische Reaktion auslösen und induzierte einen starken Anstieg der HIF-1 α -Expression in meinem Versuch. Dieser Befund sollte allerdings kritisch bewertet werden, denn es wurde kürzlich in einer Studie gezeigt, dass die Kobaltionen in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), welches reichlich Histidin enthält und von mir als Kulturmedium benutzt wurde, durch Chelatbildung mit Histidin sequestriert und somit in ihrer Wirkung inhibiert werden (Torii et al., 2011).

5.4 Zellproliferation

Es wird angenommen, dass PDGF in humanen Meningiomen über auto- und parakrine Mechanismen das Tumorstadium stimuliert. Studien belegten, dass PDGF in vitro ein potentes Mitogen des Tumorstadiums ist und den PI3K-Akt-mTOR-Signaltransduktionsweg aktiviert (Ragel and Jensen, 2010). Meine Ergebnisse zur Zellproliferation im ³H-Thymidin-Inkorporations- und WST1-Assay bestätigten diese Beobachtung, denn Stimulation der Tumorzellen mit PDGF-BB für 24h (oder 48h in M5) rief in allen getesteten Meningiomen einen signifikanten Anstieg der Inkorporationsrate von ³H-Thymidin hervor (s. u.a. Abb. 30 für eine dosisabhängige Stimulation der Inkorporationsrate). Dies entspricht den von Wang und Kollegen erhobenen Daten (Wang et al., 1990), die ebenfalls in vitro eine Steigerung des ³H-Thymidin-Einbaus nach Inkubation mit PDGF-BB, nicht aber mit PDGF-AA, anzeigten. Im WST1-Assay fand ich für PDGF-BB eine stimulatorische Wirkung, die von der Konzentration abhing (s. Abb. 39), aber auch PDGF-AA rief, abgesehen von M5, wo eine Inhibition auftrat (s. Abb. 38), eine signifikante Steigerung der Proliferation hervor (s. z.B. Abb. 36). Meine Resultate bekräftigten folglich die

große mitogene Bedeutung von PDGF-BB und enthüllten zusätzlich das stimulatorische Potential von PDGF-AA hinsichtlich der Zellproliferation in humanen Meningiomzellkulturen. Da PDGF-AA als Ligand nur an PDGFR- α bindet, bestätigte dies die von mir postulierte autokrine Tumorstimulation über den PDGFR- α . Als ein weiteres Indiz für die Relevanz des PDGFR- α in der Tumorgenese konnte zudem PDGF-BB in M24, das positiv für den PDGFR- α war, aber keinen PDGFR- β exprimierte, eine Stimulation der Proliferation auslösen.

5.5 RAD001 und Curcumin

Schließlich untersuchte ich den Einfluss von RAD001 (Everolimus) und Curcumin auf die Zellproliferation und auf die VEGF-Sekretion. Der orale mTOR-Inhibitor RAD001, ein Derivat von Rapamycin und ursprünglich als Immunsuppressivum eingeführt, wurde kürzlich zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen (Liu et al., 2009). Durch Bindung an *FK506 Binding Protein-12* (FKBP-12) formt es einen Komplex, der eine Inhibition der mTOR-Kinaseaktivität und verminderte Aktivität der beiden mTOR-Effektormoleküle p70-S6-Kinase und *4E-binding Protein 1* (4EBP1) induziert, sowie die Expression von HIF-1 α und VEGF supprimiert. In In-vivo- und In-vitro-Studien konnten antiproliferative und antiangiogenetische Effekte von RAD001 nachgewiesen werden (Capdevila et al., 2011). Das aus der Gelbwurz (*Curcuma longa*) stammende Curcumin bewies antikanzerogene Eigenschaften in vitro und in diversen Mausmodellen. Zu den zahlreichen molekularen Zielen von Curcumin gehört auch der PI3K-Akt-Signalweg durch Inhibition von mTOR (Wong et al., 2011). In meinen Analysen unterdrückte RAD001 im ³H-Thymidin-Inkorporationsversuch signifikant die Zellproliferation (s. z.B. Abb. 32) und die im ELISA gemessene VEGF-Konzentration (s. Abb. 26), was auf eine mögliche mTOR-abhängige Regulation der VEGF-Expression deutet. Im WST-1-Assay zeigte RAD001 ebenfalls einen antiproliferativen Effekt (s. Abb. 41) und konnte eine durch PDGF-AA hervorgerufene Stimulation revertieren (s. Abb. 37).

5. Diskussion

Curcumin induzierte im ^3H -Thymidin-Inkorporationsversuch eine signifikante Hemmung der Proliferation, die in der höchsten Konzentration (30 μM) sehr prononciert ausfiel (s. Abb. 34). In M24 (s. Abb. 35) kam es jedoch in den niedrigen Curcumin-Konzentrationen zu einer stimulatorischen Komponente und erst in den hohen Curcumin-Konzentrationen 20 und 30 μM zu einer starken Inhibition; in M22 trat, sowohl im ^3H -Thymidin-Einbau als auch im WST1-Assay, ausschließlich Stimulation auf.

RAD001 verhielt sich in meinen Untersuchungen vielversprechend und die Ergebnisse einer momentan laufenden Phase-II-Studie zu RAD001 in Kombination mit Bevacizumab, einem VEGF-Antikörper, für Patienten mit rezidivierenden oder progressiven Meningiomen sind mit Gespanntheit zu erwarten. Curcumin bewies ebenfalls ein starkes antiproliferatives Potential und weitere Studien, welche die molekularen Wirkmechanismen von Curcumin beleuchten und eine mögliche Bedeutung in der Therapie humaner Meningiome evaluieren, sind indiziert.

Ein anderes aussichtsreiches Pharmakon, das in einer multizentrischen Phase-II-Studie an Patienten mit rezidivierenden oder inoperablen Meningiomen erprobt wird, ist Sunitinib, ein multipler Tyrosinkinase-Inhibitor (Wen et al., 2010). Durch simultane Blockierung des PDGFR und VEGFR interferiert Sunitinib mit der für die Tumorprogression essentiellen auto- und parakrinen Stimulation durch Wachstumsfaktoren, wie PDGF und VEGF, und der Tumorangiogenese.

5.6 Schlussfolgerung

Resümierend lassen sich aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit folgende Schlussfolgerungen ziehen: Humane Meningiome exprimierten in-vivo, entgegen der bisherigen Annahme, zu gleichen Teilen PDGFR- α und PDGFR- β , so dass auch eine autokrine Tumorstimulation durch den PDGFR- α möglich erscheint. Sowohl PDGF-AA, als auch PDGF-BB aktivierten den PI3K-Signaltransduktionsweg und induzierten die Phosphorylierung von mTOR und dem Tumorsuppressor PTEN, welcher dadurch

5. Diskussion

inaktiviert wird. Die Signifikanz von phosphoryliertem mTOR ist allerdings unklar, wiewohl es Hinweise für eine Tumorassoziation gibt. PDGF-BB stimulierte die VEGF-Sekretion, konnte sie jedoch ebenfalls hemmen, während PDGF-AA und -AB ausschließlich inhibitorisch wirkten. Als Ursache hierfür sind beispielsweise zeitabhängige Regulationsprozesse der PDGF-Stimulation denkbar, eine endgültige Erklärung bleibt jedoch noch abzuwarten. Mit der inhibitorischen Wirkung übereinstimmend, fand ich zudem für PDGF-AA und -BB auf mRNA-Ebene eine Hemmung der VEGF-Transkription und es konnte kein Anstieg der HIF-1 α -Expression festgestellt werden. Die bekannte mitogene Wirkung von PDGF-BB wurde durch meine Ergebnisse in Proliferationsversuchen bestätigt. Außerdem konnte dies auch für PDGF-AA nachgewiesen werden, was eine mögliche Rolle in der Tumorgenese unterstreicht. RAD001 und Curcumin schließlich entfalteten in humanen Meningiomen ausgeprägte antiproliferative Effekte in vitro und momentan noch laufende Phase-II-Studien zu RAD001 werden zusätzlich Aufschluss über dessen therapeutisches Potential geben können.

6 Zusammenfassung

Humane Meningiome sind die häufigsten primären Tumoren des zentralen Nervensystems. Sie sind gut vaskularisiert und exprimieren *Vascular Endothelial Growth Factor*, einen bedeutsamen, wesentlich an der Angiogenese beteiligten Wachstumsfaktor, und die zugehörigen Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass der über den *Platelet-derived Growth Factor*-Rezeptor- β aktivierte Phosphoinositid-3-Kinase-Akt-Signalweg in der Pathogenese von Meningiomen eine entscheidende Rolle spielt. *Platelet-derived Growth Factor* ist ein weiterer, für die Entstehung einer Vielzahl von Krankheitsprozessen relevanter Wachstumsfaktor und potentes Mitogen in Meningiomen. In der vorliegenden Arbeit beleuchtete ich folgende Fragen: Werden *Platelet-derived Growth Factor*-Rezeptor- α und - β auf Meningiomzellen exprimiert? Stimulieren verschiedene Isoformen des *Platelet-derived Growth Factor* die *Vascular Endothelial Growth Factor*-Sekretion und die Proliferation von Meningiomzellen und aktivieren sie den Phosphoinositid-3-Kinase-Akt-Signalweg? Besitzen RAD001 und Curcumin, die beide *Mammalian Target of Rapamycin*, ein essentielles Effektormolekül von Akt, inhibieren, eine antiproliferative Wirkung in humanen Meningiomen?

Immunhistochemisch wurde auf Gewebeschnitten von 20 humanen Meningiomen die von anderen Gruppen zuvor nachgewiesene Expression des *Platelet-derived Growth Factor*-Rezeptors- β bestätigt und zudem ergab sich in mehr als der Hälfte der Fälle eine positive Immunreaktivität für den *Platelet-derived Growth Factor*-Rezeptor- α . Daher postuliere ich eine autokrine Tumorstimulation über diesen Rezeptor, neben dem bereits bekannten relevanten Beitrag zur Tumorgenese von *Platelet-derived Growth Factor*-BB und *Platelet-derived Growth Factor*-Rezeptor- β . Gestützt wurde diese Hypothese von der mitogenen Wirkung des nur an *Platelet-derived Growth Factor*-Rezeptor- α bindenden *Platelet-derived Growth Factor*-AA auf die Zellproliferation von Primärzellkulturen der humanen Meningiome, welche im WST1-Assay und ^3H -Thymidin-Inkorporationsversuch bestimmt wurde. Ebenso stimulierte *Platelet-derived Growth Factor*-BB die Proliferationsrate. Die mittels ELISA gemessene *Vascular Endothelial Growth Factor*-Sekretion wurde durch *Platelet-derived Growth Factor*-BB in-vitro

6. Zusammenfassung

gesteigert, konnte jedoch auch supprimiert werden, was sich möglicherweise auf zeitabhängige Regulationsprozesse zurückführen lässt. *Platelet-derived Growth Factor-AA* und *-AB* wirkten ausschließlich inhibitorisch. Übereinstimmend mit der Inhibition der Sekretion beobachtete ich auf mRNA-Ebene eine Unterdrückung der *Vascular Endothelial Growth Factor*-Transkription in Abhängigkeit von *Platelet-derived Growth Factor-AA* und *-BB*. Mit Immunoblots gelang es außerdem, zu zeigen, dass *Platelet-derived Growth Factor-AA* und *-BB* den Phosphoinositid-3-Kinase-Akt-Signalweg aktivierten und die Phosphorylierung von *Mammalian Target of Rapamycin* induzierten. Eine Induktion des *Hypoxia-inducible Factor-1 α* , einem wichtigen Regulator von *Vascular Endothelial Growth Factor*, trat indes nicht auf. Schließlich wurde der potentielle Nutzen von RAD001 und Curcumin in der Behandlung humaner Meningiome untersucht, die in einer Reihe von Studien antikanzerogene Eigenschaften in unterschiedlichen Tumortypen gezeigt hatten. Im WST1-Assay und ³H-Thymidin-Inkorporationsversuch konnten für beide Substanzen antiproliferative Effekte nachgewiesen werden, wobei die von Curcumin besonders ausgeprägt ausfielen, und es bleibt abzuwarten, ob sich diese Ergebnisse in vivo reproduzieren lassen.

Fazit: In der vorliegenden Arbeit wies ich – nach meinem besten Wissen – als erster die Expression von *Platelet-derived Growth Factor-Rezeptor- α* und eine mögliche Beteiligung von *Platelet-derived Growth Factor-AA* an der Tumorgenese durch autokrine Stimulation dieses Rezeptors in humanen Meningiomen nach. Ferner konnte, im Gegensatz zu der bislang beschriebenen Stimulation, eine inhibitorische Wirkung der *Platelet-derived Growth Factor*-Isoformen auf die *Vascular Endothelial Growth Factor*-Expression beobachtet werden und Curcumin zeigte deutliche antiproliferative Effekte in vitro.

7 Literaturverzeichnis

- Barski D, Wolter M, Reifenberger G, Riemenschneider MJ (2010) Hypermethylation and transcriptional downregulation of the TIMP3 gene is associated with allelic loss on 22q12.3 and malignancy in meningiomas. *Brain Pathol* 20:623-631.
- Bethke L et al. (2008) Comprehensive analysis of DNA repair gene variants and risk of meningioma. *J Natl Cancer Inst* 100:270-276.
- Betsholtz C (2004) Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:215-228.
- Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, Westermark B, Lind P, Urdea MS, Eddy R, Shows TB, Philpott K, Mellor AL, et al. (1986) cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 320:695-699.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Capdevila J, Salazar R, Halperin I, Abad A, Yao JC (2011) Innovations therapy: mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors for the treatment of neuroendocrine tumors. *Cancer Metastasis Rev* 30 Suppl 1:27-34.
- Carvalho LH, Smirnov I, Baia GS, Modrusan Z, Smith JS, Jun P, Costello JF, McDermott MW, Vandenberg SR, Lal A (2007) Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Mol Cancer* 6:64.
- Chiang GG, Abraham RT (2005) Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* 280:25485-25490.
- Clarke MF, Westin E, Schmidt D, Josephs SF, Ratner L, Wong-Staal F, Gallo RC, Reitz MS, Jr. (1984) Transformation of NIH 3T3 cells by a human c-sis cDNA clone. *Nature* 308:464-467.
- Cools J et al. (2003) A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 348:1201-1214.
- Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA, Antoniades HN (1983) Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221:275-277.
- Engelman JA (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9:550-562.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-676.
- Fredriksson L, Li H, Eriksson U (2004) The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:197-204.
- Friedrichs N, Trautmann M, Endl E, Sievers E, Kindler D, Wurst P, Czerwitzki J, Steiner S, Renner M, Penzel R, Koch A, Larsson O, Tanaka S, Kawai A, Schirmacher P, Mechttersheimer G, Wardelmann E, Buettner R, Hartmann W (2010) Phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signalling is essential in synovial sarcoma. *Int J Cancer*.
- Gazit A, Igarashi H, Chiu IM, Srinivasan A, Yaniv A, Tronick SR, Robbins KC, Aaronson SA (1984) Expression of the normal human sis/PDGF-2 coding sequence induces cellular transformation. *Cell* 39:89-97.
- Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang HJ, Cavenee WK, Cheng SY (2003) Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol* 162:1083-1093.

7. Literaturverzeichnis

- Halle A (2005) Streptococcus pneumoniae induziert Apoptose in zerebralen Endothelzellen: Die Rolle bakterieller Toxine In. Berlin.
- Hanft S, Canoll P, Bruce JN (2010) A review of malignant meningiomas: diagnosis, characteristics, and treatment. *J Neurooncol* 99:433-443.
- Hart CE, Bailey M, Curtis DA, Osborn S, Raines E, Ross R, Forstrom JW (1990) Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* 29:166-172.
- Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA (2003) PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299:708-710.
- Heldin CH, Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:1283-1316.
- Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, Karashima R, Sato N, Imamura Y, Hiyoshi Y, Nagai Y, Hayashi N, Iyama K, Baba H (2010) Phosphorylated mTOR expression is associated with poor prognosis for patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 17:2486-2493.
- Hoch RV, Soriano P (2003) Roles of PDGF in animal development. *Development* 130:4769-4784.
- Holz MK, Blenis J (2005) Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem* 280:26089-26093.
- Hou X et al. (2010) PDGF-CC blockade inhibits pathological angiogenesis by acting on multiple cellular and molecular targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12216-12221.
- Jain RK (2001) Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 46:149-168.
- Johnson MD, Okedli E, Woodard A, Toms SA, Allen GS (2002) Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-p7S6K pathway activation and transduction of mitogenic signals by platelet-derived growth factor in meningioma cells. *J Neurosurg* 97:668-675.
- Josephs SF, Guo C, Ratner L, Wong-Staal F (1984) Human-proto-oncogene nucleotide sequences corresponding to the transforming region of simian sarcoma virus. *Science* 223:487-491.
- Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol* 4:E2-5.
- Kerbel RS (2008) Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 358:2039-2049.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163-175.
- Kruck S, Bedke J, Hennenlotter J, Ohneseit PA, Kuehs U, Senger E, Sievert KD, Stenzl A (2010) Activation of mTOR in renal cell carcinoma is due to increased phosphorylation rather than protein overexpression. *Oncol Rep* 23:159-163.
- Kumar A, Hou X, Lee C, Li Y, Maminishkis A, Tang Z, Zhang F, Langer HF, Arjunan P, Dong L, Wu Z, Zhu LY, Wang L, Min W, Colosi P, Chavakis T, Li X (2010) Platelet-derived growth factor-DD targeting arrests pathological angiogenesis by modulating glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation. *J Biol Chem* 285:15500-15510.
- Kwiatkowski DJ (2003) Tuberous sclerosis: from tubers to mTOR. *Ann Hum Genet* 67:87-96.
- Kypta RM, Goldberg Y, Ulug ET, Courtneidge SA (1990) Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases. *Cell* 62:481-492.
- Laurendeau I, Ferrer M, Garrido D, D'Haene N, Ciavarelli P, Basso A, Vidaud M, Bieche I, Salmon I, Szijan I (2010) Gene expression profiling of the hedgehog signaling pathway in human meningiomas. *Mol Med* 16:262-270.
- Lederle W, Stark HJ, Skobe M, Fusenig NE, Mueller MM (2006) Platelet-derived growth factor-BB controls epithelial tumor phenotype by differential growth factor regulation in stromal cells. *Am J Pathol* 169:1767-1783.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246:1306-1309.

7. Literaturverzeichnis

- Levitzki A (2004) PDGF receptor kinase inhibitors for the treatment of PDGF driven diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:229-235.
- Li H, Fredriksson L, Li X, Eriksson U (2003) PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene* 22:1501-1510.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275:1943-1947.
- Li L, Blumenthal DK, Terry CM, He Y, Carlson ML, Cheung AK (2011) PDGF-induced proliferation in human arterial and venous smooth muscle cells: molecular basis for differential effects of PDGF isoforms. *J Cell Biochem* 112:289-298.
- Liu Q, Thoreen C, Wang J, Sabatini D, Gray NS (2009) mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery. *Drug Discov Today Ther Strateg* 6:47-55.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15:1311-1333.
- Mawrin C, Perry A (2010) Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* 99:379-391.
- Mawrin C, Sasse T, Kirches E, Kropf S, Schneider T, Grimm C, Pambor C, Vorwerk CK, Firsching R, Lendeckel U, Dietzmann K (2005) Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas. *Clin Cancer Res* 11:4074-4082.
- Maxwell M, Galanopoulos T, Hedley-Whyte ET, Black PM, Antoniades HN (1990) Human meningiomas co-express platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes and their protein products. *Int J Cancer* 46:16-21.
- Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM (2009) Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 27:2278-2287.
- Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P (1988) Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333:560-562.
- Ostman A (2004) PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:275-286.
- Pagotto U, Arzberger T, Hopfner U, Sauer J, Renner U, Newton CJ, Lange M, Uhl E, Weindl A, Stalla GK (1995) Expression and localization of endothelin-1 and endothelin receptors in human meningiomas. Evidence for a role in tumoral growth. *J Clin Invest* 96:2017-2025.
- Pawson T, Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278:2075-2080.
- Perry A, Louis DN, Scheithauer BW, Budka H, Von Deimling A (2007) Meningiomas. In: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4th Edition (Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds), pp 160 - 172. Lyon: IARC Press.
- Pietras K, Ostman A, Sjoquist M, Buchdunger E, Reed RK, Heldin CH, Rubin K (2001) Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* 61:2929-2934.
- Pietras K, Rubin K, Sjoblom T, Buchdunger E, Sjoquist M, Heldin CH, Ostman A (2002) Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* 62:5476-5484.
- Pietras K, Stumm M, Hubert M, Buchdunger E, Rubin K, Heldin CH, McSheehy P, Wartmann M, Ostman A (2003) STI571 enhances the therapeutic index of epothilone B by a tumor-selective increase of drug uptake. *Clin Cancer Res* 9:3779-3787.
- Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD (1988) Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 333:562-565.

7. Literaturverzeichnis

- Ragel BT, Jensen RL (2010) Aberrant signaling pathways in meningiomas. *J Neurooncol* 99:315-324.
- Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermarck B, Dubois-Dalcq M (1988) A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 53:309-319.
- Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G (2006) Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol* 5:1045-1054.
- Rini BI (2008) Temsirolimus, an inhibitor of mammalian target of rapamycin. *Clin Cancer Res* 14:1286-1290.
- Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Robson LE, Pierce GF (1992) Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet* 339:23-25.
- Rockhill J, Mrugala M, Chamberlain MC (2007) Intracranial meningiomas: an overview of diagnosis and treatment. *Neurosurg Focus* 23:E1.
- Rubin K, Tingstrom A, Hansson GK, Larsson E, Ronnstrand L, Klareskog L, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Fellstrom B, Terracio L (1988) Induction of B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesions. *Lancet* 1:1353-1356.
- Saal LH et al. (2008) Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nat Genet* 40:102-107.
- Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP (2008) Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 133:403-414.
- Saloner D, Uzelac A, Hetts S, Martin A, Dillon W (2010) Modern meningioma imaging techniques. *J Neurooncol* 99:333-340.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101.
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721-732.
- Shaw RJ, Cantley LC (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441:424-430.
- Shibuya M, Claesson-Welsh L (2006) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 312:549-560.
- Shrivastava RK, Segal S, Camins MB, Sen C, Post KD (2003) Harvey Cushing's Meningiomas text and the historical origin of resectability criteria for the anterior one third of the superior sagittal sinus. *J Neurosurg* 99:787-791.
- Stangl AP, Wellenreuther R, Lenartz D, Kraus JA, Menon AG, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A (1997) Clonality of multiple meningiomas. *J Neurosurg* 86:853-858.
- Su EJ, Fredriksson L, Geyer M, Folestad E, Cale J, Andrae J, Gao Y, Pietras K, Mann K, Yepes M, Strickland DK, Betsholtz C, Eriksson U, Lawrence DA (2008) Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med* 14:731-737.
- Surace EI, Lusa E, Murakami Y, Scheithauer BW, Perry A, Gutmann DH (2004) Loss of tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) expression in meningioma correlates with increased malignancy grade and reduced patient survival. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:1015-1027.
- Tallquist M, Kazlauskas A (2004) PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:205-213.
- Terracio L, Ronnstrand L, Tingstrom A, Rubin K, Claesson-Welsh L, Funa K, Heldin CH (1988) Induction of platelet-derived growth factor receptor expression in smooth muscle cells and fibroblasts upon tissue culturing. *J Cell Biol* 107:1947-1957.
- Tichomirowa MA, Theodoropoulou M, Daly AF, Yassouridis A, Hansen S, Lu J, Lange M, Goldbrunner RH, Stalla GK, Renner U (2008) Toll-like receptor-4 is expressed in meningiomas and mediates the antiproliferative action of paclitaxel. *Int J Cancer* 123:1956-1963.
- Torii S, Kurihara A, Li XY, Yasumoto K, Sogawa K (2011) Inhibitory effect of extracellular histidine on cobalt-induced HIF-1 α expression. *J Biochem* 149:171-176.

7. Literaturverzeichnis

- Tsai JC, Hsiao YY, Teng LJ, Shun CT, Chen CT, Goldman CK, Kao MC (1999) Regulation of vascular endothelial growth factor secretion in human meningioma cells. *J Formos Med Assoc* 98:111-117.
- Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22:267-272.
- Vernooij MW, Ikram MA, Tanghe HL, Vincent AJ, Hofman A, Krestin GP, Niessen WJ, Breteler MM, van der Lugt A (2007) Incidental findings on brain MRI in the general population. *N Engl J Med* 357:1821-1828.
- Wang D, Huang HJ, Kazlauskas A, Cavenee WK (1999) Induction of vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells by platelet-derived growth factor through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Res* 59:1464-1472.
- Wang JL, Nister M, Hermansson M, Westermark B, Ponten J (1990) Expression of PDGF beta-receptors in human meningioma cells. *Int J Cancer* 46:772-778.
- Waterfield MD, Scrace GT, Whittle N, Stroobant P, Johnsson A, Wasteson A, Westermark B, Heldin CH, Huang JS, Deuel TF (1983) Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature* 304:35-39.
- Wen PY, Quant E, Drappatz J, Beroukhi R, Norden AD (2010) Medical therapies for meningiomas. *J Neurooncol* 99:365-378.
- Whittle IR, Smith C, Navoo P, Collie D (2004) Meningiomas. *Lancet* 363:1535-1543.
- Wiemels J, Wrensch M, Claus EB (2010) Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol* 99:307-314.
- Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM (1997) Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 91:695-704.
- Wong TF, Takeda T, Li B, Tsuiji K, Kitamura M, Kondo A, Yaegashi N (2011) Curcumin disrupts uterine leiomyosarcoma cells through AKT-mTOR pathway inhibition. *Gynecol Oncol*.
- Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G, Lichter P (2005) Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer* 114:249-256.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471-484.
- Yang SY, Xu GM (2001) Expression of PDGF and its receptor as well as their relationship to proliferating activity and apoptosis of meningiomas in human meningiomas. *J Clin Neurosci* 8 Suppl 1:49-53.
- Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U, et al. (1986) Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 323:226-232.
- Yeh HJ, Ruit KG, Wang YX, Parks WC, Snider WD, Deuel TF (1991) PDGF A-chain gene is expressed by mammalian neurons during development and in maturity. *Cell* 64:209-216.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Direktor des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. F. Holsboer, und Herrn Prof. Dr. G. Stalla, dem Leiter der Arbeitsgruppe, für die Annahme als Doktoranden und die Möglichkeit, die experimentelle Arbeit durchführen zu können.

Insbesondere danke ich auch ganz herzlich Herrn Dr. U. Renner für die exzellente Betreuung, anregenden Diskussionen und ein stets offenes Ohr für meine endlosen Fragen.

Zudem bedanke ich mich bei Frau Dr. C. Onofri, Frau Dr. E. Correa de Santana, Frau Dr. M. Theodoropoulou, Herrn Dr. J. Monteserin Garcia, Frau Dr. M. Labeur und Frau B. Wölfel, welche mich die verschiedenen Methoden lehrten und jederzeit hilfsbereit und tatkräftig zur Seite standen.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und Herrn Dr. Arzberger vom Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Universität München sei ebenso für die Zusammenarbeit gedankt.