

Radiosensibilisierung humaner Tumorzelllinien unterschiedlicher
Entitäten durch den dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235
alleine oder in Kombination mit dem MEK-Inhibitor AZD6244:
Einfluss des Behandlungsschemas und der Hypoxie



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Kuger

aus Aschaffenburg, Deutschland

Würzburg, 2015

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter : Prof. Dr. Tcholpon Djuzenova

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Vladimir Soukhoroukov

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die klinische Radiobiologie.....	2
1.2	Onkogene Signalkaskaden und Radioresistenz	10
1.2.1	Der PI3K/Akt/mTOR Signalweg als Zielstruktur für die Radiosensibilisierung	11
1.2.2	Der MAPK Signalweg als Zielstruktur für die Radiosensibilisierung	14
1.3	Der Einfluss des Tumormikromilieus auf die Radioresistenz	17
1.4	Synergistische Effekte durch Inhibition multipler onkogener Signalkaskaden.....	19
2	Zielsetzung der Arbeit	23
3	Material und Methoden	26
3.1	Material.....	26
3.1.1	Zelllinien und Zellkultur.....	26
3.1.2	Kleinmolekulare Inhibitoren	28
3.1.3	Antikörper.....	29
3.1.4	Puffer und Reagenzien.....	31
3.1.4.1	Kolonietest	31
3.1.4.2	Proteinextraktion und Western blot.....	31
3.1.4.3	Durchflusszytometrie	35
3.1.5	Chemikalien und Labormaterialien	36
3.1.6	Laborgeräte.....	36
3.1.7	Software.....	38
3.2	Methoden	38
3.2.1	Behandlung mit kleinmolekularen Inhibitoren.....	38
3.2.2	Röntgenbestrahlung	39
3.2.3	Proliferationsassays	39
3.2.3.1	ATP-Assay	40

3.2.3.2	MTS-Assay.....	40
3.2.4	Koloniebildungstest	40
3.2.5	Proteindetektion.....	41
3.2.5.1	Zellysate und Kernextrakte	41
3.2.5.2	Western blot	42
3.2.5.3	Proteindetektion	42
3.2.6	Durchflusszytometrische Methoden	43
3.2.6.1	Zellzyklus und DSB Messungen	43
3.2.6.2	ROS Messung.....	44
3.2.7	Statistik.....	45
3.3	Experimente von Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe und Studenten	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Einfluss des Inhibitor/Bestrahlungsschemas auf die NVP-BEZ235 induzierte Radiosensibilisierung in humanen Glioblastomzelllinien.....	47
4.1.1	Effekt der PI3K/mTOR Inhibition auf die Zellproliferation	47
4.1.2	Einfluss von NVP-BEZ235 und Bestrahlung auf die Koloniebildungsfähigkeit	48
4.1.3	NVP-BEZ235 und bestrahlungsinduzierte Änderungen in der Expression von Proteinen der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade	50
4.1.4	Apoptoseinduktion durch Bestrahlung und NVP-BEZ235	56
4.1.5	Induktion und Abbau von DNS-Doppelstrangbrüchen	60
4.1.6	Effekte von NVP-BEZ235 und Bestrahlung auf den Zellzyklus	64
4.2	Radiosensibilisierung humaner Brustkrebszelllinien durch NVP-BEZ235 unter Hypoxie.....	70
4.2.1	Effekte von NVP-BEZ235 auf die Zellproliferation in normoxischen und hypoxischen Bedingungen.....	70
4.2.2	Einfluss der Sauerstoffkonzentration, NVP-BEZ235 und Bestrahlung auf die Koloniebildungsfähigkeit	71

4.2.3	NVP-BEZ235 induzierte Änderungen in der Expression von Proteinen der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade.....	75
4.2.4	Induktion der Apoptose und Autophagie durch NVP-BEZ235	78
4.2.5	Einfluss des Oxygenierungsstatus, dualer PI3K/mTOR Inhibition und Bestrahlung auf den Zellzyklus, die Induktion von ROS und die Induktion und Reparatur von DNS-Schäden	80
4.2.5.1	Zellzyklusalterationen durch NVP-BEZ235, Bestrahlung und den Oxygenierungsstatus.....	80
4.2.5.2	Induktion von ROS und die Induktion und Reparatur von DNS-Schäden nach NVP-BEZ235 Behandlung und Bestrahlung in verschiedenen Oxygenierungszuständen.....	85
4.3	Einfluss der simultanen Inhibition der PI3K/mTOR und MAPK Signalkaskaden auf die Strahlenantwort humaner Krebszellen	88
4.3.1	Einfluss von AZD6244 und NVP-BEZ235 auf die Zellproliferation.....	88
4.3.2	Effekte der MEK- und der dualen PI3K/mTOR-Inhibition auf die Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung	90
4.3.3	AZD6244- und NVP-BEZ235-induzierte Änderungen in der Expression von Proteinen onkogener Signalkaskaden	92
4.3.3.1	Änderungen in der MAPK Signalkaskade	92
4.3.3.2	Änderungen in der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade.....	94
4.3.4	Einfluss der MEK-, PI3K/mTOR-Inhibition und Bestrahlung auf den Zellzyklus	97
4.3.4.1	Durchflusszytometrische Untersuchungen des Zellzyklus	97
4.3.4.2	Untersuchungen zellzyklusregulatorischer Proteine mittels Western blot.....	105
4.3.5	Effekt von AZD6244, NVP-BEZ235 und Bestrahlung auf DNS-Schäden und Apoptose	110
4.3.5.1	Induktion und Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüchen.....	110
4.3.5.2	Effekte von AZD6244, NVP-BEZ235 und Bestrahlung auf die Apoptose	117

5	Diskussion	121
5.1	Einfluss des Behandlungsschemas auf die NVP-BEZ235 induzierte Radiosensibilisierung in humanen Glioblastomzelllinien.....	121
5.2	Radiosensibilisierung humaner Brustkrebszelllinien durch NVP-BEZ235 in pathophysiologisch relevanten Sauerstoffkonzentrationen.....	127
5.3	Einfluss der simultanen Inhibition der PI3K/mTOR und MAPK Signalkaskaden auf die Strahlenantwort humaner Krebszellen	134
6	Synopsis.....	141
6.1	Zusammenfassung	141
6.2	Summary.....	144
7	Abkürzungsverzeichnis	147
8	Abschlussarbeiten	150
9	Literaturverzeichnis	151
10	Abbildungsverzeichnis	166
11	Tabellenverzeichnis	168
	Danksagung	I
	Lebenslauf	II
	Publikationsliste	III
	Eidesstattliche Erklärung	V

1 EINLEITUNG

Das GLOBOCAN Projekt der Weltgesundheitsorganisation berichtet in seiner aktuellsten Ausgabe von weltweit 14,1 Millionen neu diagnostizierten Krebserkrankungen im Jahr 2012 und von 8,2 Millionen Patienten, die ihrem Krebsleiden im gleichen Zeitraum erlagen (Internetseite: „Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012“). Für Deutschland veröffentlichte das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts vergleichbare Häufigkeiten. So wurde in Deutschland 2010 eine Inzidenz von ca. 480.000 Fällen und eine Mortalität von ca. 220.000 Patienten verzeichnet (Internetseite: „Zentrum für Krebsregisterdaten“). Da die Wahrscheinlichkeit einer Krebserkrankung im Alter zunimmt, werden aufgrund des demografischen Wandels für 2030 in Deutschland eine Krebs-Inzidenz von ca. 600.000 und eine Krebs-Mortalität von ca. 290.000 Patienten prognostiziert (Internetseite: „Zentrum für Krebsregisterdaten“). Krebs ist somit nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland und wird auch in Zukunft eine der häufigsten Todesursachen bleiben (Internetseite: „Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis)“). Die Verbesserung der Diagnostik und der Therapie von Krebserkrankungen wird daher auch in naher Zukunft ein Forschungsfeld sein, welches das Leiden vieler Menschen heilen oder zumindest lindern kann.

Bei der Behandlung solider Tumore werden unter anderem die Lokalisation, die Tumorgroße, der Befall von Lymphknoten, das Auftreten von Metastasen sowie die molekularbiologische Charakterisierung der Tumorzellen berücksichtigt. Dabei soll die Therapie für jeden Patienten personalisiert festgelegt werden und aus einer oder mehreren der folgenden Behandlungsformen bestehen: Antihormontherapie, Immuntherapie, Hyperthermie, zielgerichtete Therapien mit Antikörpern oder Inhibitoren, Chemotherapie, (Radio-) Chirurgie, Behandlung mit Radiopharmaka und Strahlentherapie. Nach Informationen des deutschen Krebsforschungszentrums ist bei den meisten Krebserkrankungen eine chirurgische Entfernung des Tumors kombiniert mit Chemo- und/oder Strahlentherapie derzeit das Standardtherapieverfahren (Internetseite: „Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum“).

1.1 DIE KLINISCHE RADIOBIOLOGIE

Die Nutzung ionisierender Strahlen als Therapieform in der Medizin geht ursprünglich auf die Entdeckung Wilhelm Conrad Röntgens von „eine(r) neuen Art von Strahlen“ im Jahr 1895 in Würzburg zurück (Röntgen, 1896). Die von Röntgen entdeckten Strahlen (später in Röntgenstrahlen umbenannt) wurden bereits kurz nach ihrer Entdeckung Ende des 19. Jahrhunderts in der Therapie eingesetzt, wenn auch mit teils drastischen Nebenwirkungen wie z.B. Hautentzündungen, Haarausfall und dem Tod vieler Patienten und Röntgenärzte (Sansare u. a., 2011).

Heutzutage werden die Nebenwirkungen der Strahlentherapie durch verbesserte Techniken und Planung der Bestrahlung weitestgehend minimiert. So werden bei der heutigen Strahlentherapie Patienten exakt definierten Dosen von ionisierenden Strahlen ausgesetzt, wobei Applikationsdauer und -ort durch eine Bestrahlungsplanung im Vorfeld genau definiert sind. Hierdurch und durch den Einsatz neuer Bestrahlungsmethoden wie z.B. der bildgestützten, der konformalen oder der intensitätsmodulierten Strahlentherapie wird gewährleistet, dass es zu einer Maximierung des therapeutischen Nutzens und zu einer Minimierung der Nebenwirkungen kommt (Bucci u. a., 2005).

Der therapeutische Effekt von ionisierender Strahlung (IR) und ihre Fähigkeit, Tumorzellen zu schädigen beruht auf der Wechselwirkung der Strahlen und der damit verbundenen Energiedeposition mit Materie, wobei in Zellen insbesondere der Zellkern und die darin enthaltene DNS als wichtigste Zielstruktur identifiziert wurden (Munro, 1970). Nach heutigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass es sowohl direkte als auch indirekte Effekte der Bestrahlung auf biologische Makromoleküle gibt. Bei den direkten Effekten wird durch die Bestrahlung eine Schädigung biologischer Makromoleküle (z.B. DNS oder Proteine) direkt verursacht, wohingegen bei den indirekten Effekten ein Wassermolekül die Strahlenenergie absorbiert (Azzam u. a., 2012). Hierdurch kommt es zur Radiolyse des Wassers, wobei das Wassermolekül durch Radikalbildung zu einer reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) umgewandelt wird. Da diese Radikale äußerst reaktiv sind, interagieren sie mit Makromolekülen ihrer Umgebung (wie z.B. DNS, Proteinen und Lipiden) und induzieren somit ebenso molekulare Strahlenschäden. Bei der Wechselwirkung mit der DNS können hierbei verschiedene Schäden auftreten: Einzelstrangbrüche (single strand breaks - SSB), Doppelstrangbrüche (double strand breaks - DSB), Basenschäden (z.B. Oxidation von Basen) oder DNS-Protein-Vernetzungen (z.B. kovalente Bindung zwischen Histonproteinen und der DNS).

Je nach Schadenstyp an der DNS werden verschiedene Reparaturprogramme aktiviert. Hierbei wird bei Einzelstrangbrüchen und Basenschädigungen zwischen der Nukleotidexzisionsreparatur, der Basenexzisionsreparatur und der Basenfehlpaarungsreparatur unterschieden. Liegt als DNS-Schaden hingegen ein Doppelstrangbruch vor, so wird dieser durch ‚non-homologous end joining‘ (NHEJ) oder durch homologe Rekombination (HR) repariert (Hakem, 2008). Je nach Schwere der Strahlenschäden und nach Effizienz der Reparatur der DNS-Schäden sind, wie in Abbildung 1-1 dargestellt, verschiedene Szenarien für das weitere Schicksal der Zelle möglich: Waren die DNS-Schäden nur von geringem Ausmaß und die Reparatur effizient, überlebt die Zelle ohne bleibende Schäden. Waren die Schäden an der Erbsubstanz zu schwerwiegend und/oder die Reparatur fehlerhaft, so überlebt die Zelle entweder in einer mutierten Form oder sie stirbt ab (Shiloh, 2003).

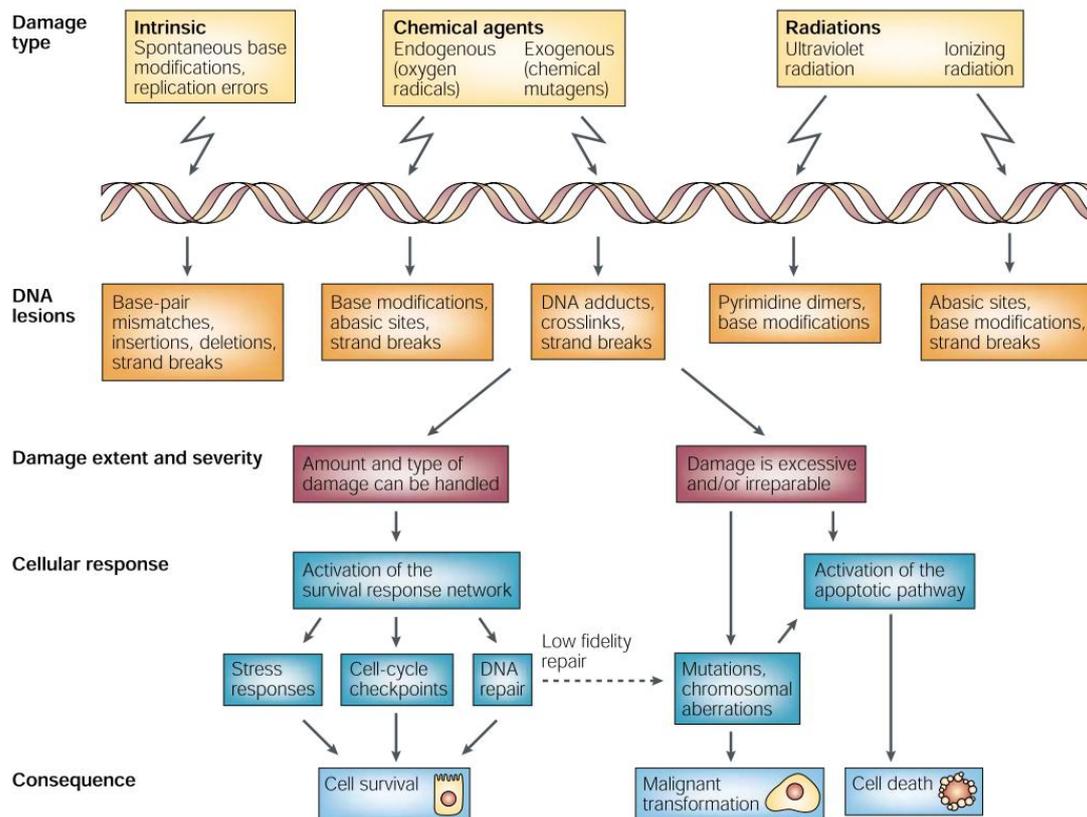


Abbildung 1-1 Zelluläre Antwort auf DNS-Schäden (Shiloh, 2003)

Die zelluläre Antwort nach DNS-Schäden hängt von verschiedenen Faktoren ab. So haben vor allem die Schwere und die Art der DNS-Schäden sowie die Reparatur einen großen Einfluss auf das Zellüberleben bzw. den Zelltod nach Bestrahlung.

Der genaue Ablauf der DNS-Schadensantwort („DNA damage response“ – DDR) ist ein hochkomplexer Prozess, der momentan intensiv erforscht wird. Nach heutigem Wissenstand spielen bei der Reparatur von strahlungsinduzierten Schäden insbesondere die

Proteine ‚Ataxia telangiectasia mutated‘ (ATM) und ‚Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein‘ (ATR) eine wichtige Rolle, da sie zu den DSB in der DNS rekrutiert werden und dort eine Vielzahl weiterer Proteine aktivieren (Hosoya & Miyagawa, 2014; Suk u. a., 2013). Eines der wichtigsten Ereignisse während der molekularen Antwort auf Strahlenschäden ist die Phosphorylierung des Serinrests 139 des Histons H2AX an der Stelle des DNS-Doppelstrangbruches durch ATM, ATR sowie durch die ‚DNA-dependent protein kinase‘ (DNA-PK) (Podhorecka u. a., 2010; Rogakou u. a., 1998).

Strahleninduzierte DSB in der DNS werden im Normalfall in humanen Zellen durch HR oder NHEJ repariert, welche in Abbildung 1-2 schematisch dargestellt sind (Hartlerode & Scully, 2009; Hosoya & Miyagawa, 2014). Bei der HR Reparatur wird ein DSB durch einen Proteinkomplex bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1 (MRN Komplex) erkannt und ATM wird zum Bruchpunkt rekrutiert. Die ATM Kinase rekrutiert und aktiviert wiederum weitere Proteine, durch welche der DNS-Doppelstrangbruch durch Ausbildung einer sogenannten Holliday-Struktur mit dem homologen Chromatid durch ‚crossing over‘ fehlerfrei repariert wird. Da hierfür eine DNS-Matrize von Nöten ist, ist die HR nur in Zellen möglich, in denen das homologe Schwesterchromatid nach der Zellteilung bereits wieder synthetisiert wurde, also in der (späten) S- und G2/M-Phase des Zellzyklus. Im Gegensatz hierzu kann ein DNS-Doppelstrangbruch grundsätzlich zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus durch den NHEJ Reparaturmechanismus repariert werden, da hierfür keine Vorlage notwendig ist. Bei der NHEJ Reparatur wird ein DSB durch ein Proteinheterodimer bestehend aus Ku70 und Ku80 erkannt und die DNA-PK wird rekrutiert und aktiviert. Unter Aktivierung weiterer Enzyme und Proteine werden die freien Enden der DNS beim NHEJ miteinander verknüpft, sodass ein intakter DNS-Doppelstrang entsteht. Da hierbei allerdings keine Matrize verwendet wird, kann es im Gegensatz zur HR zu Fehlern in der Basenabfolge kommen (Hartlerode & Scully, 2009; Lopez-Contreras & Fernandez-Capetillo, 2012; Schaeue & McBride, 2005; Suk u. a., 2013).

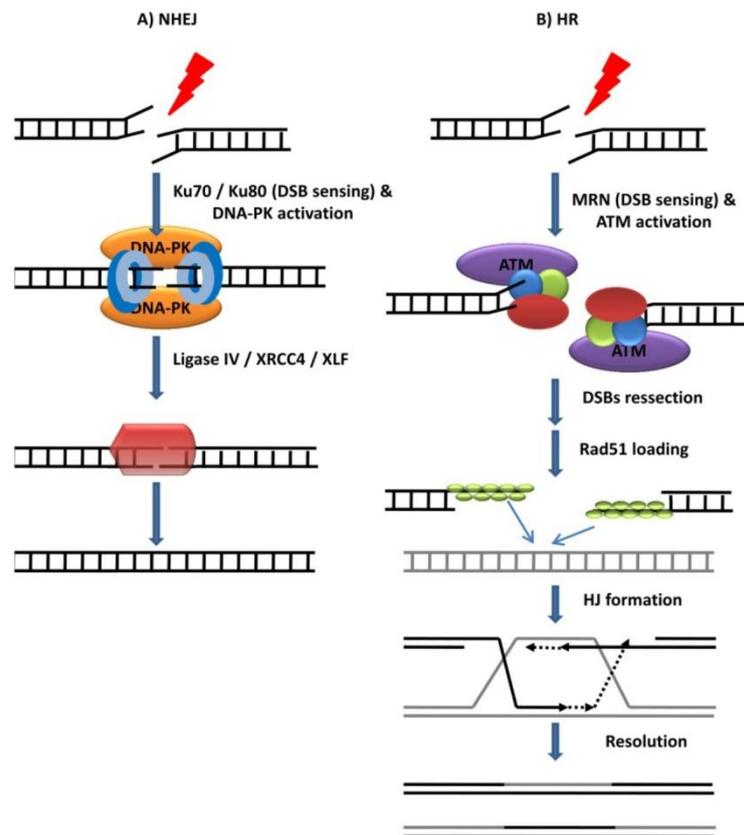


Abbildung 1-2 Reparaturmechanismen von DNS-Doppelstrangbrüchen (Lopez-Contreras & Fernandez-Capetillo, 2012)

Schematische Darstellung des NHEJ (A) und der HR (B) DNS-Reparatur. Beim NHEJ werden DSB durch das Heterodimer von Ku70 und Ku80 erkannt und die DNA-PK wird zum Bruchpunkt der DNS rekrutiert und aktiviert. Durch Aktivierung weiterer Enzyme und Proteine werden die freien Enden der DNS letztendlich verknüpft, sodass wieder ein intakter Doppelstrang entsteht. Bei der HR Reparatur wird der DSB durch den MRN Komplex erkannt und ATM wird zum Bruchpunkt rekrutiert und aktiviert. ATM phosphoryliert wiederum weitere Proteine und unter Ausbildung der Holliday-Struktur wird der fehlende Teil der DNS durch ‚crossing over‘ fehlerfrei neusynthetisiert.

Um zu verhindern, dass eine Zelle mit (strahleninduzierten) Schäden in der DNS den Zellzyklus durchläuft, gibt es mehrere Kontrollpunkte („checkpoints“), an denen der Zellzyklus bei bestehenden DNS-Schäden im Normalfall unterbrochen wird, bis die Reparatur der Schäden abgeschlossen ist (vgl. Abbildung 1-3). Der Arrest des Zellzyklus gewährt der Zelle somit die benötigte Zeit für die Reparatur, sodass keine DNS-Schäden an die Tochterzellen weitergegeben werden. Besonders wichtige Proteine bei der Regulation des Zellzyklus sind die cyclinabhängigen Kinasen sowie die ‚checkpoint‘ Kinasen. Diese sind durch die Proteine ATM und ATR reguliert, welche auch bei der Erkennung und Markierung von DNS-Schäden eine wichtige Rolle spielen und somit eine Verknüpfung der DNS-Reparatur mit der Blockade des Zellzyklus darstellen

(Hosoya & Miyagawa, 2014; Suk u. a., 2013). Wie in Abbildung 1-3 dargestellt, ist der Zellzyklusarrest am ‚G1-checkpoint‘ indirekt vom Tumorsuppressorprotein p53 abhängig. Da das Tumorsuppressorprotein somit eines der wichtigsten Kontrollproteine für DNS-Schäden und unkontrollierte Zellteilung ist, ist es nicht verwunderlich, dass das entsprechende Gen *TP53* in einer Vielzahl menschlicher Tumorzellen mutiert ist (Gasco u. a., 2002; Samuel u. a., 2002; Internetseite: „IARC TP53 Database“). In diesen Tumorzellen ist durch die fehlende Kontrolle am ‚G1-checkpoint‘ nach Schädigung der DNS (z.B. durch Bestrahlung) vermehrt ein Arrest am ‚G2/M-checkpoint‘ zu beobachten.

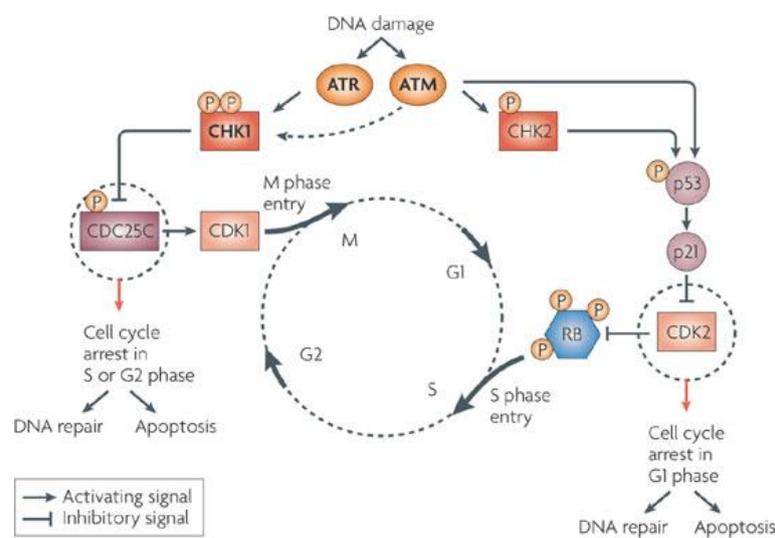


Abbildung 1-3 Checkpoints im Zellzyklus nach DNS-Schäden (Lapenna & Giordano, 2009)

Das Auftreten von DNS-Schäden z.B. nach Bestrahlung aktiviert die Kinasen ATR und ATM, welche wiederum die ‚checkpoint‘ Kinasen 1 und 2 durch Phosphorylierung aktivieren. Eine Aktivierung der CHK1 inhibiert die ‚cell division cycle 25C Phosphatase‘, wodurch die ‚cycline dependent kinase 1‘ (CDK1) dephosphoryliert wird und ein Zellzyklusarrest am ‚G2/M-checkpoint‘ induziert wird. Eine Aktivierung von ATM resultiert in einer Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53, welches indirekt durch p21 die ‚cycline dependent kinase 2‘ inhibiert. Diese verhindert die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb), welche für die G1/S Transition notwendig ist und induziert somit die Blockade des Zellzyklus. Durch diese Blockaden des Zellzyklus in der G1- oder G2/M-Phase können die bestehenden DNS-Schäden repariert werden, damit sichergestellt ist, dass die DNS-Schäden nicht an die Tochterzellen weitergegeben werden.

Werden die DNS-Schäden nicht vollständig durch die Reparaturmechanismen repariert, so sind verschiedene Mechanismen möglich, durch die die Zelle an der Reproduktion gehindert wird, wie in Abbildung 1-4 dargestellt. Sofern die Zellzykluskontrollproteine noch intakt sind, wird die Zelle in eine Art Ruhezustand, in die sogenannte Seneszenz versetzt (Lauber u. a., 2012; Sulli u. a., 2012). In diesem Zustand lebt die Zelle zwar noch, teilt sich allerdings nicht mehr weiter, wodurch eine Wiedergabe der fehlerhaften DNS an Tochterzellen ausgeschlossen ist. Phänotypisch ist die Seneszenz durch eine Aktivierung von CDK Inhibitoren wie $p16^{\text{INK4a}}$, $p21^{\text{Waf1}}$ und $p27^{\text{Kip1}}$ sowie einer Akti-

vierung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase charakterisiert (Eriksson & Stigbrand, 2010; Lauber u. a., 2012).

Eine weitere Möglichkeit, durch die verhindert wird, dass Fehler in der DNS weitergegeben werden, ist die Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose. Die Apoptose kann grundsätzlich intrinsisch oder extrinsisch ausgelöst werden. Beim intrinsischen Signalweg verändert sich die Aktivität von antiapoptotischen mitochondrialen Membranproteinen der Bcl-2 Familie, was eine Änderung des Mitochondrienpotentials induziert. Dies bedingt einen Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol, wodurch Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteasen (Caspasen) aktiviert werden, welche Proteine spezifisch nach einem Aspartatrest spalten. Bei der extrinsischen Apoptose, die auch als Rezeptor-vermittelte Apoptose bezeichnet wird, bindet ein Ligand an einen Transmembranrezeptor, wodurch intrazelluläre Proteine zum Rezeptor rekrutiert werden, welche wiederum die Caspasen aktivieren. In beiden Fällen kommt es durch die Caspasen zum kontrollierten Abbau der Zellbestandteile, wodurch die Zelle schrumpft und die Restbestandteile in Vesikel verpackt werden. Diese Vesikel werden anschließend durch Makrophagen über Phagozytose aufgenommen und somit wieder verwertet. Durch Fehler in der Apoptosekaskade sowie durch Apoptoseinduktion in vielen Zellen gleichzeitig, wodurch die Makrophagen mit dem Abbau der apoptotischen Vesikel überfordert sind, kann es durch Verlust der Plasmamembranintegrität apoptotischer Zellen zur Nekrose kommen.

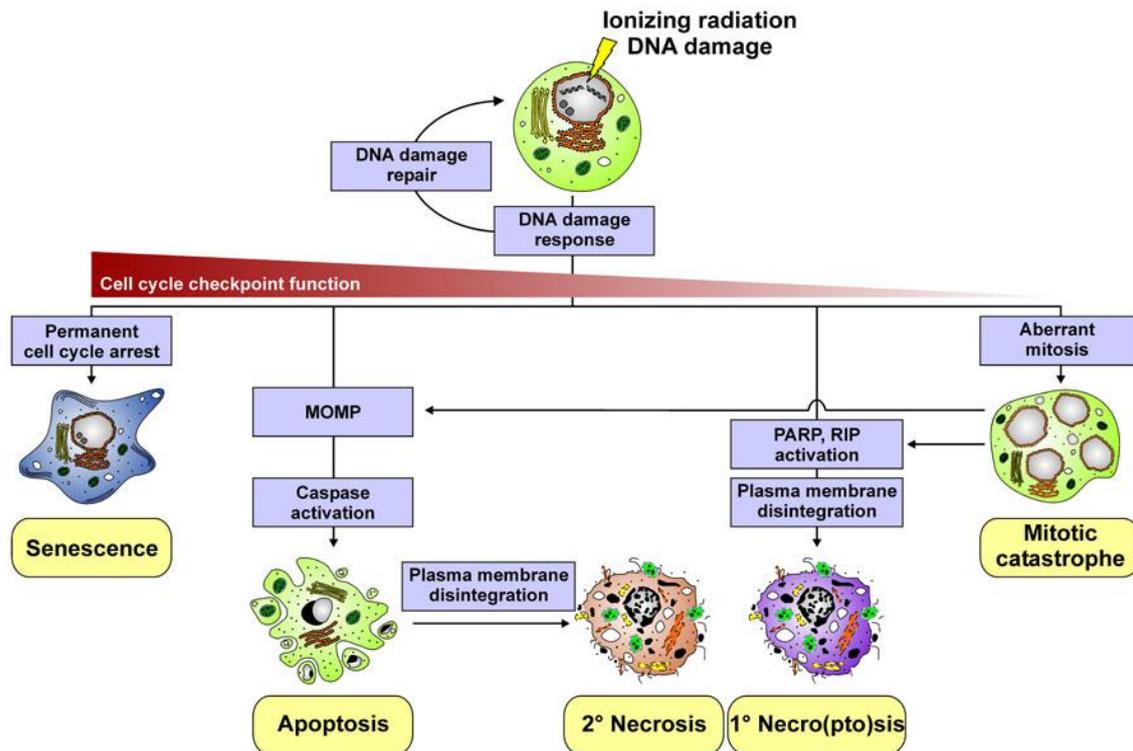


Abbildung 1-4 Mechanismen des Zelltods nach Bestrahlung (Lauber u. a., 2012)

Übersteigen die DNS-Schäden die Reparaturkapazitäten der geschädigten Zelle, so werden in Abhängigkeit der Funktionalität der Zellzyklus ‚checkpoint‘ Proteine verschiedene Formen des Zelltodes induziert. Je nachdem wie intakt die Regulation des Zellzyklusarrests nach Strahlenschäden ist, kann es zur Seneszenz, zur Apoptose, zur Nekrose oder zur mitotischen Katastrophe kommen.

Bei der Nekrose, welche nach Bestrahlung von Zellen, in denen die Apoptosekaskade dereguliert ist, eine wichtige Rolle spielt, werden die Zellbestandteile hingegen nicht kontrolliert proteolytisch – unter Schrumpfen der Zelle - abgebaut, sondern die Zelle schwillt an. Hierdurch geht letztendlich die Plasmamembranintegrität verloren und die Zelle platzt, wodurch sämtliche Zellbestandteile in die extrazelluläre Umgebung ausgeschüttet werden. Dies induziert eine Entzündungsreaktion in der Umgebung der nekrotischen Zelle (Edinger & Thompson, 2004; Formigli u. a., 2000; Peter, 2011). Da die Nekrose und die Apoptose manchmal nicht klar voneinander getrennt werden können und die Nekrose zum Teil auch kontrolliert ablaufen kann, wird auch des Öfteren von Aponekrose gesprochen (Formigli u. a., 2000; Peter, 2011).

Eine weitere Möglichkeit des Zelltodes ist die mitotische Katastrophe. Sie tritt vornehmlich in *TP53* mutierten Zellen auf, in denen aufgrund weiterer Mutationen weder ein Zellzyklusarrest noch eine Apoptose Reaktion durch bestehende DNS-Schäden ausgelöst wird (Eriksson & Stigbrand, 2010), weshalb die Zellen sich weiterhin teilen. Die mitotische Katastrophe wird hierbei durch einen verfrühten oder fehlerhaften Ablauf der Mitose verursacht, wobei nach der Kernteilung keine Zellteilung mehr stattfindet. Dies

resultiert in tetraploiden Zellen (Eriksson & Stigbrand, 2010), in welchen bei der nächsten Mitose die Apoptosekaskade aktiviert wird, wodurch die Zellen absterben (Rieder & Maiato, 2004; Weaver & Cleveland, 2005; Zhivotovsky & Kroemer, 2004).

Ein weiterer Mechanismus der mit dem Zelltod assoziiert ist, welcher allerdings auch kontrovers diskutiert wird, ist die Autophagie (Edinger & Thompson, 2004; Esteve & Knecht, 2011; Hippert u. a., 2006). Bei diesem Prozess, bei dem Teile der Zelle abgebaut werden, kann es sich sowohl um ein Rettungsprogramm, bei dem versucht wird Ressourcen einzusparen und wiederzuverwerten, oder um eine Art des kontrollierten Zelltodes der Zelle handeln (Hippert u. a., 2006). Wie in Abbildung 1-5 dargestellt, wird bei der Autophagie, welche z.B. nach Inhibition des ‚mammalian target of Rapamycin‘ (mTOR) Proteins induziert wird (Liu u. a., 2009a; Zhuang u. a., 2009) zunächst durch mehrere Proteine der ‚autophagy related protein‘ Familie und unter Umwandlung von LC3B-I zu LC3B-II die Phagophore gebildet. Die zu degradierenden Organellen werden von der Phagophore umschlossen, wodurch sich das Autophagosom bildet und ein Großteil der beteiligten ‚autophagy related protein‘ Proteine vom Autophagosom losgelöst werden (Herzog u. a., 2012). Durch Verschmelzung des Autophagosoms mit lysosomalen Vesikeln entsteht das Autolysosom und die darin enthaltenen Zellbestandteile werden durch lysosomale Hydrolasen abgebaut.

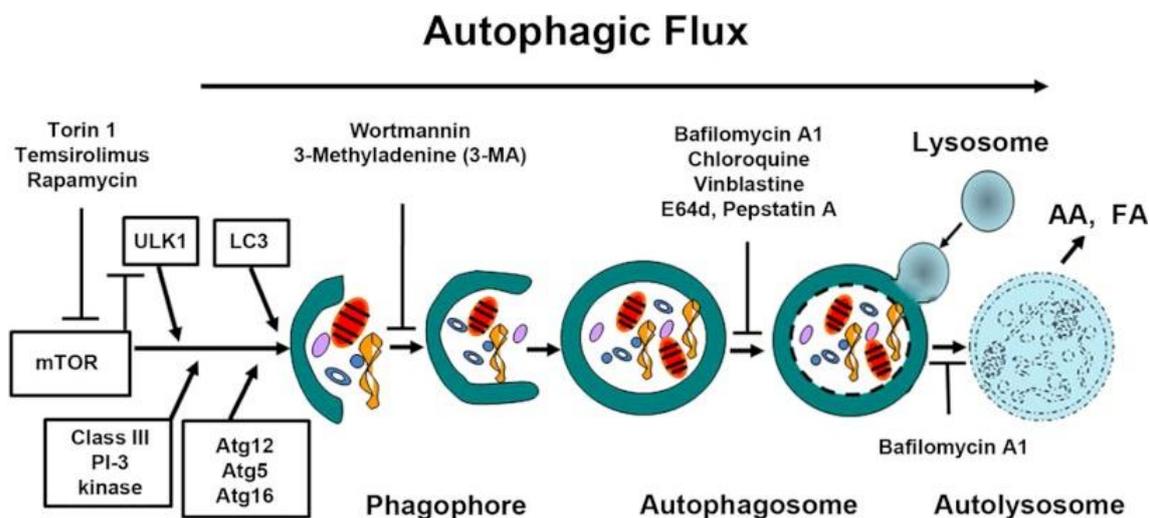


Abbildung 1-5 Autophagiemechanismus (Herzog u. a., 2012)

Nach der Induktion der Autophagie z.B. durch Inhibition der mTOR Kinase durch Rapamycin wird zunächst die Phagophore durch mehrere Proteine der Atg Familie und unter Umwandlung von LC3B-I zu LC3B-II gebildet. Die Phagophore umschließt die abzubauenen Organellen, wodurch das Autophagosom entsteht. Durch eine Verschmelzung mit einem Lysosom werden die Zellorganellen im Autolysosom abgebaut, wodurch die einzelnen Bestandteile dem zellulären Stoffwechsel wieder zur Verfügung stehen.

Die zuvor erwähnten Mechanismen der DNS-Reparatur und der verschiedenen Formen des Zelltodes sind in Tumorzellen häufig dereguliert und haben einen direkten Einfluss auf die Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Chemo- und Strahlentherapie (Ghobrial u. a., 2005; Helleday u. a., 2008; Yang u. a., 2011). Sie stellen somit vielversprechende molekulare Ziele dar, um die Wirksamkeit der Tumorbehandlung zu verbessern. Ebenfalls sind in einer Vielzahl von Tumorzellen onkogene Signalkaskaden mutiert und somit ebenfalls mit einer Resistenz gegenüber den Standardtherapieverfahren verknüpft.

1.2 ONKOGENE SIGNALKASKADEN UND RADIORESISTENZ

Die Transition normaler Zellen zu Tumorzellen ist zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt, wobei allerdings seit mehr als 20 Jahren belegt ist, dass bestimmte Gene in Tumorzellen besonders häufig mutiert sind (Croce, 2008; Di Lonardo u. a., 2015). Diese Gene werden daher auch als Tumorsuppressorgene oder Protoonkogene bezeichnet. Tumorsuppressorgene zeichnen sich dadurch aus, dass durch die Mutationen beider Allele ein Funktionsverlust des Gens induziert wird und ein Tumor entsteht. Bei einem Protoonkogen hingegen kann bereits die Mutation nur eines Allels zur einer Überaktivierung eines Proteins führen. Diese Tumorsuppressorgene und Protoonkogene spielen häufig eine sehr wichtige Rolle bei zellulären Signalkaskaden, wobei Tumorsuppressorgene häufig eine inhibierende und Protoonkogene häufig eine stimulierende Wirkung haben. Gemein ist beiden, dass durch ihre Mutation eine Fehlregulation zellulärer Signalkaskaden induziert wird (Croce, 2008; Garnett & Marais, 2004; Levine, 1993; Di Lonardo u. a., 2015), welche die Proliferation, die Proteinsynthese, den Zellzyklus und die DNS-Reparatur beeinflussen kann.

Abgesehen von ihrer Bedeutung bei der Tumorentstehung haben die fehlregulierten zellulären Signaltransduktionsmechanismen auch einen wichtigen Einfluss auf die Strahlensensitivität von Tumorzellen. So wurde in verschiedenen Tumorentitäten eine Korrelation der Radioresistenz mit der Aktivierung onkogener Signalkaskaden, wie z.B. der ‚stem cell factor-c-kit‘, der ‚Akt/GSK3 β /Cyclin D1/Cdk4‘, ‚der Januskinase-signal transducers and activators of transcription‘, der ‚epidermal growth factor receptor‘, der ‚mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase‘ (MAPK/Erk) oder der ‚phosphatidylinositole kinase/Akt/mammalian target of Rapamycin‘ (PI3K/Akt/mTOR) Signalkaskade, nachgewiesen (Chakravarti u. a., 2004; Dumont & Bischoff, 2012; Gupta u. a., 2001; Pérez-Losada u. a., 2003; Shimura u. a., 2011;

Skvortsova u. a., 2008). Insbesondere der PI3K/Akt/mTOR und der MAPK/Erk Signalweg spielen hierbei eine wichtige Rolle, da sie die mit am häufigsten deregulierten Signalkaskaden in humanen Tumoren sind (Bartholomeusz & Gonzalez-Angulo, 2012; Castellano & Downward, 2011; Dhillon u. a., 2007).

1.2.1 DER PI3K/AKT/MTOR SIGNALWEG ALS ZIELSTRUKTUR FÜR DIE RADIOSENSIBILISIERUNG

Der onkogene PI3K/Akt/mTOR Signalweg leitet, wie in Abbildung 1-6 schematisch und vereinfacht dargestellt, Wachstumssignale von außerhalb der Zelle in das Zellinnere weiter (Holmes, 2011). Durch die Bindung der Wachstumssignale an ein membranständiges Rezeptortyrosinkinasedimer wird PI3K an die Membran rekrutiert und aktiviert. Die p110 Untereinheit der PI3K phosphoryliert im Anschluss an die Aktivierung das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zum Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Diese Reaktion wird durch das Tumorsuppressorprotein ‚phosphatase and tensin homolog‘ (PTEN) gehemmt, da diese Phosphatase PIP₃ und PIP₂ dephosphoryliert. PTEN stellt somit den Gegenpart zur onkogenen PI3K dar (Cully u. a., 2006; Furnari u. a., 1997).

Die Bildung von PIP₃ führt über Aktivierung der ‚phosphoinositide-dependent protein kinase 1‘ letztendlich zu einer Phosphorylierung und somit zu einer Aktivierung der onkogenen Proteinkinase Akt (Paez & Sellers, 2003; Sansal & Sellers, 2004). Diese Kinase phosphoryliert wiederum eine Vielzahl von Proteinen, welche das Zellwachstum, die Proliferation, das Zellüberleben, den (Glukose-)Metabolismus sowie die Angiogenese stimulieren (Manning & Cantley, 2007). Besonders wichtig ist hierbei die Inhibition des ‚tuberus sclerosis complex‘ durch Akt, da dieser Komplex ein negativer Regulator der onkogenen mTOR Kinase ist (Koide u. a., 2011), wodurch Akt indirekt mTOR aktiviert.

Die mTOR Kinase fungiert in der Zelle hauptsächlich als Nährstoffsensor und reguliert den Metabolismus in Fällen von Nährstoffmangel, wie z.B. bei einer niedrigen Konzentration von Glukose oder Aminosäuren (Sansal & Sellers, 2004). In diesem Fall wird die mTOR Kinase aktiviert, wodurch die ribosomale S6-Kinase und das ‚translation initiation factor 4E binding protein‘ (4E-BP1) Translationsrepressorprotein phosphoryliert werden. Die ribosomale p70 S6-Kinase phosphoryliert wiederum die ribosomale protein S6 (S6) Untereinheit des Ribosoms, welche die Transkription beeinflusst, wobei

der genaue Mechanismus Gegenstand aktueller Forschung ist (Chen u. a., 2014; Ruvinsky & Meyuhas, 2006). Eine Phosphorylierung von 4E-BP1 resultiert in einer verminderten Affinität des Translationsrepressors an sein Zielprotein, den Translationsinitiationsfaktor 4E, was in einer Aktivierung der Proteintranslation und somit in gesteigerter Proteinbiosynthese und Proliferation resultiert (Martelli u. a., 2011; Wu & Zhou, 2007).

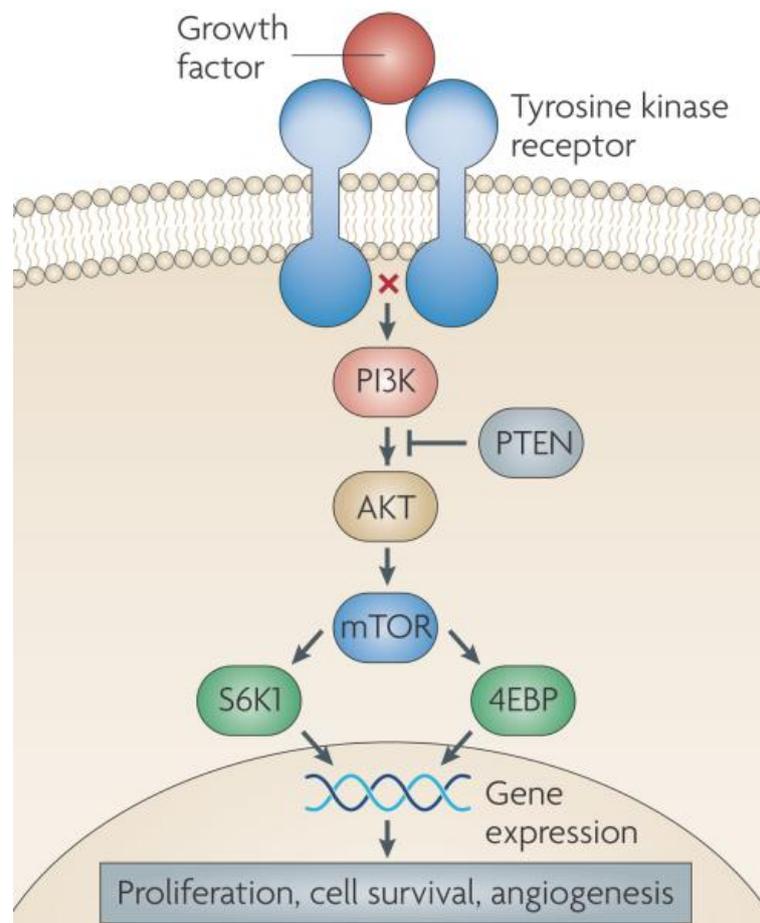


Abbildung 1-6 Schematische Darstellung der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade (Holmes, 2011)

Schematisch vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion im PI3K/Akt/mTOR Signalweg. Durch Bindung eines Liganden an eine membranständige Rezeptortyrosinkinase wird die PI3K zur Membran rekrutiert und aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von Akt, wobei die Phosphatase PTEN als Antagonist von PI3K wirkt. Eine Aktivierung von Akt resultiert in einer Stimulation von mTOR, was wiederum eine Aktivierung der S6K und 4EBP1 bewirkt, wodurch die Gen- und Proteinexpression geändert wird. Letztendlich resultiert dies in einer verstärkten Proliferationsrate, in einem besseren Zellüberleben und in Angiogenese.

Da der PI3K/Akt/mTOR Signalweg in vielen Tumorzellen überaktiviert und mit einer verstärkten Proliferation und Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie assoziiert ist (Bartholomeusz & Gonzalez-Angulo, 2012; Castaneda u. a., 2010; Dillon u. a., 2007), wird seit mehreren Jahren an Inhibitoren dieser onkogenen Signalkaskade geforscht (Engelman, 2009; Mattmann u. a., 2011). Erste Erfolge konn-

ten bereits bei alleiniger Behandlung mit Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR Signalweges als auch bei Kombination mit der Bestrahlung verzeichnet werden (Chen u. a., 2010; Kao u. a., 2007; Lee u. a., 2006; Zhang u. a., 2010). Diese Inhibitoren der ersten Generation richteten sich vornehmlich spezifisch gegen einzelne Schlüsselproteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges – so wurden z.B. LY294002 und Wortmannin eingesetzt, um die katalytische Untereinheit der PI3K Kinase zu blockieren (Gupta u. a., 2003; Lee u. a., 2006; Zhang u. a., 2010). Weitere Inhibitoren der Signalkaskade sind Rapamycin und seine Derivate wie Everolimus und Temsirolimus, die allerdings im Gegensatz zu LY294002 und Wortmannin den PI3K/Akt/mTOR Signalweg durch eine Blockade der Funktion von mTOR inhibieren (Battelli & Cho, 2011; Chen u. a., 2010).

Ein großer Nachteil der Inhibition einzelner Bestandteile des PI3K/Akt/mTOR Signalweges ist allerdings die Induktion einer negativen Rückkopplung. Durch diese Rückkopplung wird Akt vermehrt stimuliert, was paradoxerweise zu einem verbesserten Überleben der Tumorzelle nach Inhibition des Signalweges führt (Harrington u. a., 2005; Manning, 2004; Markman u. a., 2013; Wan u. a., 2006). Ein weiterer Nachteil für einige dieser ersten Inhibitoren der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade ist eine geringe Spezifität, Stabilität oder Löslichkeit in Wasser sowie starke Nebenwirkungen, wie z.B. Lethargie und Atemdepressionen im Mausmodell (Gupta u. a., 2003; Prevo u. a., 2008; Stein, 2001). Aus diesen Gründen wurden neue Inhibitoren mit verbesserter Spezifität und pharmakologischen Eigenschaften entwickelt, welche gleichzeitig mehrere Stellen des PI3K/Akt/mTOR Signalweges angreifen und so die Induktion eines Rückkopplungsmechanismus unterdrücken sollen.

Einer dieser dualen Inhibitoren ist das Imidazoquinolinderivat NVP-BEZ235 (vgl. Abbildung 3-1 A), welches eine hohe Spezifität gegenüber dem katalytischen Zentrum der PI3K und mTOR besitzt und so simultan beide Kinasen ATP-kompetitiv bei einer Konzentration im nanomolaren Bereich inhibiert (Maira u. a., 2008). Dies ist möglich, da die DNS-Sequenz der Kinasedomäne beider Proteine homolog und hochkonserviert ist und sich die beiden Kinasen somit in ihrem katalytischen Zentrum strukturell sehr ähneln (Sturgill & Hall, 2009). Der duale PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 zeigte bereits in ersten Versuchen eine sehr potente antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien (Chiarini u. a., 2010; Leung u. a., 2011; Manara u. a., 2010; Masuda u. a., 2011; Roper u. a., 2011). Allerdings wurde auch bei diesem dualen Inhibitor nach einer Behandlung von Leberkarzinomzelllinien mit den

dualen PI3K/mTOR Inhibitor ein zeitlich verzögerter Anstieg von p-Akt gemessen (Masuda u. a., 2011), was für die Aktivierung eines Rückkopplungsmechanismus durch NVP-BEZ235 spricht. Ebenso wurden in Bezug auf die Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235 unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht. So konnte eine synergistische Wirkung zwischen NVP-BEZ235 und IR in *in vitro* und *in vivo* Experimenten nachgewiesen werden, wenn NVP-BEZ235 kurz vor der Bestrahlung zugegeben wurde und für 24 h nach der Bestrahlung beibehalten wurde (Azad u. a., 2011; Fokas u. a., 2012a; Konstantinidou u. a., 2009; Mukherjee u. a., 2012; Potiron u. a., 2013; Zhu u. a., 2013). Im Gegensatz hierzu wurde keine Radiosensibilisierung in Kehlkopf- und Blasen-tumorzelllinien festgestellt, wenn diese 6 h vor Bestrahlung für eine Gesamtdauer von 18 h mit NVP-BEZ235 behandelt wurden (Fokas u. a., 2012b).

Da die Ergebnisse bezüglich einer Radiosensibilisierung nicht einheitlich waren und erste Ergebnisse einen Bezug der Radiosensibilisierung zur zeitlichen Abfolge der Behandlung und der Bestrahlung implizierten (Fokas u. a., 2012b), wurde in einem Teilprojekt dieser Arbeit der Aspekt der zeitlichen Abfolge von Bestrahlung und Behandlung im Hinblick auf die Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235 untersucht.

1.2.2 DER MAPK SIGNALWEG ALS ZIELSTRUKTUR FÜR DIE RADIOSENSIBILISIERUNG

Wie der PI3K/Akt/mTOR Signalweg ist auch der MAPK/Erk Signalweg in humanen Tumorzellen häufig mutiert und mit einer erhöhten Proliferation und Resistenz gegenüber Zytostatika assoziiert (Akinleye u. a., 2013; Dhillon u. a., 2007; Gupta u. a., 2001; Munshi & Ramesh, 2013). Weiterhin wird auch beim MAPK/Erk Signalweg, wie in Abbildung 1-7 schematisch und vereinfacht dargestellt, das extrazelluläre Wachstumssignal eines Mitogens ins Zellinnere weitergeleitet, welches dort eine Änderung der Expression von bestimmten Zielgenen bewirkt.

Durch Bindung des Mitogens an ein membranständiges Rezeptortyrosinkinasedimer wird die zytoplasmatische Kinasedomäne aktiviert und ein Rezeptortyrosinkinasedimer autophosphoryliert. Durch die phosphorylierten Tyrosinreste der Rezeptortyrosinkinasen kann das ‚growth factor receptor-bound protein 2‘ mit seiner ‚src homology 2‘ Domäne an die Kinase binden (Schulze u. a., 2005), wo es mit der GTPase ‚son of sevenless‘ einen Komplex bildet und diese aktiviert. Die aktivierte GTPase verursacht eine Konformationsänderung des ‚rat sarcoma‘ (Ras) Proteins, wodurch GDP von Ras dissoziiert und GTP an Ras gebunden wird (Chin, 2003). Dieses an GTP gebundene und

somit aktivierte Ras induziert die Phosphorylierung des ‚rapidly accelerated fibrosarcoma‘ (Raf) Proteins, wodurch das Signal von der Membran ins Zellinnere weitergeleitet und amplifiziert wird (Cooper, 2000).

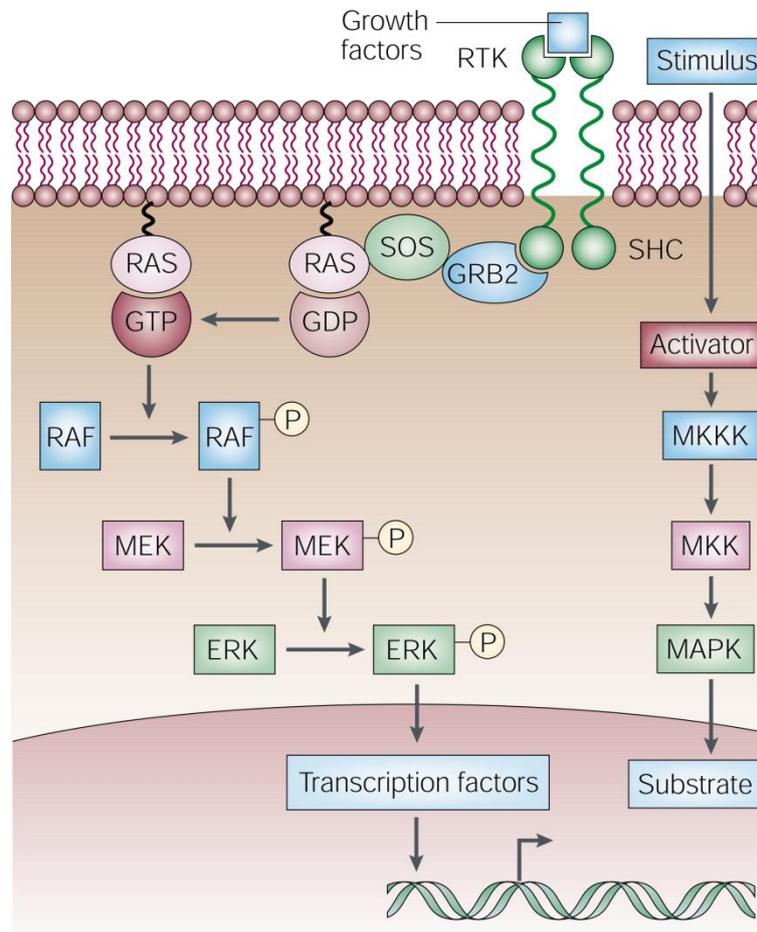


Abbildung 1-7 Schematische Darstellung der MAPK/Erk Signalkaskade (Chin, 2003)

Vereinfachte schematische Darstellung der Signaltransduktion im MAPK/Erk Signalweg. Durch Bindung eines Liganden an eine membranständige Rezeptortyrosinkinase wird Ras aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von Raf, welches wiederum MEK phosphoryliert. Das phosphorylierte und somit aktivierte MEK Protein phosphoryliert Erk, was wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren beeinflusst, wodurch die Genexpression geändert wird.

Die phosphorylierte Raf Kinase aktiviert im Anschluss durch Phosphorylierung die ‚mitogen activated ERK kinase‘ (MEK), welche auch als ‚mitogen-activated protein kinase kinase‘ bekannt ist. Die phosphorylierte MEK Kinase aktiviert wiederum Erk durch Phosphorylierung des Threonin-Glutaminsäure-Tyrosin Motives, wodurch p-Erk im Zellkern akkumuliert und die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. von Myc, Jun und ‚cAMP response element-binding protein‘ reguliert (Caunt & McArdle, 2012; Chang u. a., 2003).

Da der MAPK/Erk Signalweg in ungefähr einem Drittel der untersuchten humanen Tumorerkrankungen dereguliert ist – meist durch Überfunktionsmutationen in Ras und Raf (Garnett & Marais, 2004) – und der Signalweg die Resistenz gegenüber zytotoxischen Behandlungen wie z.B. der Chemo- oder Strahlentherapie erhöht (Dhillon u. a., 2007; Ruan u. a., 2010; Sebolt-Leopold & Herrera, 2004), ist auch diese Signalkaskade ein vielversprechender Angriffspunkt, um Tumorzellen zu radiosensibilisieren. So wurde in mehreren präklinischen Studien nachgewiesen, dass eine Inhibition der MAPK/Erk Signalkaskade mit dem oral verfügbaren MEK-Inhibitor CI-1040 mit einer Erniedrigung der Proliferation und einer Erhöhung der Strahlensensitivität korrelierte (Allen u. a., 2003; Sambade u. a., 2009; Sebolt-Leopold u. a., 1999). Leider konnten die vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse von CI-1040 in einer Phase II Studie trotz einer guten Verträglichkeit nicht belegt werden, da der MEK Inhibitor ungenügende antiproliferative Aktivität zeigte, weshalb weitere Inhibitoren der MAPK/Erk Signalkaskade mit verbesserten pharmakologischen und pharmazeutischen Eigenschaften entwickelt wurden (Rinehart u. a., 2004).

Einer dieser MAPK/Erk Signalkaskaden Inhibitoren der zweiten Generation ist AZD6244 (Yeh u. a., 2007), welches unter dem Namen Selumetinib bereits in mehreren klinischen Studien getestet wird (Internetseite: „Search of: Selumetinib - List Results - ClinicalTrials.gov“). Anders als beim zuvor erwähnten PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BE235 ist AZD6244 kein ATP-kompetitiver, sondern ein allosterischer Inhibitor. Dies bedeutet, dass AZD6244 nicht direkt unter Verdrängung von ATP an die Kinasedomäne von MEK, sondern in einer regulatorischen Domäne bindet. Hierdurch wird eine Konformationsänderung induziert, welche letztendlich die Kinasefunktion inhibiert (Zhang u. a., 2009). Da diese regulatorischen Domänen häufig einzigartig sind und kaum Homologien zwischen verschiedenen Proteinen aufweisen, haben allosterische Inhibitoren häufig eine deutlich höhere Spezifität als ATP-kompetitive Inhibitoren (Zhang u. a., 2009). So wurde für AZD6244 mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration gegenüber isolierter MEK von ca. 14 nM ein nanomolarer Wirkungsbereich festgestellt, wobei bei dieser Konzentration kaum eine Inhibition anderer Kinasen gemessen wurde (Yeh u. a., 2007).

Abgesehen von der zytostatischen Wirkung im nanomolaren Bereich wurde, wie auch für die MAPK/Erk Signalweg Inhibitoren der ersten Generation (Sambade u. a., 2009), für AZD6244 eine radiosensibilisierende Wirkung nachgewiesen (Chung u. a., 2009,

2013; Shannon u. a., 2009). Da in Tumorzellen häufig auch mehrere onkogene Signalkaskaden parallel aktiviert sind, wurde in einem Teilprojekt dieser Arbeit untersucht (vgl. Kapitel 1.4), ob durch eine simultane Inhibition des MAPK/Erk und des PI3K/Akt/mTOR Signalweges synergistische Effekte in Bezug auf die Strahlenempfindlichkeit humaner Tumorzelllinien nachweisbar sind.

1.3 DER EINFLUSS DES TUMORMIKROMILIEUS AUF DIE RADIORESISTENZ

Wie bereits zuvor im Kapitel 1.2 erwähnt, ist die intrinsische Radioresistenz von Tumorzellen unter anderem durch die Aktivität onkogener Signalkaskaden bedingt und kann somit durch den Einsatz von Inhibitoren dieser Signalkaskaden moduliert werden. Ein weiterer Faktor, welcher die Reaktion und somit das Überleben von Zellen nach Strahlenexposition beeinflussen kann, ist die Mikroumgebung der Tumorzellen (Jamal u. a., 2010; Vaupel, 2004). Diese unterscheidet sich immens vom Mikromilieu in Normalgewebe, da aufgrund der unkontrollierten Angiogenese ein Teil der Tumorzellen schlecht mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird und weiterhin der Abtransport von Stoffwechselprodukten und CO_2 erschwert ist (Trédan u. a., 2007). Wie in Abbildung 1-8 schematisch dargestellt, gibt es somit verschiedene Areale in soliden Tumoren. So existieren Bereiche in der Nähe eines Blutgefäßes, welche sehr gut mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt sind und einen normalen pH-Wert aufweisen. Diese normoxischen Tumorzellen weisen in der Regel eine hohe Proliferationsrate auf, weshalb sie relativ gut mit Chemotherapeutika und Strahlentherapie behandelbar sind.

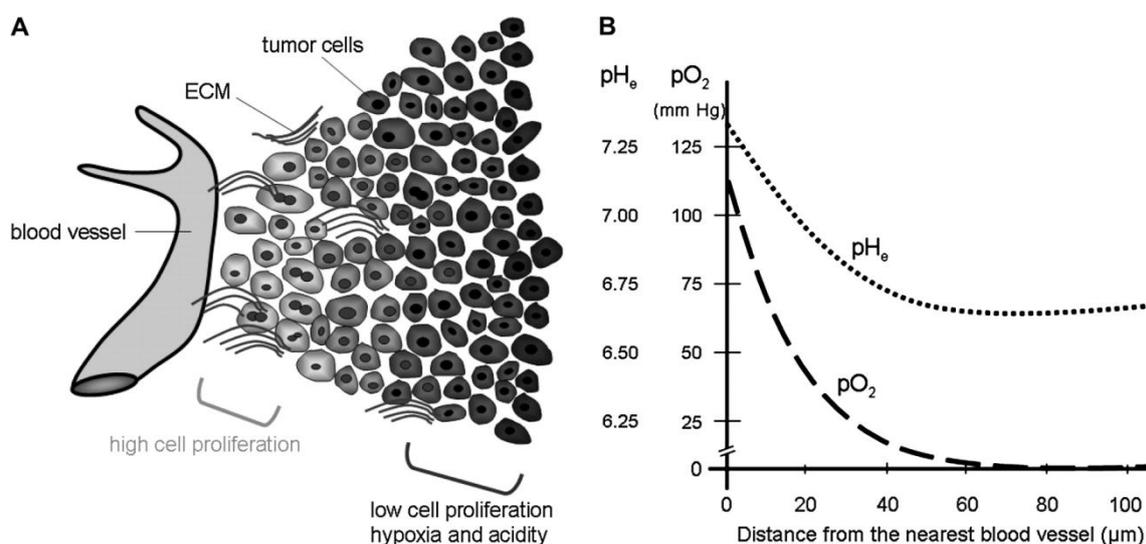


Abbildung 1-8 Tumormikroumgebung in Abhängigkeit der Distanz zu Blutgefäßen (Trédan u. a., 2007)

Schematische Darstellung der Tumormikroumgebung (A) sowie des Sauerstoffpartialdruckes (gestrichelte Linie) und des pH-Wertes (gepunktete Linie) (B) in Abhängigkeit von der Distanz zu einem Blutgefäß. Allerdings existieren aufgrund der unkontrollierten Angiogenese auch Bereiche mit schlechter Versorgung. So sinkt mit steigendem Abstand zum Blutgefäß in soliden Tumoren, wie in Abbildung 1-8 dargestellt, der Sauerstoffpartialdruck und der pH-Wert (Trédan u. a., 2007; Vaupel, 2004), wodurch Bereiche mit hypoxischen Zellen entstehen, welche deutlich schlechter auf eine Chemo- und/oder Strahlentherapie ansprechen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass eine Einteilung in normoxische und hypoxische Bereiche zu grob ist, da es unterschiedlich starke Ausprägungen der Hypoxie gibt. So beträgt der mediane Sauerstoffpartialdruck gemäß einer Studie von Vaupel et al. in normalem Brustgewebe 65 mm Hg, wohingegen in Brustkrebsgewebe lediglich ein medianer Sauerstoffpartialdruck von 30 mm Hg gemessen wurde (Vaupel u. a., 1991). Wie bereits erwähnt, muss hierbei allerdings beachtet werden, dass die Sauerstoffkonzentration in den gemessenen hypoxischen Bereichen sehr heterogen war, wobei die größte hypoxische Untergruppe einen Sauerstoffpartialdruck von ca. 5-7,5 mm Hg zeigte (Vaupel u. a., 1991).

Abgesehen von der unterschiedlichen Ausprägung der hypoxischen Bereiche in Bezug auf die Sauerstoffkonzentrationen existieren in soliden Tumoren ebenfalls Bereiche, welche nur zeitweise hypoxisch sind. Im Allgemeinen kann man zwischen drei verschiedenen Zellpopulationen unterscheiden, welche aufgrund von Veränderungen im mikroregionalen Blutfluss entstehen: normoxische Zellen, die aufgrund ihrer Nähe zum vaskulären System ständig gut mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt sind, Zellen die einer vorübergehenden Hypoxie ausgesetzt sind und chronisch hypoxische Zellen (Bristow & Hill, 2008; Meijer u. a., 2012; Pigott u. a., 1996). Abgesehen von den Veränderungen im mikroregionalen Blutfluss tritt eine Reoxygenierung von Tumorzellen auch häufig nach einer Bestrahlung auf, da die normoxischen schnell proliferierenden Zellen durch die Bestrahlung absterben, wodurch die hypoxischen Zellen wieder besser mit Sauerstoff versorgt werden (Pajonk u. a., 2010). Diese normoxischen, reoxygenierten und hypoxischen Bereiche sind von besonderem Interesse, da diese drei Untergruppen verschiedene Sensitivitäten gegenüber einer Chemo- oder Strahlentherapie haben, weshalb sie alle berücksichtigt werden sollten, wenn die Effizienz neuer Therapeutika beurteilt werden soll (Iizuka u. a., 1997; Pajonk u. a., 2010; Urano u. a., 2012). Insbesondere die hypoxischen Bereiche eines soliden Tumors, wie sie z. B. in 40 % aller Brustkrebstumoren vorkommen (Ward u. a., 2013), weisen deutliche Änderungen in der

Expression proliferativer Gene, verringerte Apoptoseraten sowie eine erhöhte Invasivität, ein erhöhtes Metastasierungspotential und genomische Instabilität auf (Chaudary & Hill, 2006; Wilson & Hay, 2011).

Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die durch Hypoxie bedingten Veränderungen der Strahlensensitivität mit dem PI3K/Akt/mTOR Signalweg verflochten sind (Cam & Houghton, 2011; Knaup u. a., 2009; Wang & Ohh, 2010). Dies klassifiziert diese Signalkaskade zu einem vielversprechenden Ziel für Radiosensibilisatoren unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. So wurde bereits für den dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 gezeigt, dass dieser Prostata- und Hypopharynxkarzinomzellen unter normoxischen und extrem hypoxischen Bedingungen radiosensibilisiert (Fokas u. a., 2012a; Potiron u. a., 2013). Da die zuvor genannten Studien die radiosensibilisierende Fähigkeit von NVP-BEZ235 unter sehr harschen hypoxischen Bedingungen belegten und zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit keine Daten bezüglich einer Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235 in milder Hypoxie, wie sie beim humanen Mammakarzinom vorkommt, publiziert waren, wurde in einem Teilprojekt dieser Arbeit untersucht, ob NVP-BEZ235 normoxische, nach Bestrahlung reoxygenierte und hypoxische humane Brustkrebszellen radiosensibilisiert.

1.4 SYNERGISTISCHE EFFEKTE DURCH INHIBITION MULTIPLER ONKOGENER SIGNALKASKADEN

Wie schon im Kapitel 1.2 erwähnt, ist die Inhibition onkogener Signalkaskaden bereits seit über einem Jahrzehnt ein Ansatzpunkt, um die Tumorkontrolle und somit den Therapieerfolg zu verbessern. Die klinische Effektivität der Inhibition onkogener Signalkaskaden wurde in verschiedenen Studien in Tumorgruppen, die alle auf einer Fehlregulation eines einzelnen Signalweges beruhten, eindrucksvoll unter Beweis gestellt (Druker u. a., 2001, 2006; Heinrich u. a., 2003). In einer Vielzahl von Tumoren hingegen, die Fehlregulationen in mehreren Signalkaskaden aufweisen, bewirkte die Inhibition einer Signalkaskade lediglich geringe Verbesserungen des Therapieerfolges, weshalb vermehrt die kombinierte Inhibition mehrerer Signalkaskaden in Betracht gezogen wurde (Knight u. a., 2010). Insbesondere die PI3K/Akt/mTOR und die MAPK/Erk Signalkaskade stellen attraktive Zielstrukturen dar, da sie zu den am häufigsten mutierten Signalwegen in humanen Tumorerkrankungen gehören (Engelman, 2009; Sebolt-Leopold & Herrera, 2004). Weiterhin beeinflussen sie direkt die Proliferation, das Zellwachstum,

das Überleben und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Strahlung und Chemotherapeutika (Bartholomeusz & Gonzalez-Angulo, 2012; Garnett & Marais, 2004; Williams u. a., 2012).

Wie von Rexer et al beschrieben und in Abbildung 1-9 schematisch dargestellt, bewirkt die Inhibition des PI3K/Akt/mTOR oder des MAPK/Erk Signalweges in Zellen, in denen beide Signalkaskaden aktiviert sind, die Aktivierung des jeweils anderen Signalweges (Rexer u. a., 2009). Die Tumorzellen kompensieren demnach die Inhibition eines Signalweges und überleben die Behandlung mit dem Signalweginhibitor. Werden hingegen beide Signalwege simultan inhibiert, so kann diese Kompensation nicht mehr stattfinden, weshalb es zu einem Proliferationsstopp kommt.

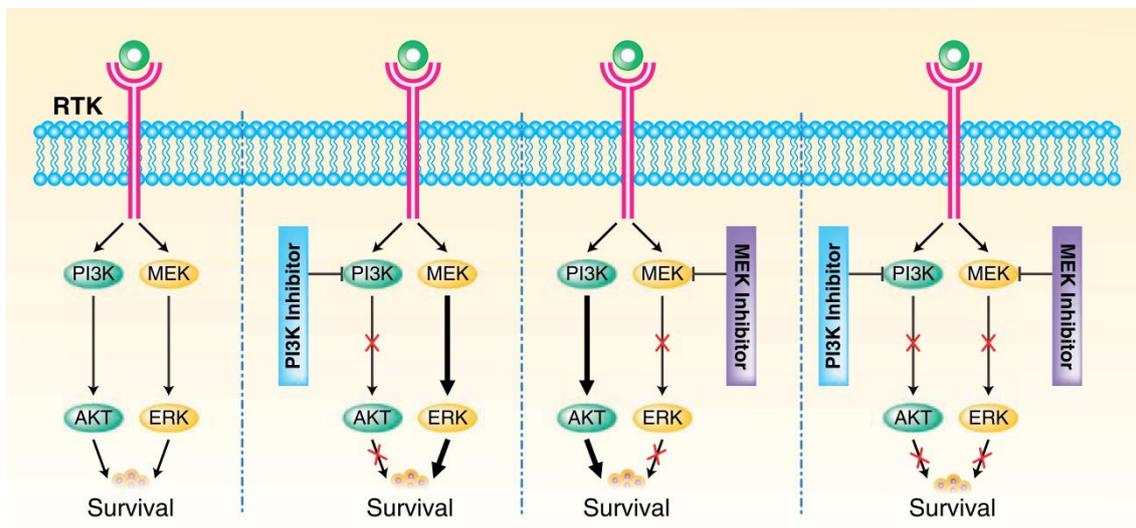


Abbildung 1-9 Duale Inhibition onkogener Signalkaskaden (Rexer u. a., 2009)

Schematische Darstellung der Inhibition onkogener Signalkaskaden in Krebszellen, in denen der PI3K/Akt/mTOR und der MAPK/Erk Signalweg aktiviert sind. Durch Bindung eines Wachstumsfaktors an eine RTK werden die beiden proliferativen Signalkaskaden aktiviert. Wird nun eine der beiden Signalkaskaden inhibiert, so kann das Wachstumssignal über die jeweils andere Signalkaskade weitergegeben werden, weshalb die Zellen weiter proliferieren. Werden beide Signaltransduktionsmechanismen simultan inhibiert, führt dies zu einer Unterbrechung des Wachstumssignals, wodurch die Proliferation gestoppt wird.

Die Kombination der simultanen Inhibition des PI3K/Akt/mTOR und des MAPK Signalweges überzeugte bereits in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien, da die Behandlung mit Inhibitoren beider Signalkaskaden die besseren Resultate zeigte als die Inhibition nur eines Signalweges (Britten, 2013; Guenther u. a., 2013; Renshaw u. a., 2013; Watson u. a., 2014). Die synergistischen Effekte der Inhibition beider Signalkaskaden beruhen zum einen auf der Unterdrückung der Aktivierung von Rückkopplungsmechanismen (Castellano & Downward, 2011; Grant, 2008), zum anderen stimulieren und inhibieren sich der PI3K/Akt/mTOR und der MAPK/Erk Signalweg an mehreren

Stellen gegenseitig (Aksamitiene u. a., 2012; Gadgeel & Wozniak, 2013; Guenther u. a., 2013; Jahangiri & Weiss, 2013; Mendoza u. a., 2011). Ein vereinfachtes putatives schematisches Interaktionsnetzwerk der beiden Signalkaskaden, beruhend auf den Daten der zuvor genannten Publikationen (Aksamitiene u. a., 2012; Fritsche-Guenther u. a., 2011; Grant, 2008; Jahangiri & Weiss, 2013; Mendoza u. a., 2011), ist in Abbildung 1-10 dargestellt. Durch eine Rezeptortyrosinkinase, wie z.B. der ‚epidermal growth factor receptor‘, wird ein Wachstumssignal ins Innere der Zelle weitergegeben, wo sie die entsprechende Signalkaskade aktiviert. Die Weitergabe des Signals resultiert letztendlich in einer erhöhten Proliferationsrate, gesteigertem Zellwachstum und erhöhter Widerstandskraft gegenüber zytotoxischen Agenzien oder einer Behandlung mit IR.

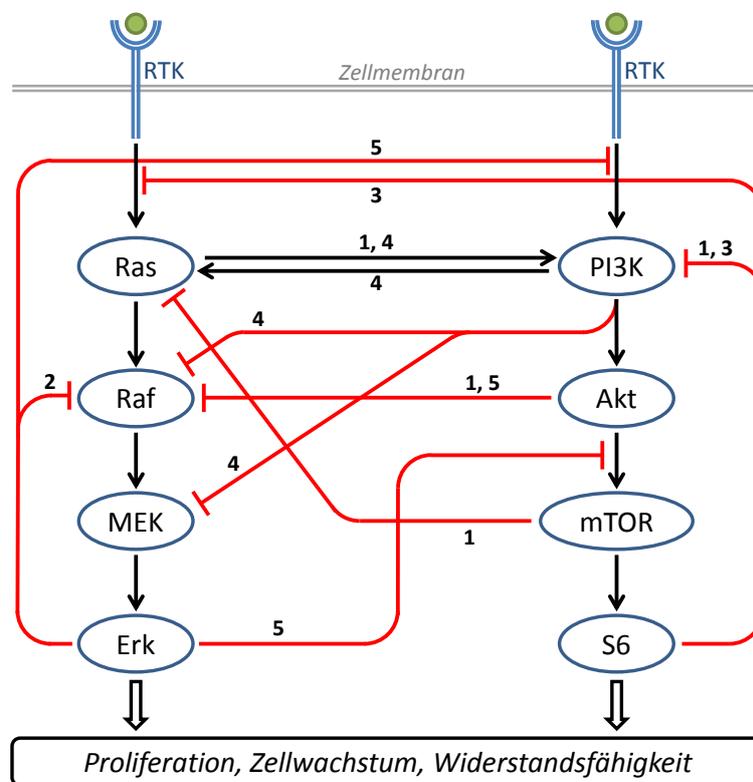


Abbildung 1-10 Putatives Interaktionsnetzwerk der MAPK und der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskaden

Ausgehend von den publizierten Daten verschiedener Arbeitsgruppen wurde ein vereinfachtes putatives Interaktionsschema des onkogenen MAPK und PI3K/Akt/mTOR Signalweges erstellt. Durch eine Rezeptortyrosinkinase wird ein Wachstumssignal ins Zellinnere weitergegeben, wo es anschließend durch die Signalkaskaden verarbeitet wird und letztendlich zu Proliferation, gesteigertem Zellwachstum und erhöhter Widerstandsfähigkeit führt. Die Zahlen geben die jeweilige Literaturquelle an, in der die Interaktion genannt wird: (1) Aksamitiene et al. 2012, (2) Fritsche-Guenther et al. 2011, (3) Grant 2008, (4) Jahangiri und Weiss 2013 und (5) Mendoza et al. 2011. Schwarze Linien symbolisieren eine Aktivierung, rote Linien eine Inhibition.

Wie bereits zuvor erwähnt, wurden bereits erste Versuche mit einer kombinierten Inhibition des MAPK/Erk und des PI3K/Akt/mTOR Signalweges erfolgreich durchgeführt.

Insbesondere eine Kombination des MEK Inhibitors AZD6244 und des dualen PI3K/Akt/mTOR Inhibitors NVP-BEZ235, welche beide bereits in klinischen Studien getestet werden (Internetseite: „Search of: BEZ235 - List Results - ClinicalTrials.gov“, Internetseite: „Search of: Selumetinib - List Results - ClinicalTrials.gov“), zeigte vielversprechende Resultate. So konnten Roberts et al. (Roberts u. a., 2012) in *in vivo* Xenograftexperimenten zeigen, dass eine Kombination dieser beiden Inhibitoren in *Ras*-bedingtem Melanoma als einzige der getesteten Behandlungen in einem signifikanten Rückgang des Tumors resultierte. Ebenso war in dieser Studie die mediane Überlebensdauer der mit Selumetinib und NVP-BEZ235 behandelten Tiere mit 64 Tagen deutlich höher als die der Kontrollgruppen. Eine synergistische Wirkung der beiden Inhibitoren wurden in weiteren *in vivo* Studien ebenfalls für kolorektale Karzinom- und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzellen beobachtet (E u. a., 2014; Qu u. a., 2014).

Eine Kombination von AZD6244 und NVP-BEZ235 zeigte, wie bereits erwähnt, eine synergistische Wirkung auf die Proliferation von Tumoren. Weiterhin ist bereits für beide Inhibitoren bekannt, dass diese eine radiosensibilisierende Wirkung in mehreren Zelllinien unterschiedlicher Entitäten haben (Chung u. a., 2009, 2013; Fokas u. a., 2012b; Potiron u. a., 2013; Shannon u. a., 2009). Da zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit allerdings noch keine Daten bezüglich einer Kombination von AZD6244 und NVP-BEZ235 mit Bestrahlung publiziert waren, wurde dieser Ansatz in einem Teilprojekt dieser Arbeit untersucht.

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Teilprojekte zur Strahlensensitivität in humanen Tumorzellen nach Inhibition der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade durch den dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 bearbeitet und dabei zentrale Fragestellungen beantwortet werden:

1. Untersuchung der Inhibitor-/Bestrahlungsschemata auf die NVP-BEZ235 induzierte Radiosensibilisierung in Glioblastomzelllinien. Hierzu sollten folgende Fragen bearbeitet werden:
 - Ist die Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235 vom Behandlungsschema abhängig?
 - Gibt es Unterschiede zwischen den vier getesteten Glioblastomzelllinien?
 - Was sind die molekularbiologischen Grundlagen für beobachtete Unterschiede zwischen den Behandlungsschemata und/oder den einzelnen Zelllinien?
2. Bedeutung der Sauerstoffkonzentrationen auf die NVP-BEZ235 induzierte Radiosensibilisierung in zwei humanen Mammakarzinomzelllinien. Bei diesem Teilprojekte sollten insbesondere folgende Aspekte untersucht werden:
 - Hat NVP-BEZ235 eine radiosensibilisierende Wirkung unter pathophysiologisch relevanten milden Hypoxie-Bedingungen?
 - Gibt es Unterschiede zwischen den getesteten Mammakarzinomzelllinien und auf welchen molekularbiologischen Grundlagen beruhen diese Unterschiede?
3. Untersuchung synergistischer Effekte durch simultane Inhibition des MAPK/Erk Signalweges durch AZD6244 und der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade durch NVP-BEZ235 auf die Strahlensensitivität in zwei humanen Tumorzelllinien. Hierbei sollten schwerpunktmäßig folgende zwei Fragestellungen beantwortet werden:
 - Bewirkt eine simultane Inhibition des MAPK/Erk Signalweges durch AZD6244 eine Verstärkung der NVP-BEZ235 induzierten Radiosensibilisierung?
 - Welchen Effekt hat die simultane Inhibition beider Signalkaskaden in den beiden untersuchten Zelllinien?

Um diese zentralen Fragestellungen beantworten zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Auswahl verschiedener humaner Tumorzelllinien verschiedener Entitäten (Glioblastom, Lungenkarzinom, Mammakarzinom) zellbiologisch und molekularbiologisch untersucht werden. Dabei sollten die Wirkstoffe NVP-BEZ235 und AZD6244 in den Zelllinien Modellen getestet und die Effekte in Kombination mit Bestrahlung aufgeklärt werden. Um die Effekte der Wirkstoffe zwischen den Zelllinien vergleichen zu können, sollten die zellbiologischen Auswirkungen unter Anwendung von Zellviabilitätstests, Koloniebildungstests, Zellzyklusanalysen sowie Western blot und durchflusszytometrische Analysen von Proteinen untersucht werden. Mit Hilfe von Western blot Untersuchungen zur Bestimmung von Schlüsselproteinen der einzelnen Signalwege sollte parallel dazu die Aktivierung bzw. Hemmung einzelner Komponenten dieser Signalwege aufgeklärt werden. Das übergeordnete Ziel dieser Teilprojekte war, die strahlensensibilisierenden Mechanismen bei gleichzeitiger Inhibition molekularer Signalwege durch NVP-BEZ235 und AZD6244 aufzuklären.

Um zu testen, ob das Behandlungsschema mit NVP-BEZ235 und der Bestrahlung einen Einfluss auf die NVP-BEZ235 induzierte Radiosensibilisierung hat, wurden in einem Teil dieser Arbeit zwei verschiedene Behandlungsschemata untersucht. Hierzu wurden vier Glioblastomzelllinien, die sich hinsichtlich ihres *PTEN* und *TP53* Status unterscheiden, entweder für 24 h vor der Bestrahlung oder für 1 h vor und nach der Bestrahlung mit NVP-BEZ235 behandelt und die Koloniebildungsfähigkeit festgestellt. Weiterhin wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung der DNS-Gehalt der Zellen, die Induktion und der Abbau von DNS-Schäden sowie die Expression relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, der Apoptose und der DNS-Reparatur in Abhängigkeit des Behandlungsschemas, der Behandlung mit NVP-BEZ235 und der Bestrahlung untersucht.

So wurde für den dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 bereits in Hypopharynx- und Prostatakarzinomzellen Daten bezüglich einer Radiosensibilisierung unter normoxischen und sehr harschen hypoxischen Bedingungen veröffentlicht (Fokas u. a., 2012a; Potiron u. a., 2013). Da allerdings bei malignen Neubildungen der Brust hauptsächlich Tumoreareale mit einer milden Hypoxie auftreten und es für diese Sauerstoffkonzentrationen und diese Tumorentität zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit keinerlei Daten über eine Radiosensibilisierung durch duale PI3K/mTOR Inhibition gab, wurde dies in einem Teil dieser Arbeit untersucht. Zu diesem Zweck wurden triple negative (TN)

MDA-MB-231 und östrogenrezeptor-positive (ER) MCF-7 Mammakarzinomzellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert und die Koloniebildungsfähigkeit nach Behandlung mit NVP-BEZ235 untersucht. Um die Bedingung einer transienten Hypoxie zu simulieren, wurden zusätzlich hypoxische Zellen nach der Bestrahlung in normoxischen Bedingungen kultiviert und ebenfalls auf die Koloniebildungsfähigkeit untersucht. Weiterhin wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung der DNS-Gehalt der Zellen, die Induktion und der Abbau von DNS-Schäden, das Auftreten reaktiver Sauerstoffradikale sowie die Expression eines Hypoxiemarkers, relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, der Apoptose und der Autophagie untersucht.

Es wurde bereits in mehreren Studien berichtet, dass eine Inhibition mehrerer onkogener Signalkaskaden simultan zu synergistischen Effekten führen kann und somit effektiver ist als die Inhibition nur eines Signalweges (Knight u. a., 2010). Die MAPK und die PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade stellen häufig mutierte Signalwege in humanen Tumorerkrankungen dar und es wurde bereits in einer Vielzahl an Studien gezeigt, dass eine simultane Inhibition beider Signalwege zu synergistischen Effekten führt (Engelman, 2009; Guenther u. a., 2013; Jahangiri & Weiss, 2013; Sebolt-Leopold & Herrera, 2004; Watson u. a., 2014). Da allerdings wenig Informationen über eine synergistische Wirkung der simultanen Inhibition beider Signalkaskaden in Bezug auf die Strahlenresistenz humaner Tumorzellen vorhanden ist, wurde in dieser Arbeit die Koloniebildungsfähigkeit nach simultaner Inhibition mit dem MEK Inhibitor AZD6244 und dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 nach Bestrahlung in SNB19 Glioblastom- und A549 Lungenkarzinomzellen untersucht. Weiterhin wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung der DNS-Gehalt der Zellen, die Induktion und der Abbau von DNS-Schäden sowie die Expression relevanter Proteine des MAPK/Erk und des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, der Autophagie und der Apoptose untersucht.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 ZELLINIEN UND ZELLKULTUR

Für die Versuche dieser Arbeit wurden die in Tabelle 3-1 dargestellten adhärenen Zelllinien verwendet. Die Zelllinien A549, DK-MG, GaMG, SNB19, U373 und U87-MG wurden von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen. Die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrike Kämmerer (Frauenklinik, Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt. Als Kulturmedium wurde für sämtliche Zelllinien mit Ausnahme von U373 und U87-MG Dulbecco's Modified Eagle Medium, angereichert mit 10 % fetal calf serum (FCS) und 1 mM L-Glutamin, verwendet. Für die Zelllinien U373 und U87-MG wurde Modified Eagle Medium angereichert mit 10 % FCS verwendet. In sämtliche Kulturmedien wurden außerdem 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Wichtige Mutationen der in Tabelle 3-1 dargestellten Zelllinien wurden durch Datenbankabfragen in COSMIC, IGRhcellID und der IARC TP53 Database ermittelt (Internetseite: „COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer“, Internetseite: „IGRhCellID - Integrated Genomic Resources of human Cell lines for Identification“, Internetseite: „IARC TP53 Database“).

Tabelle 3-1 Zelllinien

Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, deren Ursprung, das zur Kultivierung verwendete Medium sowie der in den Datenbanken eingetragene Mutationsstatus in den *EGFR*, *KRAS*, *TP53*, *PTEN* und *PIK3CA* Genen.

Zelllinie	Ursprung	Mutierte Gene
A549	Lungenkarzinom	<i>KRAS</i>
DK-MG	Glioblastom	<i>PIK3CA</i> , <i>PTEN</i> *
GaMG	Glioblastom	<i>TP53</i>
MCF-7	Mammakarzinom	<i>PIK3CA</i>
MDA-MB-231	Mammakarzinom	<i>EGFR</i> , <i>TP53</i>
SNB19	Glioblastom	<i>TP53</i> , <i>PTEN</i>
U373	Glioblastom	<i>TP53</i> , <i>PTEN</i>
U87-MG	Glioblastom	<i>PTEN</i>

*Für die DK-MG Zelllinie ist für das *PTEN* Gen im Katalog der somatischen Mutationen in Krebs eine Mutation in der kodierenden Sequenz (c.499A>G) eingetragen, welche zu einem Austausch der Aminosäure von Threonin zu Alanin führt. Da diese Mutation in den anderen Datenbanken nicht eingetragen ist und das PTEN Protein in der DK-MG Zelllinie nachweisbar ist, wird für diese Arbeit davon ausgegangen, dass es sich um einen Fehleintrag in der Datenbank handelt und *PTEN* in der DK-MG Zelllinie wildtypisch ist.

Die Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden Subkulturen angelegt, um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Hierzu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zugabe einer Trypsin EDTA Lösung proteolytisch abgelöst. Nach einer zellspezifischen Einwirkzeit (ca. 5 min im Brutschrank) wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 250 rcf, bei Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer zelllinienspezifischen Konzentration in frischem Medium ausgesät. Die hierzu verwendeten Chemikalien und Lösungen sind in Tabelle 3-2 dargestellt.

Tabelle 3-2 Zellkulturmedien

Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Medien, Zusätze sowie die Hersteller.

Medium/Lösung/Zusatz	Hersteller
Dulbecco's MEM (DMEM) Low Glucose MEM Low Glucose Penicillin/Streptomycin L-Glutamin	PAA (Pasching, Österreich)
PBS FCS	Biochrome (Berlin, Deutschland)
0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Solution	Gibco Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

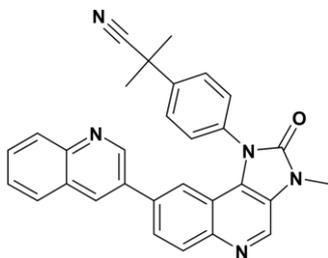
3.1.2 KLEINMOLEKULARE INHIBITOREN

Der kleinmolekulare ATP-kompetitive duale PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 (siehe Abbildung 3-1 A) wurde freundlicherweise vom Institut für Biomedizinische Forschung von Novartis (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um ein Imidazoquinolinderivat, welches die Kinaseaktivität von PI3K und mTOR bereits in niedrigen nanomolaren Konzentrationen inhibiert (Maira u. a., 2008). Der duale PI3K/mTOR Inhibitor, welcher auch unter dem generischen Namen „Dactolisib“ bekannt ist, wird bereits in mehreren klinischen Studien als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Zytostatika getestet (Internetseite: „Search of: BEZ235 - List Results - ClinicalTrials.gov“).

Der kleinmolekulare allosterische Inhibitor AZD6244 (siehe Abbildung 3-1 B), welcher auch unter den generische Namen „ARRY-142886“ und „Selumetinib“ bekannt ist, wurde bei Selleckchem (Houston, TX, USA) kommerziell erworben. Er inhibiert die MEK Kinaseaktivität ebenfalls in niedrigen nanomolaren Konzentrationen (Yeh u. a., 2007). Wie NVP-BEZ235 wird auch AZD6244 momentan in mehreren klinischen Studien auf seine Wirksamkeit als Monotherapeutikum als auch in Kombination mit anderen Präparaten untersucht (Internetseite: „Search of: Selumetinib - List Results - ClinicalTrials.gov“). Im Gegensatz zu NVP-BEZ235 handelt es sich bei AZD6244 nicht um einen ATP-kompetitiven, sondern um einen allosterischen Inhibitor, welcher die

Kinaseaktivität von MEK durch Bindung an eine regulatorische Domäne inhibiert (Zhang u. a., 2009).

A NVP-BEZ235



B AZD6244

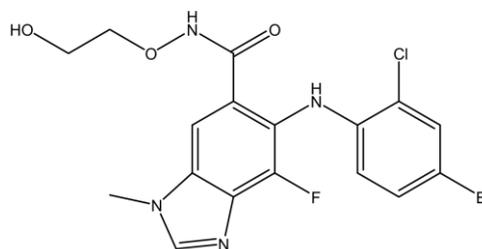


Abbildung 3-1 Strukturformeln NVP-BEZ235 und AZD6244 (Maira u. a., 2008; Yeh u. a., 2007)

Dargestellt sind die Strukturformeln des Imidazoquinolinderivates NVP-BEZ235 (A) und des Aminobenzimidazolderivates AZD6244 (B).

3.1.3 ANTIKÖRPER

Die für diese Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 3-3 aufgelistet, wohingegen die verwendeten Sekundärantikörper in Tabelle 3-4 aufgelistet sind.

Tabelle 3-3 Primärantikörper

In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper, ihre Herkunft, das Molekulargewicht des Zielproteins in kDa sowie der Hersteller.

Zielprotein	Herkunft	Molekular- gewicht (kDa)	Hersteller
HIF-1 α	Maus monoklonal	120	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
AKT	Kaninchen polyklonal	60a	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA
Cdk1 (=cdc2)	Maus monoklonal	34	
LC3B	Kaninchen polyklonal	14, 16	
MEK1/2	Kaninchen monoklonal	45	
mTOR	Kaninchen polyklonal	289	
p42-MAP (=Erk2)	Kinase Kaninchen polyklonal	42	
PARP	Kaninchen polyklonal	116, 89	

Zielprotein	Herkunft	Molekulargewicht (kDa)	Hersteller
p-4E-BP1	Kaninchen monoklonal	15-20	
p-AKT	Maus monoklonal	60	
p-MEK1/2	Kaninchen monoklonal	45	
p-mTOR	Kaninchen monoklonal	289	
p-p44/42-MAP Kina- se (=p-Erk1/2)	Kaninchen monoklonal	44, 42	
p-Rb	Kaninchen polyklonal	110	
p-S6	Kaninchen polyklonal	32	
PI3K p110	Kaninchen polyklonal	110	
PI3K p85	Kaninchen polyklonal	85	
PTEN	Kaninchen polyklonal	54	
Rad51	Kaninchen monoklonal	37	
S6	Maus monoklonal	32	
p-H2AX (Ser139) FITC conjugate	Maus monoklonal	15	Millipore, Temecula, CA, USA
Cdk4	Kaninchen polyklonal	33	Santa Cruz Biotech- nology, Santa Cruz, CA, USA
k-Ras	Maus monoklonal	21	
Raf-1	Kaninchen polyklonal	72	
Carbonic anhydrase 9	Maus polyklonal	50-55	Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutsch- land
β -Aktin	Maus monoklonal	42	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β -Tubulin	Maus monoklonal	55	

Tabelle 3-4 Sekundärantikörper

In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper, ihre Herkunft sowie der Hersteller.

Ziel	Herkunft	Hersteller
Anti Maus	Ziege polyklonal	DakoCytomation, Glostrup,
Anti Kaninchen	Ziege polyklonal	Dänemark

3.1.4 PUFFER UND REAGENZIEN

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit für die Versuche verwendeten Puffer, Lösungen und Reagenzien, wie z.B. das Rezept für 10-fach PBS (vgl. Tabelle 3-5), dargestellt.

Tabelle 3-5 10-fach PBS

Rezept für die Herstellung von 10-fach PBS.

Name	Menge
10-fach PBS	80 g NaCl
	2 g KCl
	14,4 g Na ₂ HPO ₄
	2,4 g KH ₂ PO ₄
	pH-Wert auf 7,4 einstellen und mit H ₂ O bidest. auf 1 l auffüllen

Für die Herstellung gebrauchsfertiger PBS-Lösung wurde ein Zehntel der 10-fachen PBS Lösung mit neun Zehntel bidestilliertem Wasser vermischt.

3.1.4.1 KOLONIETEST

Für die Fixierung der Kolonien wurde eiskaltes Fixativgemisch, bestehend aus drei Teilen Methanol und einem Teil Essigsäure, zu den Zellen zugegeben. Im Anschluss wurden die Kolonien mit einer 0,6-prozentigen Kristallviolettlösung gefärbt und nach der Färbung mit Wasser gewaschen.

3.1.4.2 PROTEINEXTRAKTION UND WESTERN BLOT

Die für die Gesamtzell- und Kernproteinextraktion verwendeten Puffer sind in Tabelle 3-6 und Tabelle 3-7 dargestellt. Die verwendeten Protease- und Phosphataseinhibitoren sind in Tabelle 3-8 aufgeführt.

Tabelle 3-6 RIPA Puffer

Rezept für 100 ml RIPA Puffer zur Gesamtproteinextraktion

Name	Menge
RIPA Puffer	790 mg Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 900 mg NaCl In 75 ml H ₂ O lösen und pH-Wert auf 7,4 einstellen 10 ml 10 % Igepal 2,5 ml 10 % Natrium-Deoxycholate (1 g in 10 ml H ₂ O bidest.) 1 ml 100 mM EDTA Auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen

Tabelle 3-7 Kernextraktionspuffer

Rezept für jeweils 50 ml der Kernproteinextraktionspuffer LB1 und LB2

Name	Menge
LB1-Puffer	500 µl 1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 7,4 100 µl 500 mM EDTA 1,5 ml 5 M NaCl 2,5 ml 10 % Igepal Auf 50 ml mit H ₂ O bidest. auffüllen
LB2-Puffer	2,5 ml 1 M HEPES, pH 7,9 4,0 ml 5 M NaCl 100 µl 500 mM EDTA Auf 50 ml mit H ₂ O bidest. auffüllen

Tabelle 3-8 Proteaseinhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Protease- und Phosphataseinhibitoren wurden aliquotiert und frisch zu 1 ml der verwendeten Extraktionspuffer zugegeben.

Funktion	Menge
Proteaseinhibitoren	0,5 µl von 1 µg/ml Aprotinin
	10 µl von 1 mM DTT
	2 µl von 1 µg/ml Leupeptin
	2 µl von 1 µg/ml Pepstatin A
Phosphataseinhibitoren	1 µl von 1 M NaF
	2 µl von 500 nM NaVO ₃

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung und die gelelektrophoretische Größenauf-trennung der Proteine und Proteingrößenstandards wurden die in Tabelle 3-9 aufgeführ-ten vorgefertigten Gele, Puffer und Reagenzien der Firmen Bio-Rad (München, Deutschland), Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA) verwendet.

Tabelle 3-9 Materialien Western blot

In diesen Versuchen verwendete Materialien zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen und Proteingrößenstandards.

Funktion	Name	Hersteller
Proteinkonzentrationsbestimmung	DC™ Protein Assay Reagenz A	Bio-Rad (München, Deutschland)
	DC™ Protein Assay Reagenz B	
	DC™ Protein Assay Reagenz C	
	Protein Assay Standard II	
Proteingrößenmarker	Precision Plus All Blue Protein Ladder	
Gel	NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel	Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	NuPAGE® 3-8 % Tris Acetate Gel	
Reagenzien	NuPAGE® 4x LDS Probenpuffer,	
	NuPAGE® 10x Sample Reducing Agent	
	NuPAGE® Antioxidant	
Elektrophoresepuffer	NuPAGE® 20x MOPS SDS Puffer	
	NuPAGE® 20x Tris-Acetate Puffer	
Transferpuffer	NuPAGE® Transfer buffer	
Transfermembran	Nitrozellulosemembran 0,2 µm Porengröße	
Färbelösung	PonceauS Lösung 0,1 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA)

Für die Proteindetektion wurden die in Tabelle 3-10 aufgeführten Wasch-, Block-, Inkubations- und Detektionspuffer verwendet. Die Detektion erfolgte mittels Belichtung von 18x24 cm Vision X-Film R20 ND Röntgenfilmen der Firma Typon Röntgen-Film GmbH (Grünstadt, Deutschland).

Tabelle 3-10 Puffer Proteindetektion

Für die Versuche verwendete Puffer zum Waschen, Blockieren, Inkubieren und Detektieren der Proteine.

Funktion	Rezept
Waschpuffer	0,1 % Tween in PBS
Blockpuffer	4 % Milchpulver oder BSA in 0,1 % Tween-PBS
Inkubationspuffer	Antikörper in 4 % Milchpulver oder BSA in 0,1 % Tween-PBS
Enhanced Luminol	7,88 g Tris-HCl in 500 ml H ₂ O bidest. lösen pH mit 5 M NaOH auf 8,6 einstellen 125 mg Luminolnatrium Salz
Cumarinsäure	100 ml DMSO 110 mg p-Cumarinsäure
Wasserstoffperoxid	30 %-ige Wasserstoffperoxidlösung

3.1.4.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die für die durchflusszytometrische Analyse verwendeten Puffer und Reagenzien sind in Tabelle 3-11 dargestellt.

Tabelle 3-11 Puffer und Reagenzien FACS

Für die durchflusszytometrischen Experimente im Rahmen dieser Arbeit verwendete Puffer und Reagenzien.

Name	Rezept
Block9	0,1 g BSA 8 ml Mausserum 1 ml von 10 mg/ml RNase 1 ml von 1 M NaF 200 µl von 500 nM NaVO ₃ 0,025 g Heringsperma DNS 100 µl Triton X-100 2,5 ml von 200 mM EDTA 2,5 ml von 2 % NaN ₃ 10 ml von 10x PBS

Name	Rezept
	Mit H ₂ O bidest. auf 100 ml auffüllen
DNS-Färbelösung	0,1 % Tween in PBS 50 µg/ml RNase 5 µg/ml Propidiumiodid (PI) oder 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

3.1.5 CHEMIKALIEN UND LABORMATERIALIEN

Weitere Chemikalien wurden bei den Firmen BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, USA) erworben. Zellkulturflaschen sowie weitere Labormaterialien und Verbrauchsgegenstände wurden bei den Firmen BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Greiner (Frickenhäuser, Deutschland), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) gekauft.

3.1.6 LABORGERÄTE

Die während der Versuche verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 3-12 aufgeführt.

Tabelle 3-12 Laborgeräte

Für die Versuche verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller/Bezugsquelle
Abflamngerät: Fuego SCS basic H164.1	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Absaugpumpe KNF Neuberger Typ 035 AN. 18	KNF Neuberger (Freiburg, Deutschland)
Analysewaage SBA 33	SCALTEC Instruments GmbH (Heilgenstadt, Deutschland)
Autoklav Typ 23	Melag Medizintechnik (Berlin, Deutschland)
Linearbeschleuniger Primus	Siemens Medical Solutions (Concord, CA, USA)
Brutschrank AutoFlow NU-5500	IBS INTEGRA Biosciences (Fernwald,

Gerät	Hersteller/Bezugsquelle
	Deutschland)
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Eismaschine Scotsman AF80	Genheimer Kälte-Klima-Technik (Hettstadt, Deutschland)
Pipettierhilfe Accu-Jet® Pro	Brand (Wertheim, Deutschland)
Elektrophoresekammer EI002 XCell SureLock®	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Spannungsquelle Elektrophorese PS 304 Minipac II	Apelex (Lisses, Frankreich)
Entwicklermaschine 1186-1 Ecomax™	Protec® (Oberstenfeld, Deutschland)
Heizblock VLM 1 Q	GEFRAN (Provaglio d'Iseo, Italien)
Magnetrührer Typ MRI**	Heideloph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mikroskop CKX31	Olympus (Hamburg, Deutschland)
pH-Meter WTW inoLab® pH720	Restore (Manchester, UK)
Spectrophotometer SmartSpec™ Plus	Bio-Rad (München, Deutschland)
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage Typ KERN 440-EW47	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Rollmischer RM5	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Schüttler Vibro-Shaker L-40	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Sterilbank LabGard Class II, Biological safety cabinet, NU-437-400E	IBS INTEGRA Biosciences (Fernwald, Deutschland)
Vortexer REAX DR 1	Heideloph Instruments GmbH (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad Typ 3044	Köttermann (Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Zählkammer Neubauer-Improved	Paul Marienfeld GmbH (Lauda Königshofen, Deutschland)
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5412R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Gerät	Hersteller/Bezugsquelle
Zentrifuge Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Zentrifuge Sigma [®] 3-16L	Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)

3.1.7 SOFTWARE

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Daten wurden mit den Programmen BD FACSDiva™, CellQUEST 3.1 (beide BD Biosciences, San Jose, CA, USA), Flowing Software 2.5.0 (Perttu Terho, Turku Center for Biotechnology, Turku, Finnland), Image J (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA), Microsoft Office Professional Plus 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), ModFit LT[®] (Verity Software House, Topsham, ME, USA) und Origin 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) ausgewertet und bearbeitet.

3.2 METHODEN

3.2.1 BEHANDLUNG MIT KLEINMOLEKULAREN INHIBITOREN

Die Behandlungsschemata für die einzelnen Versuchsteile für den dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 und den MEK Inhibitor AZD6244 sind in Abbildung 3-2 dargestellt.

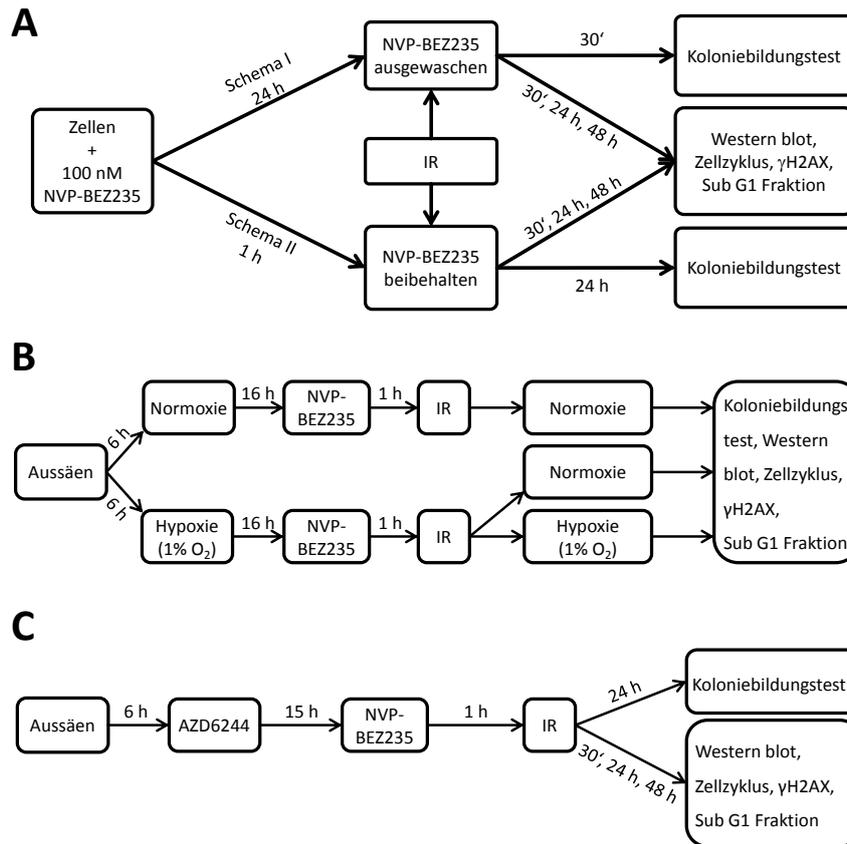


Abbildung 3-2 Behandlungsschemata der Versuchsteile

Die in diesen Experimenten verwendeten Behandlungsschemata, wobei (A) das Schema des Glioblastom Projektes, (B) das Schema des Hypoxie Projektes und (C) das Schema des MEK- und PI3K/mTOR-Inhibitor Projektes darstellt. Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013 und Kuger et al. 2014.

3.2.2 RÖNTGENBESTRAHLUNG

Die Röntgenbestrahlung wurde mit einem Siemens Linearbeschleuniger Primus (Siemens Medical Solutions, Concord, CA, USA) mit einer Beschleunigungsspannung von 6 MV und einer Dosisrate von 2 Gy/Minute durchgeführt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen unter Standardbedingungen bis zur Zellernte gemäß den Behandlungsschemata weiterkultiviert.

3.2.3 PROLIFERATIONSASSAYS

Um den Einfluss der Inhibitoren auf die Proliferationsrate humaner Krebszellen zu untersuchen, wurden Proliferationsassays durchgeführt. Die Auswertung der durch den ATP- oder MTS-Test erhaltenen Daten erfolgte durch Anpassung der Daten an das Vier-Parameter-logistische-Modell (4PLM),

$$Y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (c/IC_{50})^p} + A_2$$

in welchem Y die Zellviabilität, c die Substanzkonzentration in nM, A_1 und A_2 die jeweils obere und untere Asymptote, IC_{50} die 50 % inhibitorische Konzentration und p den Hill-Exponenten darstellt.

3.2.3.1 ATP-ASSAY

Zur Bestimmung des ATP-Gehaltes wurde der ‚Cell-Titer-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay‘ von Promega (Mannheim, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurden die Tumorzellen in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten in einer zelllinienspezifischen Dichte von ca. 1.000-4.000 Zellen/Kavität in 100 μ l Medium ausgesät. Die Zellen wurden nach einer Anwuchsphase mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen über einen Konzentrationsbereich von ca. 0,03-4 μ M für AZD6244 und ca. 10-800 nM für NVP-BEZ235 behandelt und für die angegebene Zeit mit den Inhibitoren inkubiert. Mit DMSO behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Im Anschluss erfolgte eine Detektion des ATP-Gehaltes pro Kavität, welcher direkt proportional zur Zellzahl ist, über eine Lumineszenzreaktion.

3.2.3.2 MTS-ASSAY

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Krebszellen nach Behandlung mit Inhibitoren wurde der ‚CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation‘ von Promega (Mannheim, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Aussaat und Behandlung der Zellen erfolgte analog zum ATP-Assay. Im Gegensatz zum ATP-Assay erfolgte bei diesem Test die Analyse der Zellzahl und der metabolischen Aktivität über die Umwandlung des Testreagenz über zelluläre Reduktasen zu einem Formazanprodukt, dessen Konzentration kolorimetrisch bestimmt wurde.

3.2.4 KOLONIEBILDUNGSTEST

Der Koloniebildungstest, wie von Franken et al. beschrieben, wurde verwendet, um die klonogene Fähigkeit von Krebszellen nach Bestrahlung alleine oder in Kombination mit den Inhibitoren zu untersuchen (Franken u. a., 2006). Wurden die Zellen für 24 h vor der Bestrahlung mit dem Inhibitor inkubiert, so wurden sie vor der Bestrahlung enzymatisch durch Behandlung mit Trypsin abgelöst, in Zellsuspension bestrahlt und im Anschluss ausgesät. Wurden die Inhibitoren vor der Bestrahlung zugegeben und bis 24 h nach Bestrahlung beibehalten, so wurden die Zellen nicht in Suspension sondern adherent bestrahlt, 24 h nach Bestrahlung enzymatisch abgelöst und ausgesät. In beiden Fällen erfolgte die Aussaat in geeigneter Verdünnung, sodass nach 14-tägiger Inkubation

nach Bestrahlung mit bis zu 8 Gy einzelne Kolonien bestehend aus mindestens 50 Zellen sichtbar waren. Die Kolonien wurden von Hand ausgezählt und der Mittelwert jeder Bedingung, normiert auf die entsprechende Anwachsrate bei 0 Gy, gegen die Bestrahlungsdosis halblogarithmisch aufgetragen. Die so erhaltenen Daten wurden an das linearquadratische Modell,

$$S = 10^{(-\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2)}$$

bei welchem S die Überlebensfraktion, α und β jeweils die lineare und die quadratische Komponente und D die Strahlendosis darstellen, angepasst. Anhand der besten Anpassungsfunktion wurden über weitere Berechnungen im Anschluss die Überlebensrate bei 2 Gy (SF2) und die Bestrahlungsdosis, welche in 10 % Überleben resultiert (D_{10}), bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Vergleich der Plattiereffizienz (PE), der Überlebensfraktion bei 2 Gy (SF2) und der Bestrahlungsdosis, bei der 10 % der Zellen überleben (D_{10}).

3.2.5 PROTEINDETEKTION

Zum Nachweis von Veränderungen der Expressionshöhe bestimmter Proteine in Abhängigkeit von der Bestrahlung und der Behandlung mit Inhibitoren wurden Zelllysate 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung angefertigt. Hierzu wurden die Zellen je nach Versuchsteil gemäß dem in Abbildung 3-2 dargestellten Schemata behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet.

3.2.5.1 ZELLYSATE UND KERNEXTRAKTE

Vor der Herstellung von Zelllysaten und Kernextrakten wurden die Zellen zu den entsprechenden Erntezeitpunkten mit PBS gewaschen und enzymatisch durch Trypsin abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde mit dem zur jeweiligen Probe gehörenden aufgehobenen Medium gestoppt, um apoptotische Zellen, welche bereits nicht mehr adhären waren, zu berücksichtigen.

Für Gesamtzelllysate wurde das Pellet nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 4 °C, 1300 rpm) in 50-100 μ l RIPA Puffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und die Zellen für mindestens 30 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wurde die lysierte Zellsuspension für 12 min bei 4 °C und 13200 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und konnte nun bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden.

Für Kernextrakte wurde das Zellpellet anstatt in RIPA zunächst in 500 µl eiskaltem LB1 Puffer gelöst und bei 3000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 µl eiskaltem LB2 Puffer aufgenommen, resuspendiert und für 5 min bei 13200 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde nun in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und konnte analog zu den Gesamtzelllysaten für mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden.

3.2.5.2 WESTERN BLOT

Von den angefertigten Zelllysaten und Kernextrakten wurde zunächst über den „DC™ Protein Assay“ von Bio-Rad (München, Deutschland), welcher auf dem Proteinnachweis nach Lowry beruht, die Extinktion bei 750 nm in jeder Probe kolorimetrisch an einem Photometer bestimmt. Anschließend wurden über eine BSA Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen die Extinktionen der einzelnen Proben in absolute Konzentrationen umgerechnet. Je nach Anwendung wurden im Anschluss 10-40 µg Protein mit LDS Probenpuffer und Probenreduktionspuffer versetzt, für 10 min auf 70 °C erhitzt, in kommerziell erworbene NuPAGE® Gele aufgetragen und gelelektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt. Um den späteren Vergleich zu ermöglichen, wurden zusätzlich zu den Proben auch Größenstandards auf das Gel aufgetragen. Im Anschluss wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und dort unspezifisch mit PonceauS angefärbt, um einen erfolgreichen Transfer zu validieren.

3.2.5.3 PROTEINDETEKTION

Für die Immundetektion bestimmter Proteine wurde die Membran zunächst in Waschpuffer entfärbt und anschließend für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach erneutem Waschen der Membran wurde der entsprechende Primärantikörper (siehe Tabelle 3-3) in der vom Hersteller vorgegebenen Verdünnung in Inkubationspuffer auf die Membran gegeben und für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Rollmischer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer wurde die Membran anschließend für 1-2 h mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3-4) inkubiert. Nach drei Waschvorgängen wurde die Membran in einer Detektionslösung, bestehend aus 5 ml Enhanced Luminol Lösung, 0,5 ml Cumarinsäure und 5 µl 30 %-ige Wasserstoffperoxidlösung, für zwei Minuten

inkubiert. Detektiert wurde das Signal anschließend im Dunkeln auf Röntgenfilmen, wobei die Belichtungszeit antikörper- und zelllinienspezifisch war und zwischen 5 s und 15 min betrug. Die Auswertung und Quantifizierung der Bandengröße und -intensität erfolgte über das Programm ImageJ und durch eine Normierung auf ein entsprechendes Haushaltsgen.

3.2.6 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE METHODEN

3.2.6.1 ZELLYKLUS UND DSB MESSUNGEN

Um den Einfluss der Inhibitoren und der Bestrahlung auf den Zellzyklus, auf die Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen sowie auf die Anwesenheit hypodiploider Zellen zu untersuchen, wurden Proben 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert. Bei der Ernte wurden die Zellen, nachdem sie gemäß dem entsprechenden Schema behandelt wurden, enzymatisch mit Trypsin abgelöst und mit PBS gewaschen. Die Trypsinreaktion wurde mit dem aufgehobenen Medium der jeweiligen Probe gestoppt, um apoptotische Zellen, welche bereits nicht mehr adhärent waren, zu berücksichtigen.

Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 4 °C, 1300 rpm) pelletiert, mit kaltem PBS gewaschen und erneut durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ca. 250-500 µl kaltem PBS aufgenommen. Anschließend wurde langsam unter ständigem Vortexen 4 ml -20 °C kalter Ethanol zuge tropft. Die so fixierten und permeabilisierten Zellen konnten nun für mehrere Wochen bei -20 °C aufbewahrt werden.

Der Nachweis von DNS-Doppelstrangbrüchen erfolgte über die Detektion des am Serinrest 139 phosphorylierten Histons H2AX gemäß dem von Muslimovic et al. (Muslimovic u. a., 2008) publizierten Protokoll. Hierzu wurden die in Ethanol gelagerten Proben durch zweimaliges Waschen mit PBS rehydratisiert und mit dem in Block9 gelösten Antikörper für mindestens 2 h auf einem Schüttler bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die im Block9 enthaltenen Substanzen permeabilisierten die Zellmembran, verhinderten die Degradation durch Phosphatasen und Proteinasen und gewährleisteten eine spezifische Bindung des FITC gekoppelten anti- γ H2AX Antikörpers (vgl. Tabelle 3-11). Die Detektion des Immunfluoreszenzsignals, der mit einem 488 nm Laser angeregten anti- γ H2AX-FITC Antikörper, erfolgte mit einem Bandpassfilter 530/30 nm (FACSCalibur und FACSCanto II) mit logarithmischer Amplifikation des Signals. Es wurden pro Probe mindestens 20.000 Zellen gemessen.

Parallel wurden der Zellzyklus und die Fraktion hypodiploider Zellen gemessen. Hierfür wurden die Proben nach Zugabe des γ H2AX-FITC Antikörpers mit RNase behandelt, um unspezifische Bindungen des DNS-Farbstoffes zu verringern. Als DNS-Farbstoff wurden PI (FACSCalibur und FACSCanto II) sowie DAPI (FACSCanto II) verwendet. Das PI wurde durch einen 488 nm Laser angeregt und bei 630/22 nm detektiert, wohingegen DAPI durch einen 405 nm Laser angeregt und bei 450/40 nm detektiert wurde. Für Zellzyklusmessungen erfolgte die Darstellung im linearen Amplifikationsmodus, wohingegen die Daten für die Sub G1 Fraktion im logarithmischen Amplifikationsmodus dargestellt wurden. Die weitere Analyse und Darstellung der Daten erfolgte über die im Kapitel 3.1.7 angegebenen Programme, wobei durch geeignete Wahl der Messparameter die entsprechenden Zellpopulationen untersucht wurden.

3.2.6.2 ROS MESSUNG

Um die Induktion von ROS durch den Oxygenierungszustand, die Bestrahlung und NVP-BE235 zu untersuchen, wurde der ROS Indikator 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diazetat (H₂DCFDA) gemäß der von Cossarizza et al. (Cossarizza u. a., 2009) beschriebenen Methode verwendet. Hierbei wurden die Zellen kurz vor der Bestrahlung mit PBS gewaschen und in Medium ohne Serum resuspendiert. Direkt nach der Bestrahlung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert. H₂DCFDA-Acetylerster und seine Derivate sind membrangängig, werden allerdings im Zytosol von zellulären Esterasen relativ schnell in H₂DCFDA abgebaut, welches nicht membrangängig ist und somit im Inneren der Zelle akkumuliert. Der Nachweis von ROS beruht, wie in Abbildung 3-3 dargestellt, auf der Fähigkeit von ROS, dieses nicht fluoreszierende H₂DCFDA in Dichlorofluoreszein umzuwandeln, welches fluoreszent ist und somit im Durchflusszytometer gemessen werden kann.

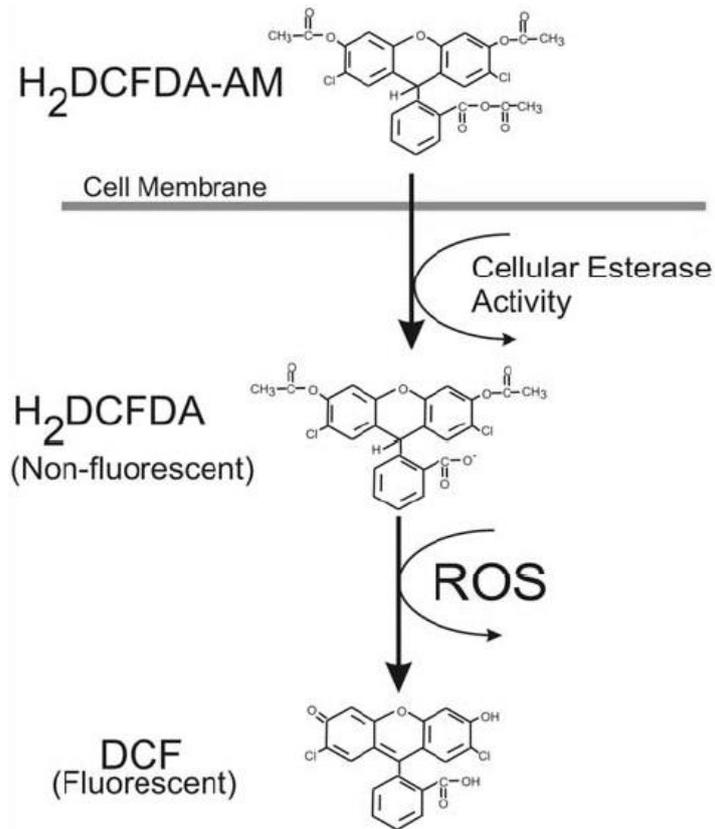


Abbildung 3-3 ROS Nachweis über H₂DCFDA (Internetseite: „An Introduction to Reactive Oxygen Species - Measurement of ROS in Cells“)

Schematischer Nachweis von ROS. H₂DCFDA-Acetylerster diffundiert passiv über die Membran, wo durch zelluläre Esterasen die Esterbindung gespalten wird, wodurch eine Diffusion des nun geladenen Moleküls über die Zellmembran verhindert wird. Durch Auftreten von ROS wird nun das nicht fluoreszierende H₂DCFDA in das fluoreszierende Dichlorofluoreszein umgewandelt.

3.2.7 STATISTIK

Pro Versuch wurden mehrere unabhängige Experimente durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei Mittelwerten um das arithmetische Mittel (MW) ± eine Standardabweichung (SD) oder einen Standardfehler (SE). Zum Vergleich zweier Behandlungsbedingungen wurde der zweiseitige Zweistichproben t-Test verwendet. Zum Vergleich von mehr als zwei Bedingungen wurde, sofern nicht anders angegeben, eine ein- oder mehrfaktorielle Analyse der Varianzen (ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Holm Posthoc-Test verwendet. Der Grenzwert für statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgelegt und für die Posthoc-Analysen gemäß der Bonferroni-Holm Prozedur korrigiert.

3.3 EXPERIMENTE VON MITARBEITERINNEN DER ARBEITSGRUPPE UND STUDENTEN

Im Rahmen dieser Doktorarbeit und der hierdurch entstandenen Publikationen wurden verschiedene Versuche von Mitarbeiterinnen der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Studenten der Universität Würzburg durchgeführt. Dies betrifft insbesondere die Immunoblotexperimente des ersten Teilprojektes. Hierbei wurden die Kultur, die Behandlung und die Bestrahlung der Zellen, das Anfertigen von Zelllysaten und Western blots sowie die Detektion und die Auswertung der Proteinexpressionen von Rico Brendke, Ines Elsner, Dorothea Graus (geb. Englisch), Nadine Günther und Astrid Katzer durchgeführt. Neben den bereits genannten Personen wurden in dieser Arbeit Daten von Emre Cörek (zweites Teilprojekt), Svetlana Hilz und Paul Lutyj (beide erstes Teilprojekt) verwendet, wobei auch diese die entsprechenden Versuche vollends (d.h. von der Kultur der Zellen bis zur Darstellung der Ergebnisse) durchgeführt haben. Wurden Daten der oben genannten Personen in Abbildungen oder Tabellen verwendet, so ist dies in der entsprechenden Legende angegeben.

4 ERGEBNISSE

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Teilprojekte bearbeitet, deren Ergebnisse nachfolgend dargestellt werden: 1) Einfluss der PI3K/Akt/mTOR Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit von Glioblastomzellen, 2) Einfluss des NVP-BEZ235 Inhibitors auf die Strahlenempfindlichkeit von Mammakarzinomzellen unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen, und 3) Gleichzeitige Inhibition der PI3K/Akt/mTOR und MAPK/Erk Signalwege und deren Einfluss auf die Strahlenantwort in SNB19 und A549 Zellen.

4.1 EINFLUSS DES INHIBITOR/BESTRAHLUNGSSCHEMAS AUF DIE NVP-BEZ235 INDUZIERTERADIOSENSIBILISIERUNG IN HUMANEN GLIOBLASTOMZELLINIEN

Um einen Einfluss von NVP-BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit von verschiedenen Glioblastomzelllinien aufzuklären, wurden verschiedene Aspekte der NVP-BEZ235 Inhibition untersucht: der Einfluss des dualen PI3K/mTOR Inhibitors auf die Proliferation, das zelluläre Überleben nach Bestrahlung, die PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade, die Apoptose, die Induktion und den Abbau von DNS-Schäden und den Zellzyklus.

4.1.1 EFFEKT DER PI3K/MTOR INHIBITION AUF DIE ZELLPROLIFERATION

Um den Effekt des dualen PI3K/mTOR Inhibitors NVP-BEZ235 auf die Proliferationsrate humaner Krebszellen zu untersuchen, wurden die vier Glioblastomzelllinien DK-MG, GaMG, U373 und U87-MG mit steigenden NVP-BEZ235 Konzentrationen behandelt. Hierbei wurde ein Konzentrationsbereich von 10-1000 nM untersucht. Die Durchführung des Proliferationsassays erfolgte wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben. Abbildung 4-1 zeigt den relativen ATP Gehalt der untersuchten Zelllinien in Abhängigkeit von der NVP-BEZ235 Konzentration normiert auf die DMSO Kontrolle.

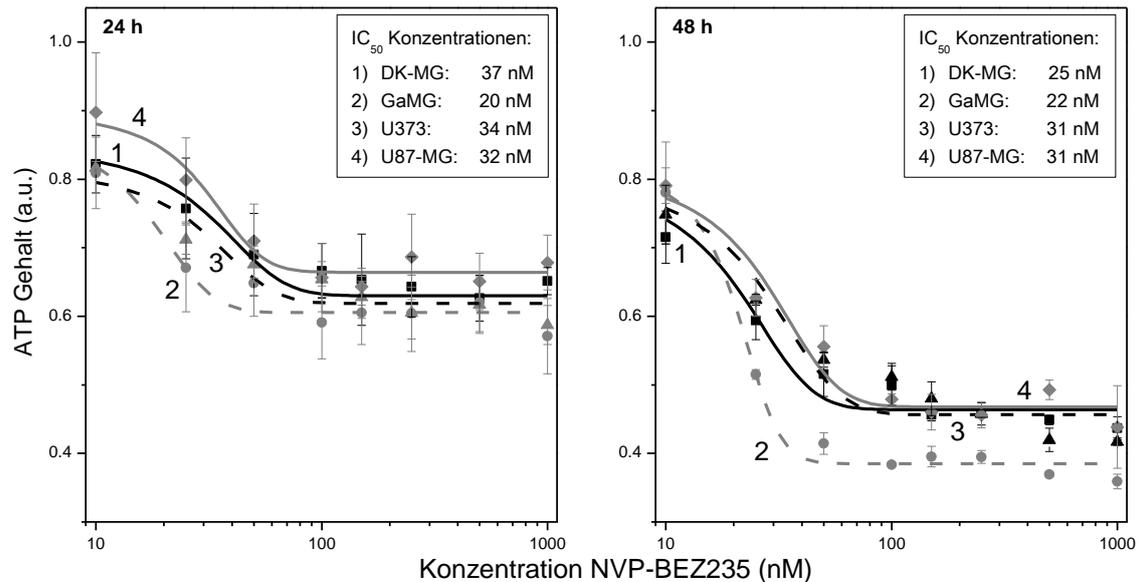


Abbildung 4-1 ATP Assay in Glioblastomzelllinien

Die vier Glioblastomzelllinien DK-MG (1), GaMG (2), U373 (3) und U87-MG (4) wurden für 24 h (linkes Panel) und 48 h (rechtes Panel) mit NVP-BEZ235 in einem Konzentrationsbereich von 10-1000 nM behandelt. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte (\pm eine Standardabweichung) und wurden mittels des 4PLM angefüttet. Die errechneten IC₅₀ Konzentrationen für jede Zelllinie sind in den Inserts dargestellt. Die Daten beruhen auf Versuchen von Nadine Günther und die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press aus Kuger et al. 2013 übernommen.

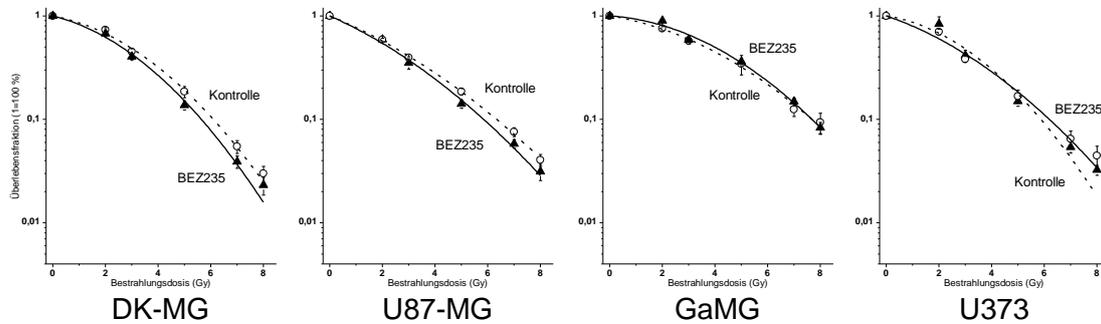
Wie in Abbildung 4-1 deutlich wird, hängt der ATP Gehalt nicht nur von der Konzentration des dualen Inhibitors, sondern auch von der Inkubationsdauer ab. Mit steigender NVP-BEZ235 Konzentration nahm der ATP-Gehalt aller getesteten Zelllinien ab, wobei bei ca. 100 nM ein Plateau von ungefähr 60 bis 70 % bei 24-stündiger und 40 bis 50 % bei 48-stündiger Inkubation erreicht wurde. In allen getesteten Zelllinien konnte bei einer Konzentration von ≥ 100 nM der maximale Effekt in Bezug auf die ATP Reduzierung beobachtet werden. Eine NVP-BEZ235 Konzentration von 100 nM wurde daher für die folgenden Versuche verwendet und ist in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Maira u. a., 2008; Manara u. a., 2010).

4.1.2 EINFLUSS VON NVP-BEZ235 UND BESTRAHLUNG AUF DIE KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT

Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit dem dualen Inhibitor vor oder simultan zur Bestrahlung einen Einfluss auf die Radiosensitivität der untersuchten Glioblastomzelllinien hat, wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Wie in Abbildung 3-1 dargestellt, hatte eine Behandlung aller getesteten Zelllinien mit NVP-BEZ235 für 24 h vor der Bestrahlung (Schema I) keinerlei Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit. Wurden die Zellen dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor hingegen für 1 h vor und bis 24 h nach der

Bestrahlung ausgesetzt (Schema II), so fallen die Überlebenskurven deutlich steiler ab als die der unbehandelten Zellen, was eine Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235 in Abhängigkeit vom Behandlungsschema belegt.

Schema I



Schema II

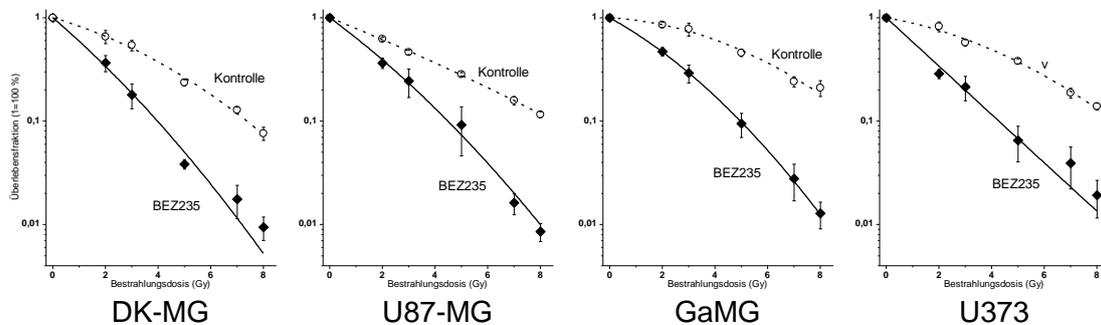


Abbildung 4-2 Koloniebildungsfähigkeit von Glioblastomzelllinien in Abhängigkeit des Behandlungsschemas mit NVP-BEZ235

Repräsentative Ergebnisse der untersuchten Glioblastomzelllinien, welche entweder für 24 h vor der Bestrahlung gemäß Schema I (obere Reihe) oder für 1 h vor und bis 24 h nach der Bestrahlung gemäß Schema II (untere Reihe) mit 100 nM NVP-BEZ235 behandelt wurden. Die genauen Schemata, der Versuchsablauf, sowie die Auswertung sind in Abbildung 3-2 und Kapitel 3.2.4 detailliert erklärt. Zwei Wochen nach der Aussaat der Zellen wurden die Zellen fixiert und die Anzahl von Kolonien mit mindestens 50 Zellen wurde ermittelt. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) der Quadruplikate und wurden mit dem linearquadratischen Modell angefitet. Pro Experiment wurden mindestens vier unabhängige Wiederholungen in Quadruplikaten durchgeführt. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus, Svetlana Hilz und Astrid Katzer bei (siehe Abschlussarbeiten R. Brendtke und D. Graus). Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Die Mittelwerte (\pm SD) der PE, SF2, D_{10} und I_{10} von mindestens vier unabhängig durchgeführten Wiederholungen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Die Tatsache, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede in der PE festgestellt wurden, belegt, dass NVP-BEZ235 eher einen zytostatischen als einen zytotoxischen Einfluss auf die untersuchten Glioblastomzelllinien hat. Wie auch schon in Abbildung 4-2 wird durch ähnliche SF2 und D_{10} Werte deutlich, dass eine Behandlung der Zellen mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor gemäß Schema I keinen Einfluss auf die Strahlensensitivität hat.

Dies lässt sich auch anhand des I_{10} Faktors belegen, welcher für alle vier untersuchten Zelllinien bei Behandlung gemäß Schema I bei ungefähr 1 lag.

Tabelle 4-1 Mittelwerte der PE, SF2, D_{10} und I_{10} in Glioblastomzelllinien

Mittelwerte (\pm SD) der PE, SF2, D_{10} und I_{10} aus 4 unabhängig durchgeführten Versuchen nach Behandlung der untersuchten Glioblastomzelllinien mit 100 nM NVP-BEZ235 gemäß den Behandlungsschemata I und II. Eine statistische Signifikanz ist mit # angegeben und bedeutet $p < 0,05$. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus, Svetlana Hilz und Astrid Katzer bei (siehe Abschlussarbeiten R. Brendtke und D. Graus). Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Zelllinie	Behandlung		PE	SF2	D_{10}	I_{10}
DK-MG	Schema I	Kontrolle	0,22 \pm 0,06	0,63 \pm 0,12	5,73 \pm 0,93	1,08 \pm 0,18
		BEZ235	0,18 \pm 0,04	0,58 \pm 0,12	5,33 \pm 0,73	
	Schema II	Kontrolle	0,17 \pm 0,09	0,67 \pm 0,09	7,93 \pm 0,54	1,92 \pm 0,16
		BEZ235	0,16 \pm 0,08	0,38 \pm 0,05	4,15 \pm 0,25	} #
U87-MG	Schema I	Kontrolle	0,23 \pm 0,15	0,54 \pm 0,10	5,82 \pm 0,35	0,89 \pm 0,12
		BEZ235	0,18 \pm 0,07	0,58 \pm 0,04	6,46 \pm 0,50	
	Schema II	Kontrolle	0,20 \pm 0,08	0,62 \pm 0,02	8,52 \pm 0,39	2,1 \pm 0,14
		BEZ235	0,16 \pm 0,09	0,36 \pm 0,05	4,06 \pm 0,31	} #
GaMG	Schema I	Kontrolle	0,17 \pm 0,04	0,74 \pm 0,09	7,69 \pm 0,80	1,00 \pm 0,05
		BEZ235	0,14 \pm 0,02	0,79 \pm 0,04	7,69 \pm 0,61	
	Schema II	Kontrolle	0,17 \pm 0,06	0,80 \pm 0,08	10,21 \pm 2,32	2,21 \pm 0,48
		BEZ235	0,17 \pm 0,06	0,46 \pm 0,08	4,64 \pm 0,51	} #
U373	Schema I	Kontrolle	0,38 \pm 0,18	0,64 \pm 0,12	6,01 \pm 0,50	0,99 \pm 0,11
		BEZ235	0,35 \pm 0,02	0,59 \pm 0,02	6,15 \pm 0,83	
	Schema II	Kontrolle	0,29 \pm 0,07	0,74 \pm 0,08	9,01 \pm 0,61	2,51 \pm 0,58
		BEZ235	0,30 \pm 0,07	0,30 \pm 0,09	3,81 \pm 1,14	} #

Wurden die Zellen hingegen gemäß Schema II behandelt, so wurden deutlich verringerte SF2 und D_{10} Werte beobachtet, was eine NVP-BEZ235-induzierte Radiosensibilisierung belegt. Dies ist auch anhand des I_{10} Faktors erkennbar, welcher für alle vier Zelllinien bei ungefähr 2 lag.

4.1.3 NVP-BEZ235 UND BESTRAHLUNGSINDUZIERTE ÄNDERUNGEN IN DER EXPRESSION VON PROTEINEN DER PI3K/AKT/MTOR SIGNALKASKADE

Um zu untersuchen, welche molekularbiologischen Gründe für die unterschiedlichen Effekte von NVP-BEZ235 auf die Strahlensensibilität in Abhängigkeit vom Behand-

lungsschema verantwortlich sind, wurde die Expression verschiedener Schlüsselproteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. In Abbildung 4-3 sind repräsentative Proteinexpressionen von PTEN, beiden PI3K Untereinheiten p110 und p85, p-Akt, Akt, p-mTOR, mTOR, p-S6 sowie p-4E-BP1 in DK-MG und U87-MG Zellen, welche mit NVP-BEZ235 und Bestrahlung gemäß Schema I und Schema II behandelt wurden, dargestellt.

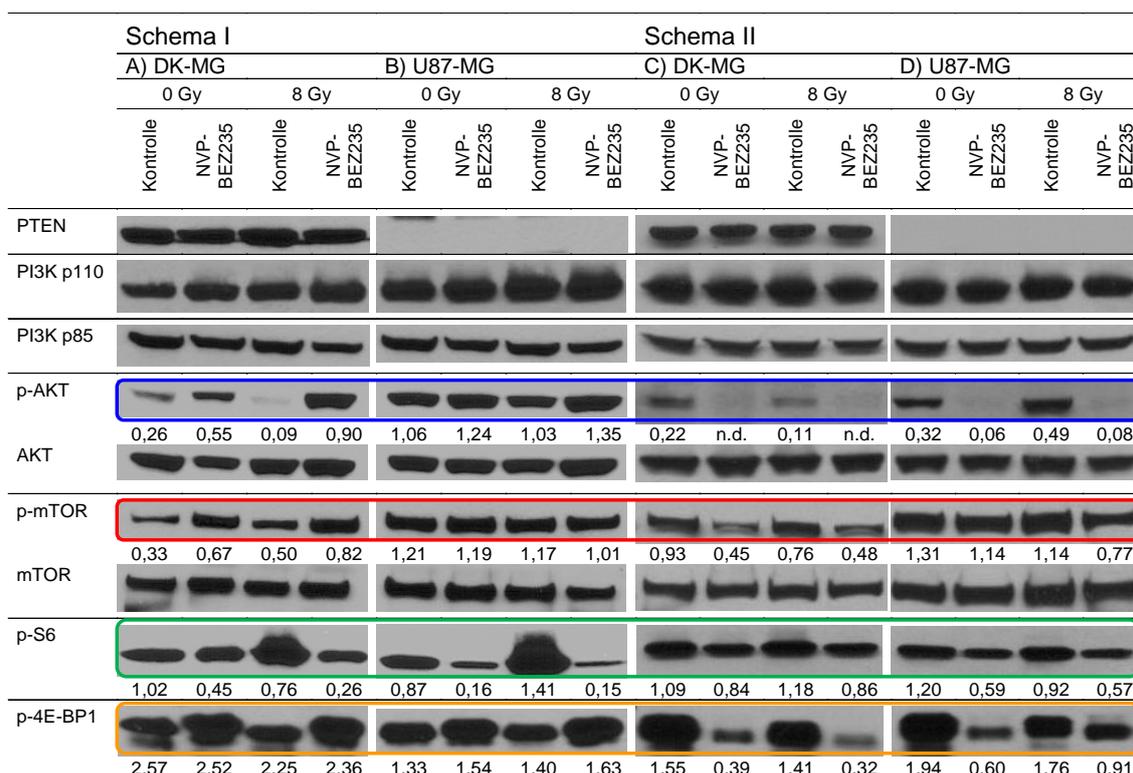


Abbildung 4-3 Western blot relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in DK-MG und U87-MG Zellen 30 min nach Bestrahlung

Repräsentative Western blot Ergebnisse von DK-MG (A und C) und U87-MG (B und D) 30 min nach Bestrahlung. Die Zellen wurden mit 100 nM NVP-BEZ235 gemäß Schema I (A und B) oder Schema II (C und D) behandelt (für weitere Details wird auf Abbildung 3-2 verwiesen). Die Zahlen unter den Banden geben das Verhältnis zur entsprechenden Beladungskontrolle an; n.d. bedeutet nicht detektierbar. Zu den dargestellten Daten trugen Experimente von Rico Brendtke, Ines Elsner, Dorothea Graus, Nadine Günther und Astrid Katzer bei (siehe Abschlussarbeiten R. Brendtke und D. Graus). Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Es ist deutlich sichtbar, dass PTEN in der *PTEN*-mutierten U87-MG Zelllinie nicht detektierbar war. Dies korreliert auch mit der deutlich erhöhten Expression von p-Akt (vgl. blaue Hervorhebung) und p-mTOR (vgl. rote Hervorhebung) in unbehandelten U87-MG Zellen im Vergleich zur *PTEN*-Wildtyp Zelllinie DK-MG, da beide Proteine durch das Tumorsuppressorprotein PTEN negativ reguliert werden.

Inkubation von DK-MG Zellen mit NVP-BEZ235 für 24 h vor der Bestrahlung (Behandlungsschema I) führte nur zur geringen Änderungen in der Proteinexpression von

PI3K p110 und PI3k p85. Deutlich erhöht hingegen war die Expression von p-Akt (vgl. laue Hervorhebung 0,26→0,55 relative Einheiten) und p-mTOR (vgl. rote Hervorhebung 0,33→0,67 relative Einheiten) nach 24-stündiger Inkubation mit dem dualen Inhibitor, was einer Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalweges entspricht. Wie in Abbildung 4-4 dargestellt, wurde diese Aktivierung der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade bei Behandlungsschema I auch 24 und 48 h Stunden nach Bestrahlung beobachtet. In der U87-MG Zelllinie konnte diese Aktivierung der Signalkaskade 30 min nach Bestrahlung bei Behandlungsschema I nur in deutlich geringerem Maß bei p-Akt (vgl. blaue Hervorhebung 1,06→1,24 relative Einheiten) beobachtet werden (vgl. Abbildung 4-3). Wurden die Zellen hingegen gemäß Schema II mit NVP-BEZ235 behandelt, so wurde in beiden Zelllinien eine Reduzierung von p-AKT und p-mTOR detektiert (vgl. blaue und rote Hervorhebungen Abbildung 4-3). Dies entspricht einer Inhibition des PI3K/Akt/mTOR Signalweges. In den beiden anderen untersuchten Zelllinien GaMG und U373 wurden qualitativ ähnliche Ergebnisse beobachtet (vgl. Abbildung 4-5 und Abbildung 4-6).

Weiterhin wurde die Expression der mTOR nachgeschalteten Translationsregulatoren p-S6 und p-4E-BP1 untersucht, welche das Zellwachstum und den Zellzyklus beeinflussen (Fingar u. a., 2004; Foster u. a., 2010). Bei Behandlung gemäß Schema I war die Expression von p-S6 in allen untersuchten Zelllinien 30 min nach Bestrahlung deutlich reduziert (vgl. grüne Hervorhebung in Abbildung 4-3 und Abbildung 4-5 jeweils A und B), wobei sich das p-S6 Expressionsniveau im Fortgang des Versuchs an das Niveau un behandelter Zellen anglich (vgl. grüne Hervorhebung in Abbildung 4-4 und Abbildung 4-6 jeweils A und B). Wurden die Zellen mit NVP-BEZ235 gemäß Schema II behandelt, so wurden 30 min nach Bestrahlung lediglich geringe Veränderungen im p-S6 Expressionsniveau beobachtet (vgl. grüne Hervorhebung in Abbildung 4-3 und Abbildung 4-5 jeweils C und D). Allerdings wurde bei Behandlungsschema II in allen untersuchten Zelllinien eine Depletion von p-S6 24 und 48 h nach Bestrahlung beobachtet (vgl. grüne Hervorhebung in Abbildung 4-4 und Abbildung 4-6 jeweils C und D).

Das Expressionsniveau von p-4E-BP1 änderte sich in allen untersuchten Zelllinien bei Behandlung mit NVP-BEZ235 gemäß Schema I während des gesamten Versuchsverlaufes nur minimal (vgl. gelbe Hervorhebung in Abbildung 4-3, Abbildung 4-4, Abbildung 4-5 und Abbildung 4-6 jeweils A und B). Wurden die Tumorzellen hingegen gemäß Schema II behandelt, so wurde bereits 30 min nach Bestrahlung eine deutliche Redukti-

on des p-4E-BP1 Expressionsniveaus detektiert (vgl. gelbe Hervorhebung in Abbildung 4-3 und Abbildung 4-5 jeweils C und D). Fortwährende Inkubation mit NVP-BEZ235 verstärkte diesen Effekt in den vier untersuchten Zelllinien, sodass 24 und 48 h nach Bestrahlung p-4E-BP1 nahezu vollständig depletiert war (vgl. gelbe Hervorhebung in Abbildung 4-4 und Abbildung 4-6 jeweils C und D).

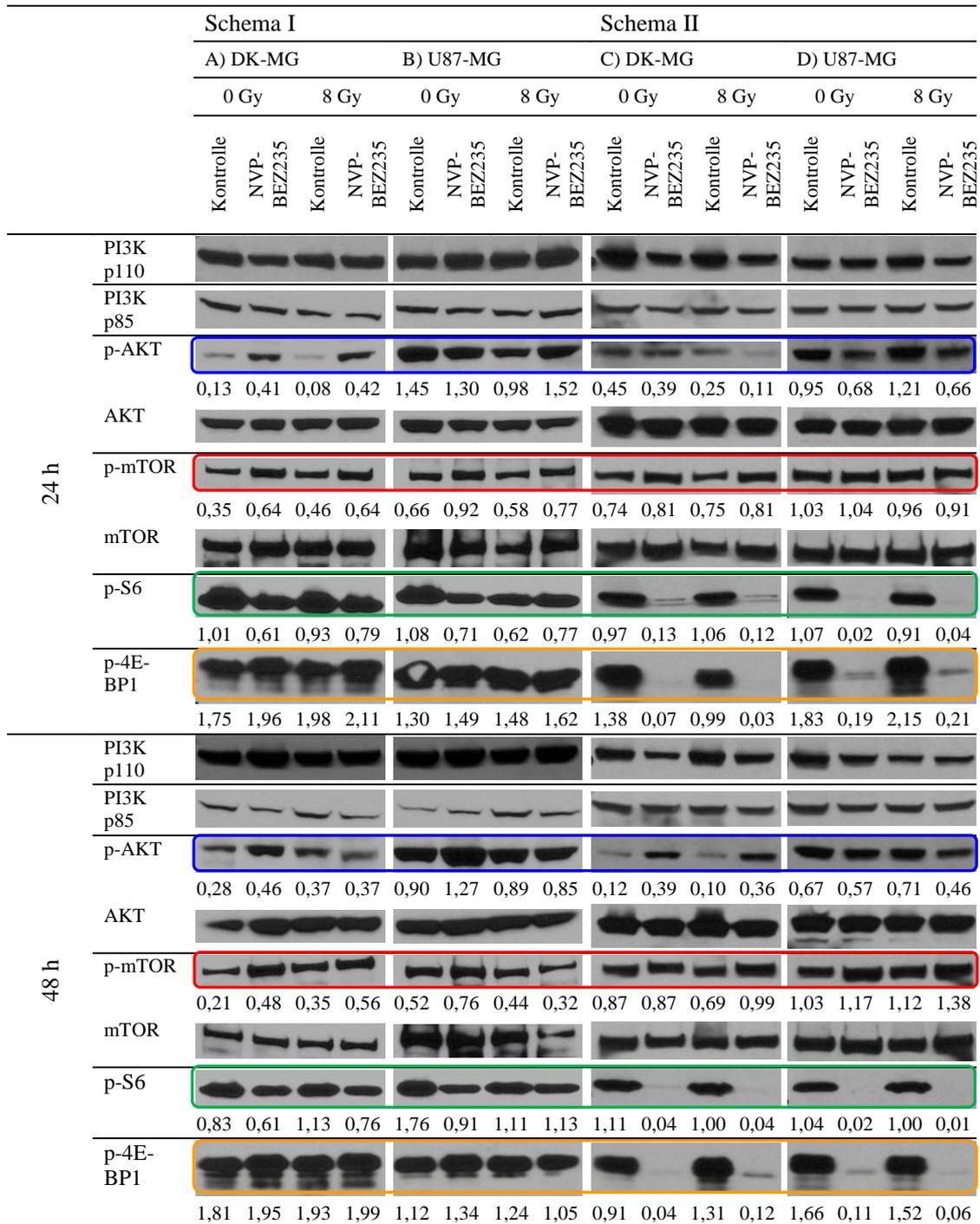


Abbildung 4-4 Western blot relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in DK-MG und U87-MG Zellen 24 und 48 h nach Bestrahlung

Repräsentative Western blot Ergebnisse von DK-MG (A und C) und U87-MG (B und D) 24 (oberes Panel) und 48 h (unteres Panel) nach Bestrahlung. Die Zellen wurden mit 100 nM NVP-BEZ235 gemäß Schema I (A und B) oder Schema II (C und D) behandelt (für weitere Details wird auf Abbildung 3-2 verwiesen). Die Zahlen unter den Banden geben das Verhältnis zur entsprechenden Beladungskontrolle an. Zu den dargestellten Daten trugen Experimente von Rico Brendtke, Ines Elsner, Dorothea Graus, Nadine Günther und Astrid Katzer bei (siehe Abschlussarbeiten R. Brendtke und D. Graus). Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

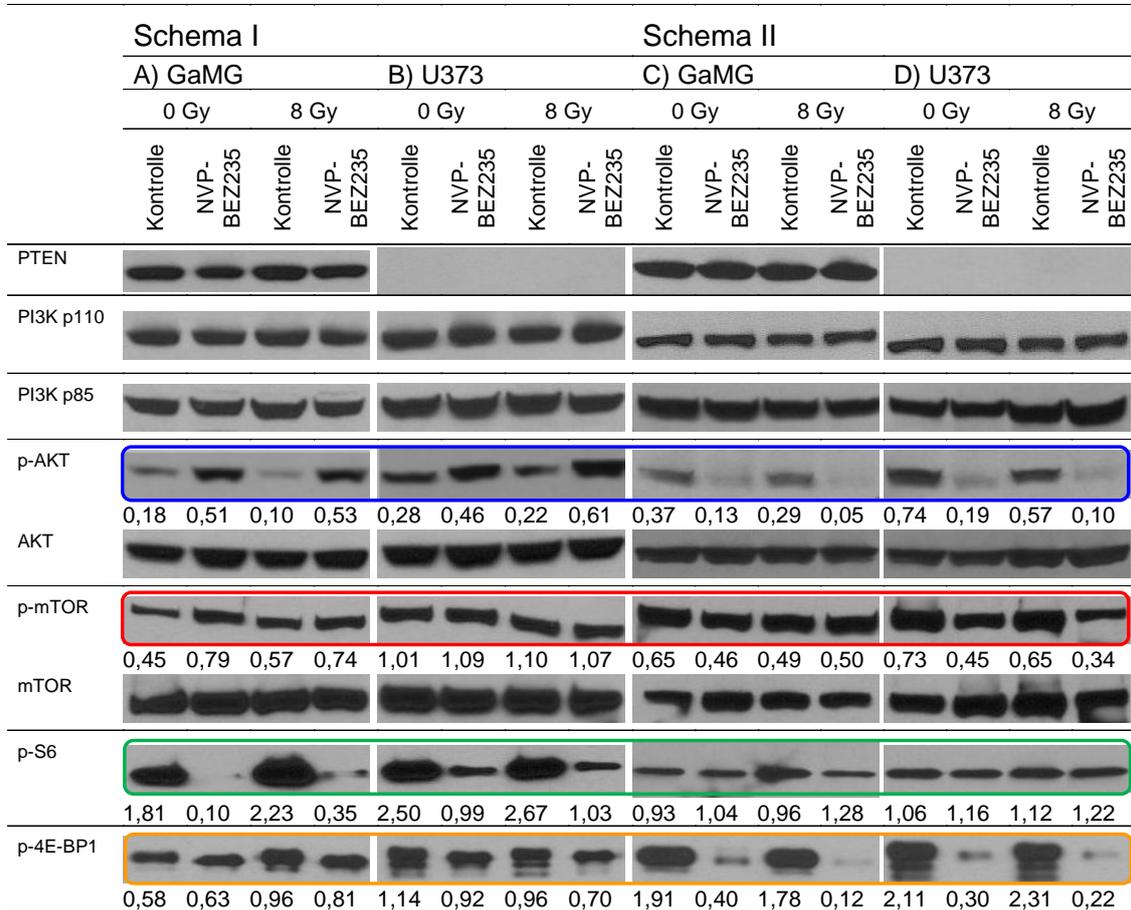


Abbildung 4-5 Western blot relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in GaMG und U373 Zellen 30 min nach Bestrahlung

Repräsentative Western blot Ergebnisse von GaMG (A und C) und U373 (B und D) 30 min nach Bestrahlung. Die Zellen wurden mit 100 nM NVP-BEZ235 gemäß Schema I (A und B) oder Schema II (C und D) behandelt (für weitere Details wird auf Abbildung 3-2 verwiesen). Die Zahlen unter den Banden geben das Verhältnis zur entsprechenden Beladungskontrolle an. Zu den dargestellten Daten trugen Experimente von Ines Elsner, Nadine Günther und Astrid Katzer bei. Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

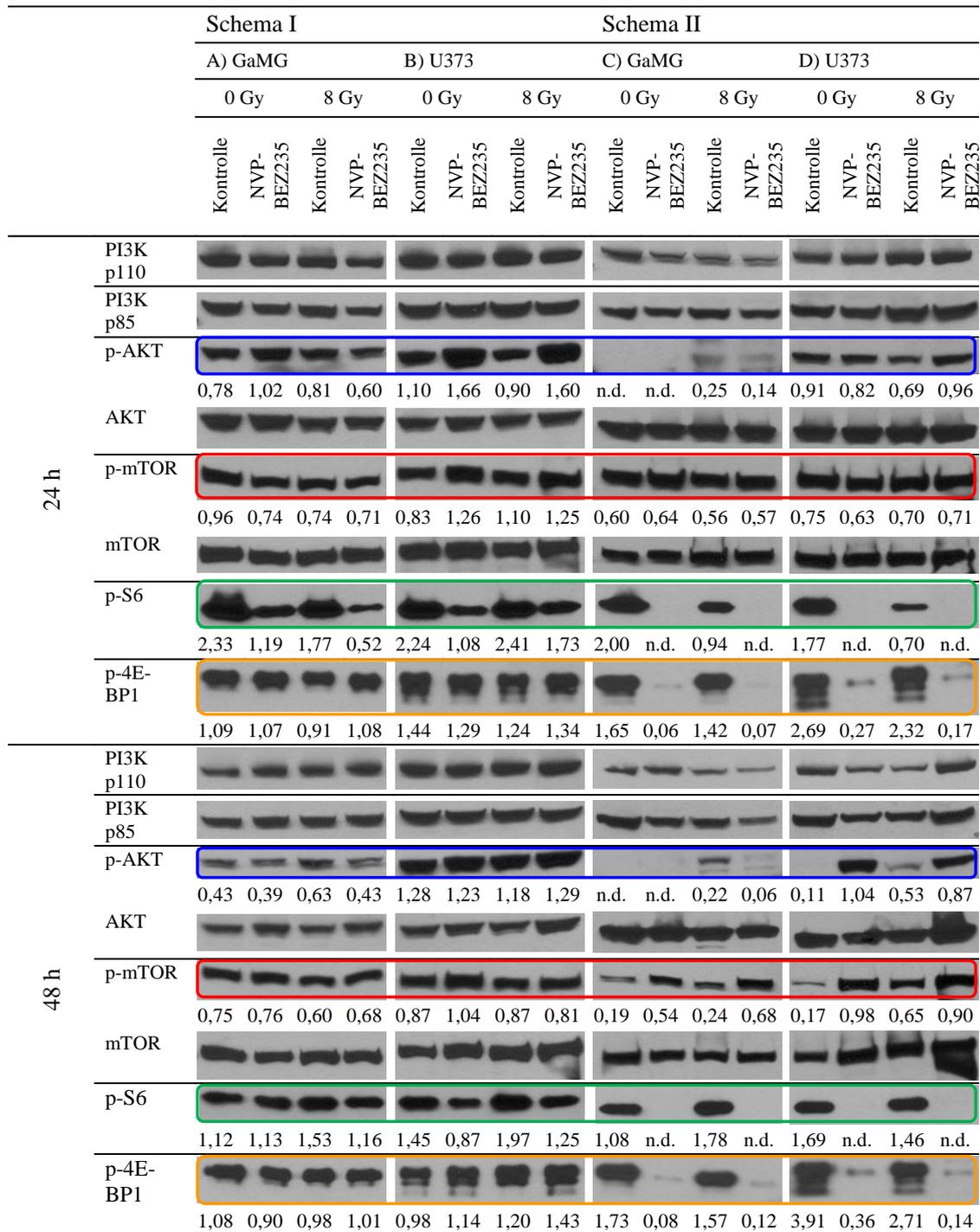


Abbildung 4-6 Western blot relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in GaMG und U373 Zellen 24 und 48 h nach Bestrahlung

Repräsentative Western blot Ergebnisse von GaMG (A und C) und U373 (B und D) 24 und 48 h nach Bestrahlung. Die Zellen wurden mit 100 nM NVP-BEZ235 gemäß Schema I (A und B) oder Schema II (C und D) behandelt (für weitere Details wird auf Abbildung 3-2 verwiesen). Die Zahlen unter den Banden geben das Verhältnis zur entsprechenden Beladungskontrolle an; n.d. bedeutet nicht detektierbar. Zu den dargestellten Daten trugen Experimente von Ines Elsner, Nadine Günther und Astrid Katzer bei. Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

4.1.4 APOPTOSEINDUKTION DURCH BESTRAHLUNG UND NVP-BEZ235

Um genauer zu untersuchen, wie NVP-BEZ235 Glioblastomzellen in Abhängigkeit des Behandlungsschemas radiosensibilisiert, wurde eine der letzten Stufen der Apoptose – der Abbau der DNS – über das Auftreten einer hypodiploiden Fraktion durchflusszytometrisch quantifiziert. In Abbildung 4-7 ist diese hypodiploide Fraktion von GaMG Zellen, welche mit NVP-BEZ235 und IR gemäß den Schemata I und II behandelt wurden, 24 und 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy dargestellt. Eine Behandlung mit NVP-BEZ235 und IR nach Schema II erhöhte den Anteil apoptotischer Zellen 48 h nach Bestrahlung von 9,6 % (bestrahlte Kontrollzellen) auf 54,1 %, wohingegen eine Behandlung gemäß Schema I nur geringe Auswirkungen auf den Anteil hypodiploider Zellen hatte. Qualitativ ähnliche Ergebnisse wurden mit DK-MG und U373 Zellen, aber nicht in der Zelllinie U87-MG beobachtet. Dies ist in Abbildung 4-8, welche die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Versuchen zusammenfasst, dargestellt.

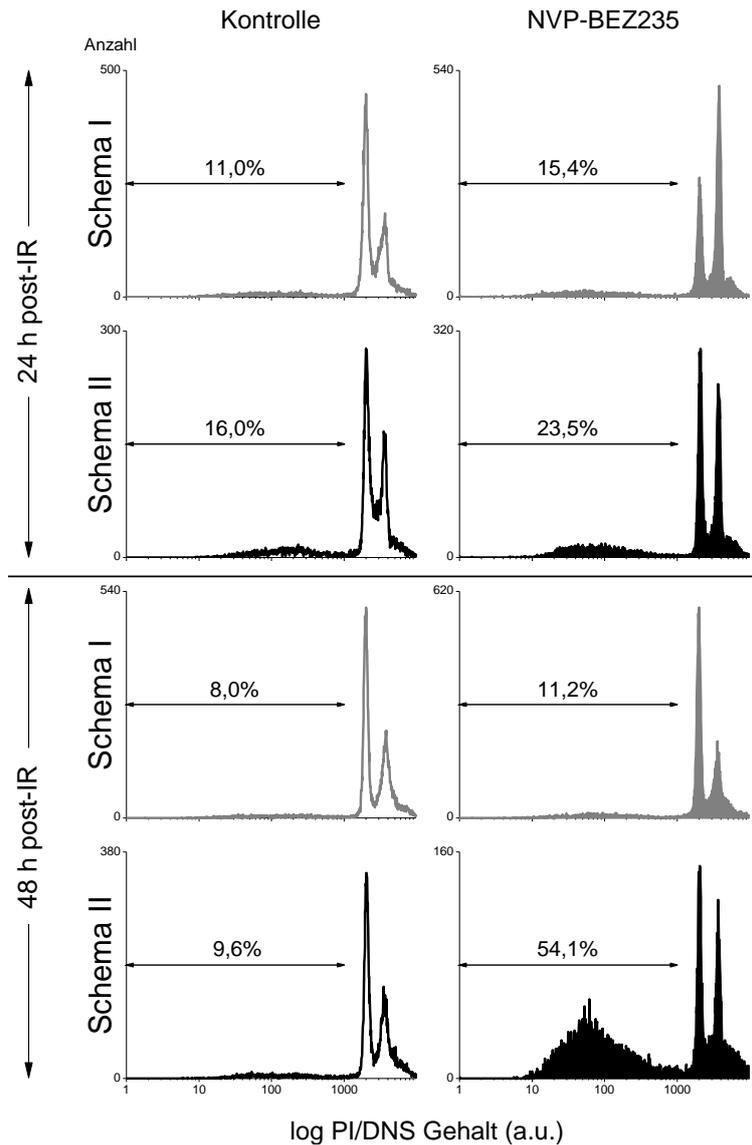


Abbildung 4-7 Repräsentative durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose in GaMG Zellen

Repräsentativer durchflusszytometrisch quantifizierter Anteil (in %) der Zellen mit hypodiploidem DNS-Gehalt in bestrahlten und NVP-BE235 behandelten GaMG Zellen. Die Zellen wurden entweder mit dem PI3K/mTOR Inhibitor nach Schema I (gefüllte graue Histogramme) oder Schema II (gefüllte schwarze Histogramme) behandelt. Die entsprechenden Kontrollproben wurden mit DMSO behandelt (ungefüllte Histogramme). Die Zellen wurden 24 und 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy durch Trypsinbehandlung abgelöst, mit Ethanol fixiert, mit RNase und PI behandelt und die entsprechende Fluoreszenz mit logarithmischer Verstärkung gemessen. Dargestellt ist der mittels der Flowing Software bestimmte prozentuale Anteil hypodiploider Zellkerne, wobei schon abgelöste und trypsinierte Zellen gemessen wurden. Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

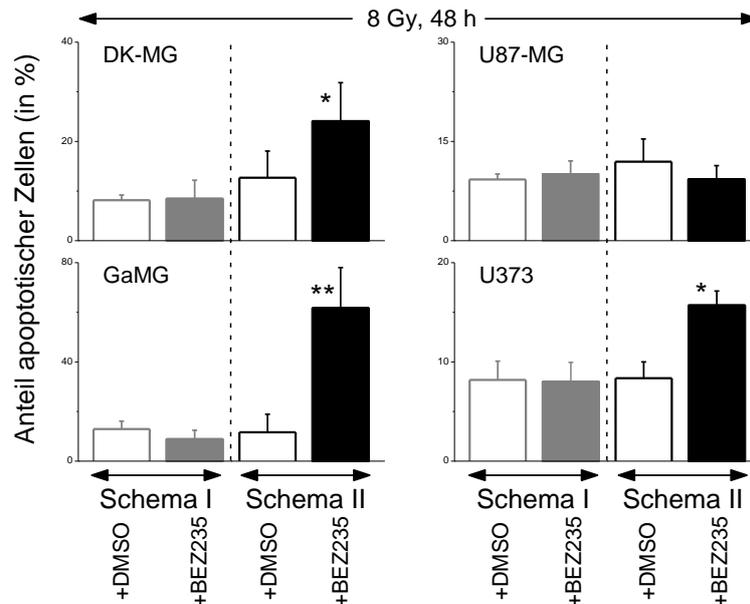


Abbildung 4-8 Mittelwerte apoptotischer Glioblastomzellen

DK-MG, GaMG, U87-MG und U373 Zellen wurden mit NVP-BE235 (gefüllte Balken) oder DMSO (ungefüllte Balken) gemäß Schema I (graue Balken) oder Schema II (schwarze Balken) behandelt. Der Anteil apoptotischer Zellen 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die Mittelwerte (\pm eine Standardabweichung) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet. Eine statistische Signifikanz ist wie folgt angegeben: * bedeutet $p < 0,05$ und ** bedeutet $p < 0,01$. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus und Paul Lutyj bei. Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Um eine mögliche Ursache für das Auftreten hypodiploider Zellen zu finden, wurde die Proteinexpression des DNS-Reparaturproteins PARP detektiert, welches im Rahmen des Zelltodes gespalten wird (Chaitanya u. a., 2010; Hosoya & Miyagawa, 2014). In Abbildung 4-9 ist daher das Expressionsniveau von PARP (obere Bande) und gespaltenes PARP (untere Bande) in den vier untersuchten Glioblastomzelllinien in Abhängigkeit vom Behandlungsschema und der Bestrahlung exemplarisch dargestellt. Es wird deutlich, dass die Expression und der Abbau von PARP 30 min nach Bestrahlung in keiner der untersuchten Zelllinien weder nach Behandlung mit NVP-BE235 gemäß Schema I noch nach Behandlung gemäß Schema II nennenswert verändert waren (vgl. Abbildung 4-9). Vierundzwanzig und achtundvierzig Stunden nach Bestrahlung hingegen wurde mit Ausnahme von U87-MG in allen untersuchten Zelllinien ein erhöhtes Niveau an gespaltenem PARP nach Bestrahlung detektiert. Wurden die Zellen zusätzlich zur Bestrahlung mit NVP-BE235 gemäß Schema I behandelt, so wurde 24 und 48 h nach Bestrahlung paradoxerweise ein niedrigeres gespaltenes PARP Level detektiert als nach alleiniger Bestrahlung. Wurden die Zellen hingegen gemäß Schema II behandelt und bestrahlt, so wurde bei DK-MG Zellen eine leichtere Reduktion von gespaltenem PARP als bei Schema I beobachtet. In den beiden *TP53* mutierten Zelllinien

GaMG und U373 hingegen wurde nach einer Behandlung und Bestrahlung gemäß Schema II 24 und 48 h nach IR sogar ein erhöhtes Level von gespaltenem PARP detektiert.

A) DK-MG & U87-MG

PARP Cl. PARP	DK-MG								U87-MG							
	Schema I				Schema II				Schema I				Schema II			
	0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy	
	Kontrolle	NVP- BEZ235														
30 min									n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,31	n.d.	0,09	n.d.	n.d.	0,09	n.d.	n.d.	0,07	n.d.	n.d.
24 h									n.d.		n.d.		0,13		0,15	
	0,48	0,10	0,73	0,21	0,61	0,34	0,61	0,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
48 h									n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
	0,19	n.d.	0,58	0,11	0,17	n.d.	0,67	0,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,15

B) GaMG & U373

PARP Cl. PARP	GaMG								U373							
	Schema I				Schema II				Schema I				Schema II			
	0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy	
	Kontrolle	NVP- BEZ235														
30 min									n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	
	0,10	0,12	n.d.	n.d.	0,08	n.d.	0,07	0,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24 h									n.d.		0,09		0,27		0,24	
	1,09	n.d.	0,39	n.d.	n.d.	n.d.	0,32	1,72	n.d.	0,09	0,27	0,24	0,26	0,36	0,50	0,57
48 h									n.d.		n.d.		0,24		n.d.	
	0,42	0,34	0,88	0,85	0,38	0,45	0,58	1,55	n.d.	n.d.	0,24	n.d.	n.d.	n.d.	0,35	0,69

Abbildung 4-9 Western blot des DNS-Reparaturproteins PARP sowie seiner gespaltenen Form

Repräsentative Western blot Ergebnisse von DK-MG und U87-MG (A) sowie von GaMG und U373 (B) 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung. Die Zellen wurden mit 100 nM NVP-BEZ235 gemäß Schema I oder Schema II behandelt (für weitere Details wird auf Abbildung 3-2 verwiesen). Die Zahlen unter den

Banden geben das Verhältnis von gespaltenem PARP zur entsprechenden Beladungskontrolle an; n.d. bedeutet nicht detektierbar. Die Daten sind mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press aus Kuger et al. 2013 entnommen.

Wie bereits erwähnt, war die Spaltung von PARP in den DK-MG, GaMG und U373 deutlich stärker ausgeprägt als in U87-MG Zellen. Dies korreliert weitestgehend mit dem erhöhten Anteil an hypodiploiden Zellen 48 h nach IR in den nach Schema II behandelten Zelllinien, da auch bei diesem Experiment ein signifikant erhöhtes Niveau an hypodiploiden Zellen lediglich in den DK-MG, den GaMG und den U373 Zellen gemessen wurde.

4.1.5 INDUKTION UND ABBAU VON DNS-DOPPELSTRANGBRÜCHEN

Die Induktion von DNS-Schäden durch die zwei verschiedenen Behandlungsmodalitäten und Bestrahlung wurde im Durchflusszytometer durch eine Immunfluoreszenzfärbung des Histonproteins γ H2AX untersucht. Das Histonprotein H2AX wird bei DNS-Doppelstrangbrüchen am Serinrest 139 phosphoryliert und ist somit ein sensitiver Marker für DNS-Schäden (Rogakou u. a., 1998). Die Proben für die Untersuchung der γ H2AX Expression wurden 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung, wie im Kapitel 3.2.6.1 genauer beschrieben, fixiert.

Exemplarische Daten für die γ H2AX Expression nach Behandlung mit NVP-BEZ235 und Bestrahlung sind in Abbildung 4-10 dargestellt, wohingegen in Abbildung 4-11 die Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Versuchen gezeigt werden. Wie in Abbildung 4-10 und Abbildung 4-11 dargestellt, hatte eine Behandlung mit NVP-BEZ235 gemäß Schema I in den getesteten Glioblastomzelllinien lediglich geringe Effekte auf die γ H2AX Expression 30 min nach Bestrahlung. Wurden die Zellen hingegen mit NVP-BEZ235 gemäß Schema II behandelt und bestrahlt, so wurden in den Zelllinien DK-MG, U87 und U373 30 min nach Bestrahlung sogar eine verringerte γ H2AX Expression als in den mit DMSO behandelten Proben gemessen (vgl. Abbildung 4-11).

In gemäß Schema I behandelten und bestrahlten Zellen wurde in allen vier untersuchten Zelllinien auch 24 und 48 h nach Bestrahlung kein nennenswerter Unterschied zwischen den mit NVP-BEZ235 und den mit DMSO behandelten Zellen gemessen. Ebenso wurden in den gemäß Schema II behandelten Zellen 24 h nach IR in den beiden *TP53* wildtypischen Zelllinien DK-MG und U87-MG keine Unterschiede zwischen den behandelten und den Kontrollproben festgestellt. In den *TP53* mutierten Zelllinien GaMG und U373 hingegen wurde 24 h nach Bestrahlung in den mit NVP-BEZ235 nach Schema II

behandelten Zellen ein deutlich erhöhtes γ H2AX Level gemessen. Diese Verringerung der Reparaturkapazität von DNS-Schäden in Abhängigkeit vom Behandlungsschema wurde 48 h nach Bestrahlung ebenfalls in DK-MG und U87 Zellen gemessen (vgl. Abbildung 4-11). Wie schon 24 h nach Bestrahlung wurde auch 48 h nach Bestrahlung eine erhöhte Expression von γ H2AX in GaMG und U373 Zellen gemessen, wenn diese mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor gemäß Schema II behandelt wurden. Allerdings waren diese residualen DNS-Schäden in beiden *TP53* mutierten Zelllinien GaMG und U373 deutlich stärker ausgeprägt als in den beiden *TP53* wildtypischen Zelllinien DK-MG und U87-MG.

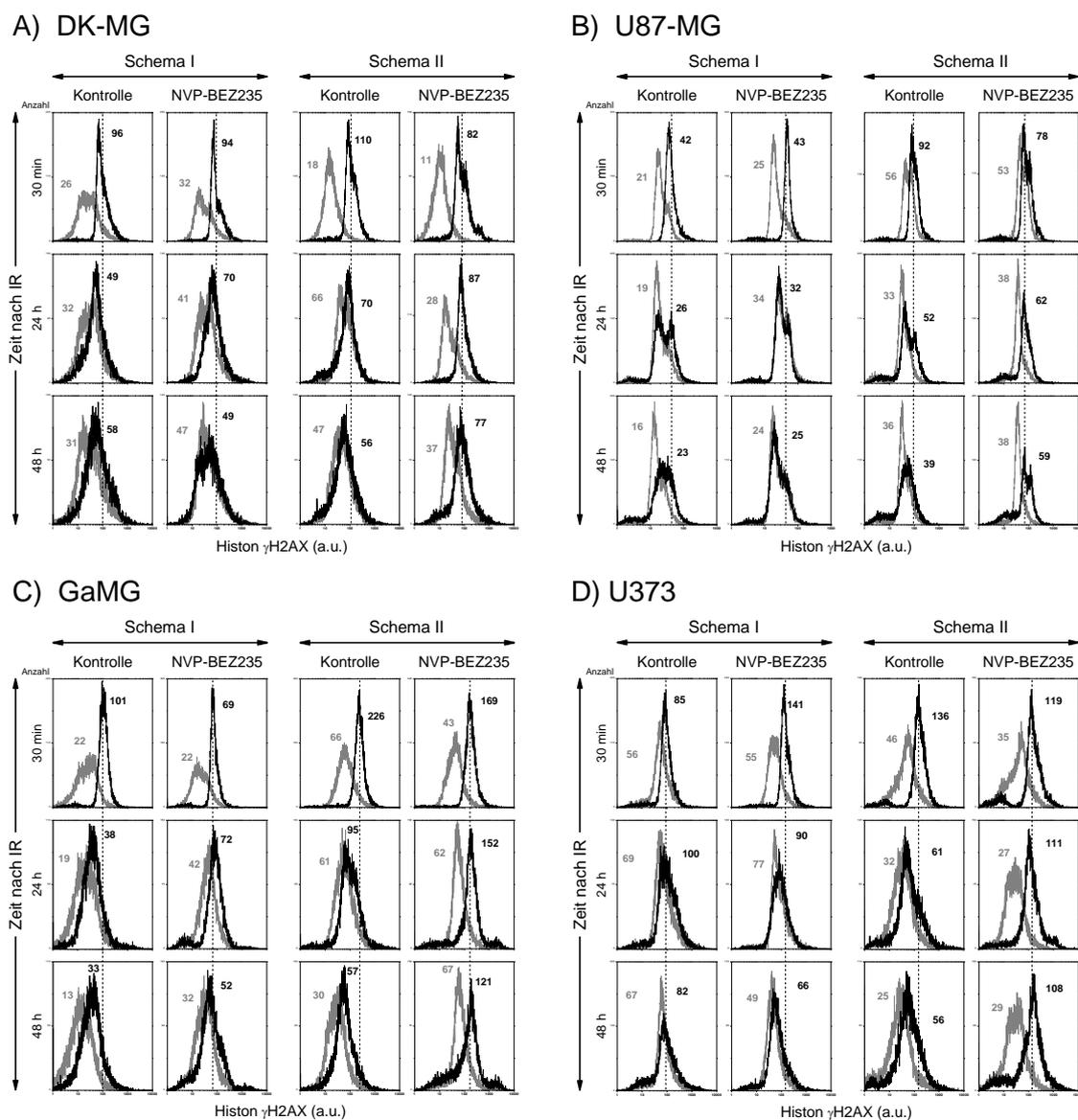


Abbildung 4-10 Repräsentative Verteilung des Histons γ H2AX in Glioblastomzellen

Durchflusszytometrisch über Immunfluoreszenzfärbung gemessene repräsentative Verteilung des Histons γ H2AX in DK-MG (A), U87-MG (B), GaMG (C) und U373 (D) Zellen, welche 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert wurden. Die Zellen wurden mit NVP-BEZ235 gemäß Schema I (jeweils die beiden linken Spalten pro Panel) oder II (jeweils die beiden rechten Spalten pro Panel) behandelt. Schwarze und graue Histogramme stellen bestrahlte und unbestrahlte Proben dar. Die Zahlen beschreiben die mittlere γ H2AX Expression in jeder Probe. Zur besseren Visualisierung der Reparatur von DNS-Schäden wurde die mittlere Expression von γ H2AX bei 8 Gy 30 min durch eine gestrichelte Linie längs über das Panel eingezeichnet. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus und Paul Lutjy bei. Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

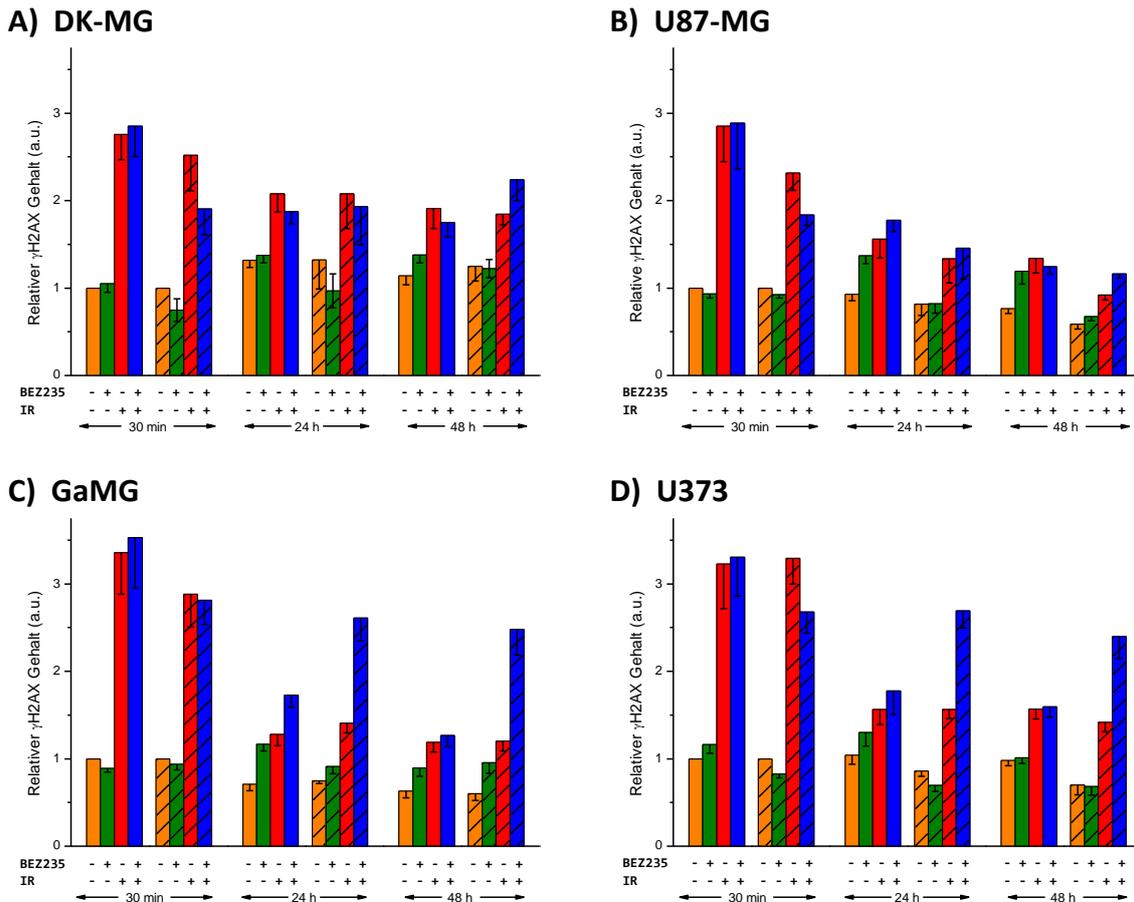


Abbildung 4-11 Mittelwerte der Verteilung des Histons γ H2AX in Glioblastomzellen

Dargestellt sind die auf 0 Gy 30 min DMSO normierten Mittelwerte (\pm SE) aus mindestens vier unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen der Immunfluoreszenz des nuklearen Histons γ H2AX in DK-MG (A), U87-MG (B), GaMG (C) und U373 (D) Zellen, welche 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert wurden. Die Zellen wurden mit DMSO (orange und rote Säulen) oder NVP-BEZ235 (grüne und blaue Säulen) gemäß Schema I (ungestrichelte Säulen) oder Schema II (gestrichelte Säulen) behandelt und mit einer Dosis von 0 (orange und grüne Säulen) oder 8 Gy (rote und blaue Säulen) bestrahlt. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus und Paul Lutjy bei.

Da in allen vier untersuchten Zelllinien nach Bestrahlung und Behandlung mit NVP-BEZ235 gemäß Schema II eine verzögerte Reparatur der DNS-Schäden beobachtet wurde und da bereits ein Zusammenhang zwischen dem dualen Inhibitor und der DNS-Doppelstrangbruchreparatur publiziert ist (Mukherjee u. a., 2012), wurden die

Expressionslevels des DNS-Reparaturproteins Rad51 mittels Western blots bestimmt. Wie in Abbildung 4-12 dargestellt, inhibiert NVP-BEZ235 die Expression des DNS-Reparaturproteins Rad51. Wurden die Zellen gemäß Schema I behandelt, so konnte in DK-MG, U87-MG und GaMG eine deutlich verringerte Expression von Rad51 30 min nach Bestrahlung beobachtet werden (vgl. Abbildung 4-12). Allerdings wurden bereits 24 h nach Bestrahlung, also ca. einen Tag nach dem Auswaschen des Inhibitors, bei Behandlungsschema I keine relevanten Unterschiede zu den Kontrollproben mehr detektiert.

A) DK-MG & U87-MG

Rad 51 (43 kDa)	DK-MG								U87-MG							
	Schema I				Schema II				Schema I				Schema II			
	0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy	
	Kontrolle	NVP- BEZ235														
30 min	0,62	0,31	0,56	0,32	0,77	0,73	0,64	0,64	0,61	0,18	1,00	0,49	1,63	1,85	1,92	1,97
24 h	0,59	0,73	0,69	0,69	0,71	0,48	0,70	0,60	0,87	0,81	0,82	0,76	1,73	0,81	1,53	1,19
48 h	0,53	0,38	0,54	0,29	0,51	0,13	0,52	0,49	0,88	0,56	0,38	0,31	1,58	0,86	1,31	0,59

B) GaMG & U373

Rad 51 (43 kDa)	GaMG								U373							
	Schema I				Schema II				Schema I				Schema II			
	0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy		0 Gy		8 Gy	
	Kontrolle	NVP- BEZ235														
30 min	0,61	0,31	0,61	0,30	0,62	0,44	0,64	0,61	1,14	0,84	0,98	1,01	1,05	1,13	1,13	1,19
24 h	0,54	0,52	0,67	0,55	0,69	0,19	0,64	0,46	1,41	1,12	1,30	1,33	1,16	1,30	1,24	1,40
48 h	0,42	0,40	0,45	0,36	0,17	0,09	0,38	0,17	0,86	0,96	1,20	1,04	0,96	0,88	1,05	1,02

Abbildung 4-12 Repräsentative Expression von Rad51 in Glioblastomzellen

Repräsentative Expressionslevel des DNS-Reparaturproteins Rad51 in DK-MG und U87-MG (A) und GaMG und U373 (B) Zellen, die mit NVP-BEZ235 gemäß Schema I und II behandelt wurden. Die Lysate wurden 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung angefertigt und die Proben über Standard Western blot Verfahren aufgetrennt und detektiert. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt und die Zahlen spiegeln das Verhältnis zur jeweiligen Beladungskontrolle β -Aktin wider. Zu den dargestellten Daten trugen Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus, Nadine Günther und Astrid Katzer bei (siehe Abschlussarbeiten R. Brendtke und D. Graus). Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Wurden die Zellen hingegen gemäß Schema II mit NVP-BEZ235 behandelt, so konnte man 30 min nach Bestrahlung in allen Zelllinien kaum Unterschiede zu den Kontrollen beobachten (vgl. Abbildung 4-12). Mit fortschreitender Inkubationsdauer wurde allerdings eine deutliche Reduktion des Rad51 Expressionsniveaus in DK-MG, U87-MG und GaMG gemessen, was die verzögerte Reparatur der DNS-Schäden erklären kann (vgl. Abbildung 4-10).

4.1.6 EFFEKTE VON NVP-BEZ235 UND BESTRAHLUNG AUF DEN ZELLYKLUS

Um weitere Ursachen der Radiosensibilisierung von Glioblastomzelllinien, welche nur beim Behandlungsschema II aber nicht beim Schema I beobachtet wurde, zu ermitteln, wurden die Zellzyklusverteilungen nach Behandlung mit dem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor und Bestrahlung untersucht. In Abbildung 4-13 ist die Zellzyklusverteilung in DK-MG Zellen nach der Behandlung mit NVP-BEZ235 gemäß Schema I und II und Bestrahlung exemplarisch dargestellt, wohingegen die Mittelwerte für alle untersuchten Zelllinien in Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4 gezeigt werden. Die großen Anteile an Zellen in der S- und G2/M-Phase in unbehandelten Zellen zu Beginn der Experimente (vgl. Abbildung 4-13 und Tabelle 4-2) belegen, dass die Zellkultur in einer exponentiellen Wachstumsphase war, wobei hier beachtet werden muss, dass zelllinienspezifische Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen auftreten.

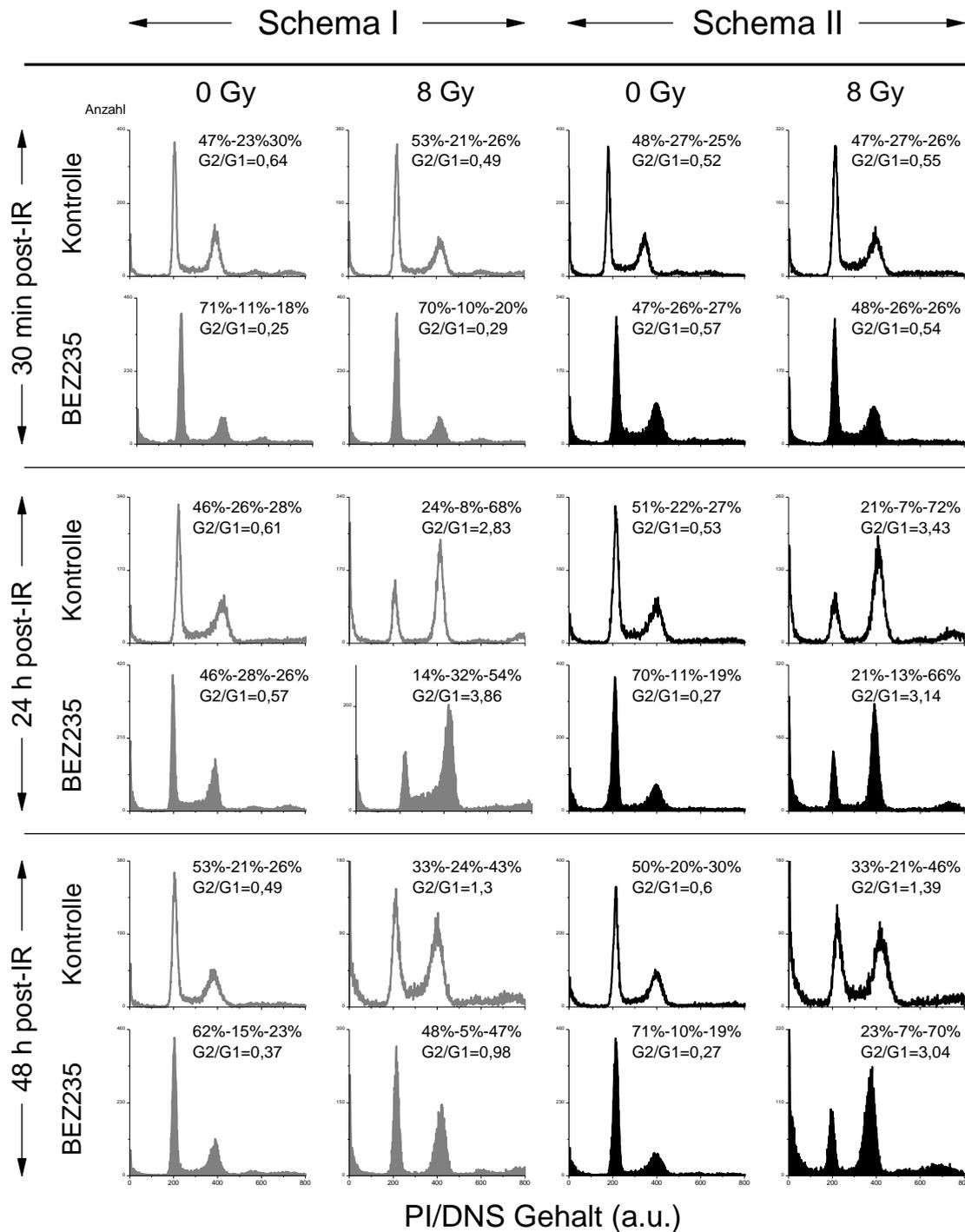


Abbildung 4-13 Repräsentative Zellzyklusverteilung in DK-MG Zellen

Repräsentative Darstellung der Effekte von NVP-BEZ235 Behandlung (gefüllte Histogramme) gemäß Schema I (graue Histogramme) und Schema II (schwarze Histogramme) auf den Zellzyklus in der DK-MG Zelllinie. Die Proben wurden 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert, permeabilisiert, mit RNase und PI behandelt und durchflusszytometrisch auf ihren DNS-Gehalt analysiert. Aus den DNS-Histogrammen wurde mittels der ModFit Software der Anteil an Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet und in den jeweiligen Histogrammen angegeben. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus und Paul Lutyj bei (siehe Abschlussarbeiten R. Brendtke und D. Graus). Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Tabelle 4-2 Zellzyklusphasenverteilung 30 min nach Bestrahlung in den untersuchten Glioblastomzelllinien

Dreißig Minuten nach Bestrahlung wurden die Tumorzellen fixiert, permeabilisiert, mit RNase und PI behandelt und durchflusszytometrisch auf ihren DNS-Gehalt analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm eine SD) von mindestens vier unabhangigen Wiederholungen. Fur eine genauere Beschreibung wird auf Abbildung 4-13 verwiesen. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus und Paul Lutyj bei (siehe Abschlussarbeiten R. Brendtke und D. Graus). Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Zelllinie	Behandlungsmodus		Go/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1	
DK-MG	Schema I	0 Gy	Kontrolle	53 \pm 4	22 \pm 3	26 \pm 3	0,49
			BEZ235	73 \pm 2	9 \pm 2	18 \pm 2	0,25
		8 Gy	Kontrolle	54 \pm 3	21 \pm 3	25 \pm 3	0,46
			BEZ235	74 \pm 2	10 \pm 2	17 \pm 2	0,23
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	46 \pm 4	28 \pm 3	26 \pm 3	0,57
			BEZ235	45 \pm 4	29 \pm 5	26 \pm 3	0,58
		8 Gy	Kontrolle	46 \pm 4	28 \pm 3	26 \pm 4	0,57
			BEZ235	46 \pm 5	28 \pm 3	26 \pm 4	0,57
U87-MG	Schema I	0 Gy	Kontrolle	70 \pm 3	20 \pm 3	10 \pm 2	0,14
			BEZ235	90 \pm 4	6 \pm 2	5 \pm 2	0,06
		8 Gy	Kontrolle	71 \pm 3	19 \pm 2	10 \pm 4	0,14
			BEZ235	89 \pm 3	6 \pm 1	5 \pm 2	0,06
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	51 \pm 8	28 \pm 3	22 \pm 6	0,43
			BEZ235	51 \pm 9	28 \pm 3	21 \pm 6	0,41
		8 Gy	Kontrolle	49 \pm 9	29 \pm 4	22 \pm 7	0,45
			BEZ235	50 \pm 9	28 \pm 4	22 \pm 6	0,44
GaMG	Schema I	0 Gy	Kontrolle	60 \pm 6	28 \pm 4	12 \pm 4	0,20
			BEZ235	80 \pm 3	11 \pm 4	9 \pm 4	0,11
		8 Gy	Kontrolle	61 \pm 7	27 \pm 5	12 \pm 5	0,20
			BEZ235	79 \pm 3	13 \pm 5	8 \pm 3	0,10
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	40 \pm 12	34 \pm 11	26 \pm 16	0,65
			BEZ235	41 \pm 11	36 \pm 11	23 \pm 16	0,56
		8 Gy	Kontrolle	40 \pm 12	35 \pm 12	25 \pm 16	0,63
			BEZ235	42 \pm 11	33 \pm 16	24 \pm 18	0,57
U373	Schema I	0 Gy	Kontrolle	67 \pm 6	17 \pm 3	16 \pm 5	0,25
			BEZ235	65 \pm 11	19 \pm 7	16 \pm 4	0,25
		8 Gy	Kontrolle	65 \pm 5	18 \pm 3	17 \pm 5	0,26
			BEZ235	62 \pm 10	21 \pm 6	17 \pm 5	0,27
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	36 \pm 8	37 \pm 13	28 \pm 10	0,78
			BEZ235	38 \pm 10	37 \pm 13	25 \pm 11	0,66
		8 Gy	Kontrolle	39 \pm 9	36 \pm 13	25 \pm 9	0,64
			BEZ235	38 \pm 10	37 \pm 13	24 \pm 11	0,63

Tabelle 4-3 Zellzyklusphasenverteilung 24 h nach Bestrahlung in den untersuchten Glioblastomzelllinien

Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung wurden die Tumorzellen fixiert, permeabilisiert, mit RNase und PI behandelt und durchflusszytometrisch auf ihren DNS-Gehalt analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm eine SD) von mindestens vier unabhängigen Wiederholungen. Für eine genauere Beschreibung wird auf Abbildung 4-13 verwiesen. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus und Paul Lutyj bei (siehe Abschlussarbeiten R. Brendtke und D. Graus). Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Zelllinie	Behandlungsmodus			Go/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1
DK-MG	Schema I	0 Gy	Kontrolle	49 \pm 3	24 \pm 4	27 \pm 3	0,55
			BEZ235	49 \pm 9	26 \pm 4	25 \pm 6	0,51
		8 Gy	Kontrolle	21 \pm 4	8 \pm 1	71 \pm 4	3,38
			BEZ235	22 \pm 12	31 \pm 4	47 \pm 12	2,14
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	55 \pm 6	22 \pm 2	23 \pm 6	0,42
			BEZ235	74 \pm 6	9 \pm 2	17 \pm 6	0,23
		8 Gy	Kontrolle	29 \pm 13	9 \pm 3	63 \pm 16	2,17
			BEZ235	27 \pm 16	11 \pm 3	62 \pm 13	2,30
U87-MG	Schema I	0 Gy	Kontrolle	71 \pm 3	18 \pm 2	10 \pm 1	0,14
			BEZ235	67 \pm 3	20 \pm 4	14 \pm 2	0,21
		8 Gy	Kontrolle	58 \pm 6	10 \pm 1	32 \pm 5	0,55
			BEZ235	56 \pm 8	19 \pm 4	25 \pm 6	0,45
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	68 \pm 8	20 \pm 2	12 \pm 6	0,18
			BEZ235	85 \pm 7	9 \pm 2	6 \pm 6	0,07
		8 Gy	Kontrolle	59 \pm 14	9 \pm 1	33 \pm 15	0,56
			BEZ235	58 \pm 17	4 \pm 3	37 \pm 15	0,64
GaMG	Schema I	0 Gy	Kontrolle	73 \pm 7	18 \pm 5	9 \pm 3	0,12
			BEZ235	50 \pm 14	26 \pm 5	24 \pm 4	0,48
		8 Gy	Kontrolle	65 \pm 6	17 \pm 4	17 \pm 4	0,26
			BEZ235	27 \pm 9	22 \pm 5	51 \pm 9	1,89
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	62 \pm 4	28 \pm 3	11 \pm 3	0,18
			BEZ235	79 \pm 6	12 \pm 5	9 \pm 2	0,11
		8 Gy	Kontrolle	55 \pm 12	26 \pm 4	19 \pm 6	0,35
			BEZ235	40 \pm 8	12 \pm 4	47 \pm 8	1,18
U373	Schema I	0 Gy	Kontrolle	67 \pm 7	12 \pm 2	21 \pm 5	0,31
			BEZ235	62 \pm 5	15 \pm 2	23 \pm 3	0,37
		8 Gy	Kontrolle	57 \pm 8	8 \pm 3	35 \pm 6	0,61
			BEZ235	37 \pm 8	14 \pm 3	49 \pm 8	1,32
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	64 \pm 5	18 \pm 4	19 \pm 3	0,30
			BEZ235	59 \pm 5	24 \pm 3	17 \pm 2	0,29
		8 Gy	Kontrolle	60 \pm 5	10 \pm 2	30 \pm 6	0,50
			BEZ235	24 \pm 27	12 \pm 5	64 \pm 27	2,67

Tabelle 4-4 Zellzyklusphasenverteilung 48 h nach Bestrahlung in den untersuchten Glioblastomzelllinien

Achtundvierzig Stunden nach Bestrahlung wurden die Tumorzellen fixiert, permeabilisiert, mit RNase und PI behandelt und durchflusszytometrisch auf ihren DNS-Gehalt analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm eine SD) von mindestens vier unabhängigen Wiederholungen. Für eine genauere Beschreibung wird auf Abbildung 4-13 verwiesen. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Rico Brendtke, Dorothea Graus und Paul Lutyj bei (siehe Abschlussarbeiten R. Brendtke und D. Graus). Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Zelllinie	Behandlungsmodus			Go/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	G2/G1
DK-MG	Schema I	0 Gy	Kontrolle	56 \pm 4	20 \pm 2	24 \pm 3	0,43
			BEZ235	66 \pm 7	13 \pm 5	20 \pm 4	0,30
		8 Gy	Kontrolle	39 \pm 4	24 \pm 2	37 \pm 3	0,95
			BEZ235	53 \pm 6	7 \pm 3	41 \pm 6	0,77
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	53 \pm 4	23 \pm 7	24 \pm 6	0,45
			BEZ235	72 \pm 3	10 \pm 4	18 \pm 2	0,25
		8 Gy	Kontrolle	37 \pm 3	23 \pm 3	40 \pm 3	1,08
			BEZ235	26 \pm 9	10 \pm 6	64 \pm 8	2,46
U87-MG	Schema I	0 Gy	Kontrolle	71 \pm 3	19 \pm 2	10 \pm 2	0,14
			BEZ235	70 \pm 3	19 \pm 2	11 \pm 3	0,16
		8 Gy	Kontrolle	59 \pm 2	17 \pm 2	24 \pm 2	0,41
			BEZ235	68 \pm 3	14 \pm 3	18 \pm 3	0,26
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	69 \pm 3	21 \pm 3	11 \pm 2	0,16
			BEZ235	82 \pm 2	12 \pm 1	6 \pm 2	0,07
		8 Gy	Kontrolle	54 \pm 2	20 \pm 2	27 \pm 2	0,50
			BEZ235	55 \pm 2	8 \pm 2	37 \pm 1	0,67
GaMG	Schema I	0 Gy	Kontrolle	87 \pm 4	5 \pm 3	8 \pm 2	0,09
			BEZ235	81 \pm 4	10 \pm 3	10 \pm 2	0,12
		8 Gy	Kontrolle	66 \pm 8	12 \pm 6	22 \pm 4	0,33
			BEZ235	65 \pm 4	18 \pm 4	17 \pm 3	0,26
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	77 \pm 8	12 \pm 5	11 \pm 3	0,14
			BEZ235	80 \pm 5	10 \pm 3	10 \pm 3	0,13
		8 Gy	Kontrolle	55 \pm 6	21 \pm 6	25 \pm 6	0,45
			BEZ235	40 \pm 7	11 \pm 4	49 \pm 9	1,23
U373	Schema I	0 Gy	Kontrolle	82 \pm 4	8 \pm 2	10 \pm 3	0,12
			BEZ235	79 \pm 4	9 \pm 2	12 \pm 2	0,15
		8 Gy	Kontrolle	62 \pm 8	16 \pm 4	22 \pm 5	0,35
			BEZ235	64 \pm 5	15 \pm 4	21 \pm 3	0,33
	Schema II	0 Gy	Kontrolle	70 \pm 3	14 \pm 2	16 \pm 2	0,23
			BEZ235	68 \pm 2	16 \pm 2	16 \pm 1	0,24
		8 Gy	Kontrolle	38 \pm 5	22 \pm 3	40 \pm 4	1,05
			BEZ235	12 \pm 5	14 \pm 2	74 \pm 6	6,17

Eine Inkubation von Zellen mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 nach Behandlungsschema I resultierte in einer Erhöhung des Anteils von Zellen in der G1-

Phase in den DK-MG, U87-MG und GaMG Zelllinien. Nach dem Auswaschen der Substanz normalisierte sich der Zellzyklus (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) in den nach Schema I behandelten Proben (vgl. Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4).

Unabhängig vom Behandlungsschema konnte 24 h nach Bestrahlung mit 8 Gy eine Anhäufung an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus in allen bestrahlten Proben beobachtet werden. Bemerkenswert war hierbei, dass es bei Behandlung mit NVP-BEZ235 nach Schema II zusätzlich zu einer Depletion der S-Phase kam. Der G2/M-Arrest, welcher 24 h nach Bestrahlung beobachtet wurde, war in den nach Schema I behandelten Zellen allerdings reversibel und die Zellzyklusverteilung normalisierte sich 48 h nach IR (vgl. Abbildung 4-13 und Tabelle 4-4). DK-MG, U87-MG und GaMG Zellen, die hingegen bestrahlt und mit NVP-BEZ235 gemäß Schema II behandelt wurden, zeigten einen stabilen G2/M-Arrest, der auch 48 h nach der Bestrahlung noch nachweisbar war (vgl. Abbildung 4-13 und Tabelle 4-4).

4.2 RADIOSENSIBILISIERUNG HUMANER BRUSTKREBSZELLINIEN DURCH NVP-BEZ235 UNTER HYPOXIE

Um den Einfluss des Sauerstoffgehalts auf den Effekt einer NVP-BEZ235 Behandlung in Kombination mit Bestrahlung zu untersuchen, wurden *in vitro* Versuche zur Proliferation, dem zellulären Überleben nach Bestrahlung, der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade, der Apoptose, der Autophagie, dem DNS-Schaden und dem Zellzyklus in zwei Mammakarzinomzelllinien durchgeführt.

4.2.1 EFFEKTE VON NVP-BEZ235 AUF DIE ZELLPROLIFERATION IN NORMOXISCHEN UND HYPOXISCHEN BEDINGUNGEN

Um die Auswirkungen von NVP-BEZ235 auf die Proliferation der beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 zu untersuchen, wurden beide Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen (6,25-800 nM) des dualen PI3K/mTOR Inhibitors für 24 h behandelt und die Zellviabilität mittels eines MTS-basierten Tests gemessen. Die Formazanproduktion von NVP-BEZ235 behandelten Proben, welche bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen wurde, wurde hierbei auf DMSO behandelte Kontrollproben normalisiert und gegen die NVP-BEZ235 Konzentration aufgetragen. Wie in Abbildung 4-14 dargestellt ist, verringert eine vierundzwanzigstündige Inkubation mit NVP-BEZ235 unter normoxischen Kulturbedingungen die metabolische Aktivität, welche mit der Zellviabilität gleichzusetzen ist (Riss u. a., 2004), auf ungefähr 75 % (MDA-MB-231) und 65 % (MCF-7) im Vergleich zu den Kontrollproben. Unter hypoxischen Bedingungen (1 % Sauerstoff) wurden sogar noch stärkere antiproliferative Effekte durch NVP-BEZ235 beobachtet: Hier wurde durch den dualen PI3K/mTOR Inhibitor die Zellviabilität auf ungefähr 55 % des Kontrolllevels verringert. Für weitere Versuche wurde eine Konzentration von 100 nM gewählt. Bei dieser Dosis, welche im Einklang mit bereits publizierten Studien ist (Kuger u. a., 2013; Maira u. a., 2008; Manara u. a., 2010), wurde eine Wachstumsinhibition von ungefähr 80 % des maximalen Effekts in beiden Zelllinien beobachtet.

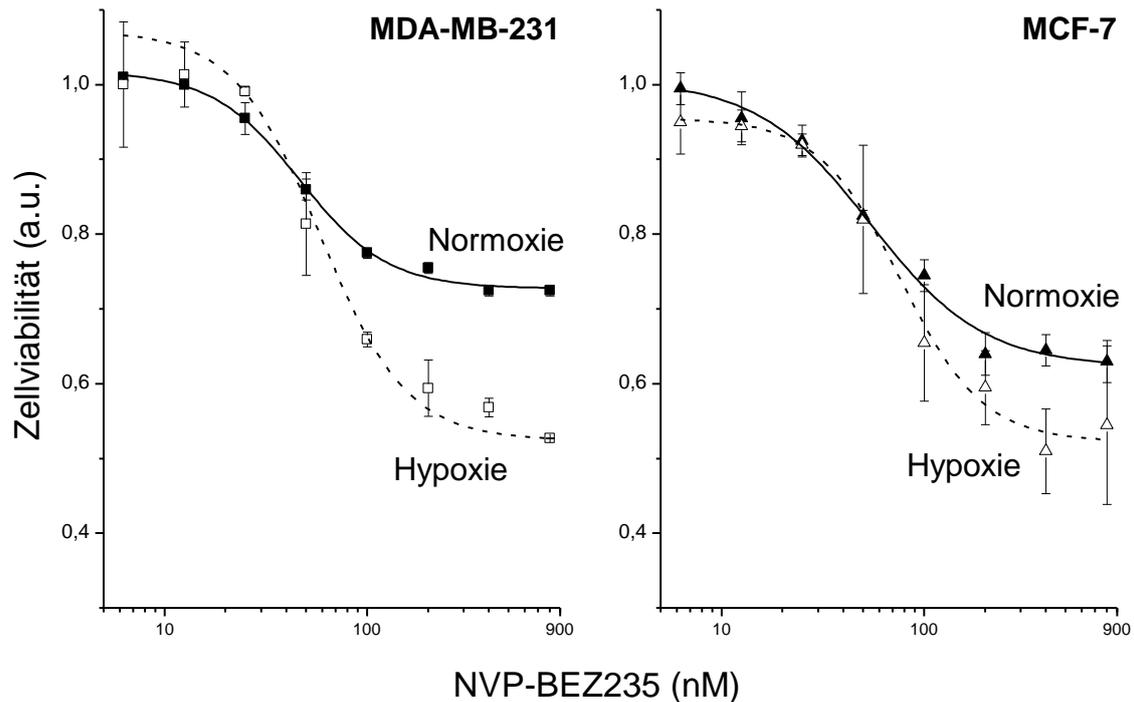


Abbildung 4-14 MTS Test von Brustkrebszelllinien

Dargestellt ist der Effekt von 24 stündiger Inkubation mit verschiedenen NVP-BEZ235 Dosen in den beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 (Quadrate) und MCF-7 (Dreiecke) unter normoxischen (gefüllte Symbole) und hypoxischen Kulturbedingungen (ungefüllte Symbole). Die Zellviabilität wurde mittels eines Standard MTS Assays untersucht. Im Diagramm sind die auf die mit DMSO behandelten Zellen normierten Mittelwerte (\pm eine SD) aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Die Daten wurden an das 4PLM angepasst; die beste Anpassung ist im Diagramm eingezeichnet. Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

4.2.2 EINFLUSS DER SAUERSTOFFKONZENTRATION, NVP-BEZ235 UND BESTRAHLUNG AUF DIE KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT

Um zu validieren, dass die Strahlensensitivität der untersuchten Zelllinien von der Sauerstoffsättigung abhängig ist, wurden Koloniebildungstests mit Zellen durchgeführt, welche unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen kultiviert wurden. Wie in Abbildung 4-15 dargestellt, sind hypoxische Zellen strahlenresistenter, wodurch sie eine von der Sauerstoffkonzentration abhängige erhöhte Überlebensfraktion nach Bestrahlung aufweisen. Für die weiteren Hypoxie und Reoxygenierungsversuche wurde eine Sauerstoffkonzentration von 1 % gewählt, da diese Konzentration zum einen signifikante Unterschiede in Bezug auf die Strahlenresistenz zeigt und sie zum anderen den physiologisch vorherrschenden Zustand einer milden Hypoxie in soliden Brustkrebstumoren widerspiegelt (Vaupel u. a., 1991).

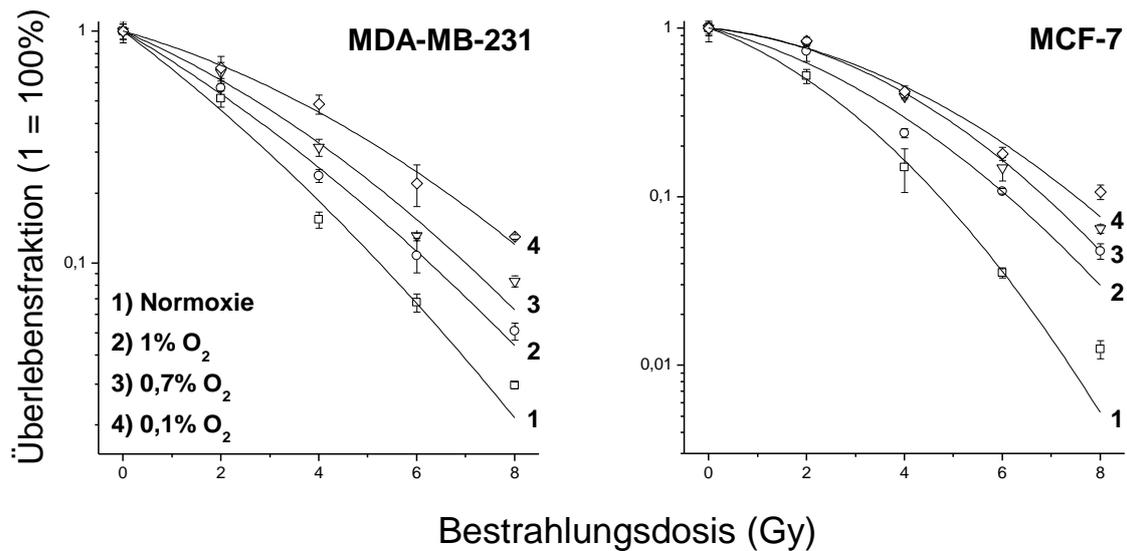


Abbildung 4-15 Koloniebildungstests unter verschiedener Sauerstoffkonzentrationen kultivierter Brustkrebszellen

Repräsentative Koloniebildungstests der beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MCF-7. Die Zellen wurden in verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (1) Normoxie, 2) 1 %, 3) 0,7 % und 4) 0,1 % Sauerstoff) kultiviert und bestrahlt. Vierundzwanzig Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen ausgesät. Nach zwei Wochen in Standardkulturbedingungen wurden die Kolonien fixiert, angefärbt und ausgezählt, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen bestand (für Details vgl. Kapitel 3.2.4). Die Datenpunkte, welche mit dem linearquadratischen Modell angepasst wurden, entsprechen den Mittelwerten (\pm eine SD) der pro Versuch angefertigten Quadruplikate. Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

Um zu überprüfen, ob hypoxische Kulturbedingungen in den entsprechenden Proben vorlagen, wurde die Expression des Hypoxiemarkers HIF-1 α über Western blot Experimente analysiert. Wie in Abbildung 4-16 gezeigt, konnte in beiden Zelllinien bei den hypoxischen und reoxygenierten Zellen eine erhöhte Expression von HIF-1 α zum Zeitpunkt der Bestrahlung (0') beobachtet werden, welche sich im Falle der Reoxygenierungsproben im Verlauf des Experiments an das Level der normoxischen Proben angeschlossen. Dies belegt, dass die entsprechenden Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung tatsächlich hypoxisch waren. Interessanterweise führte eine Inkubation mit NVP-BEZ235 nach 24 und 48 h zu einer Reduktion der HIF-1 α Expression in hypoxischen Zellen (vgl. Abbildung 4-16).

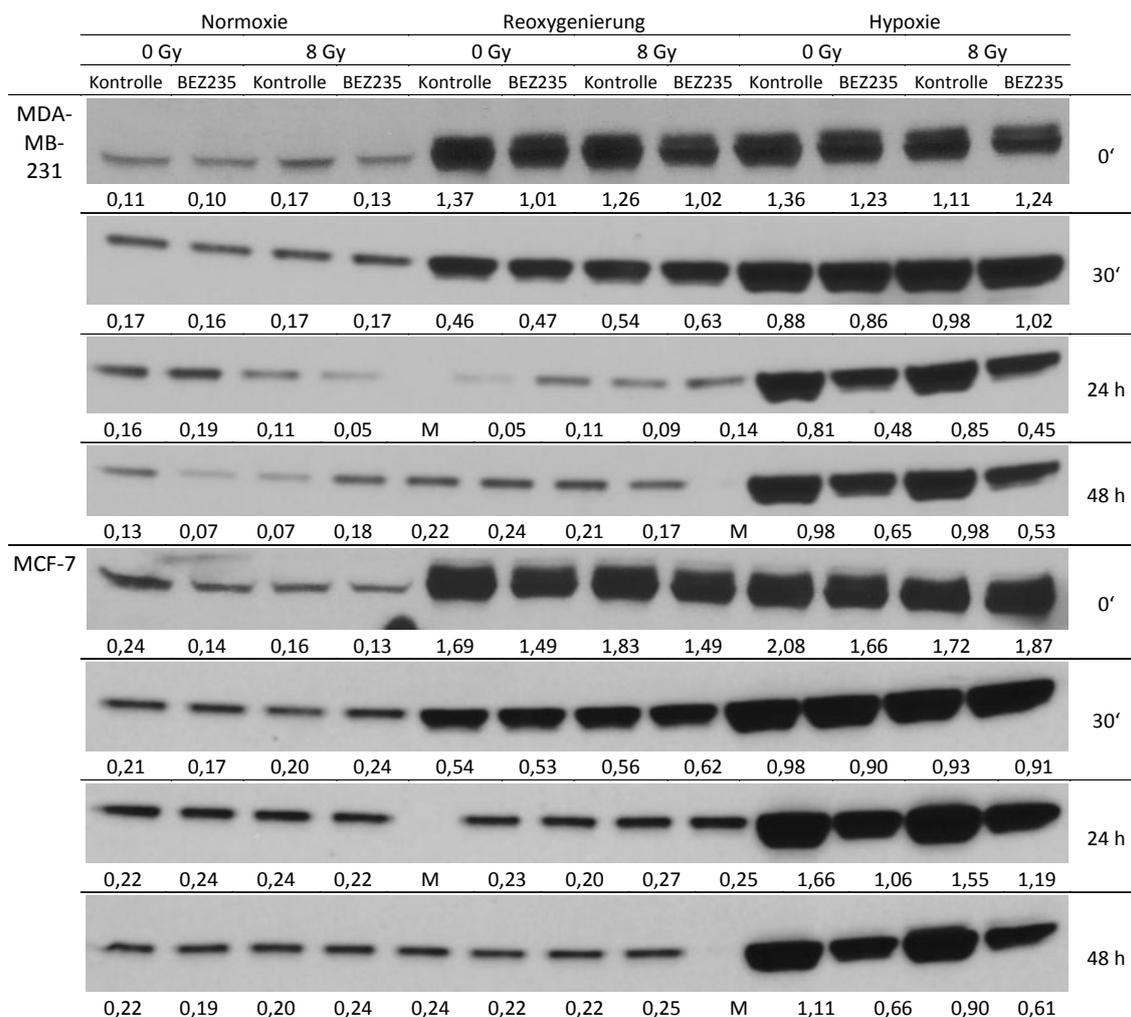


Abbildung 4-16 HIF-1 α Western blot in Brustkrebszellen

Repräsentative Expression des Hypoxiemarkers HIF-1 α zum Zeitpunkt der Bestrahlung (0') sowie 30 min, 24 und 48 h nach der Bestrahlung in normoxischen, reoxygenierten und hypoxischen Brustkrebszellen. Die Zellen wurden eine Stunde vor der Bestrahlung mit 8 Gy und mit 100 nM NVP-BE235 oder DMSO behandelt. Die Zahlen unter den Banden geben das Verhältnis zu β -Tubulin an, welches als Haushaltsgen verwendet wurde, wobei das M für eine Spur mit Proteingrößenstandard steht. Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

Um zu untersuchen, ob eine Behandlung mit 100 nM NVP-BE235 einen Einfluss auf die Strahlensensitivität der beiden Brustkrebszelllinien hat und ob dieser Einfluss von der Sauerstoffkonzentration abhängig ist, wurden Koloniebildungstests durchgeführt. In Abbildung 4-17 sind repräsentative normalisierte Überlebenskurven von MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen, die mit NVP-BE235 behandelt und bestrahlt wurden, dargestellt. Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt und die PE, die SF2, die D₁₀ sowie der Sauerstoffeffekt („oxygen enhancement ratio“ – OER) für SF2 und D₁₀, welcher die Verstärkung der Bestrahlung durch Sauerstoff beschreibt, sind in Abbildung 4-18 zusammengefasst.

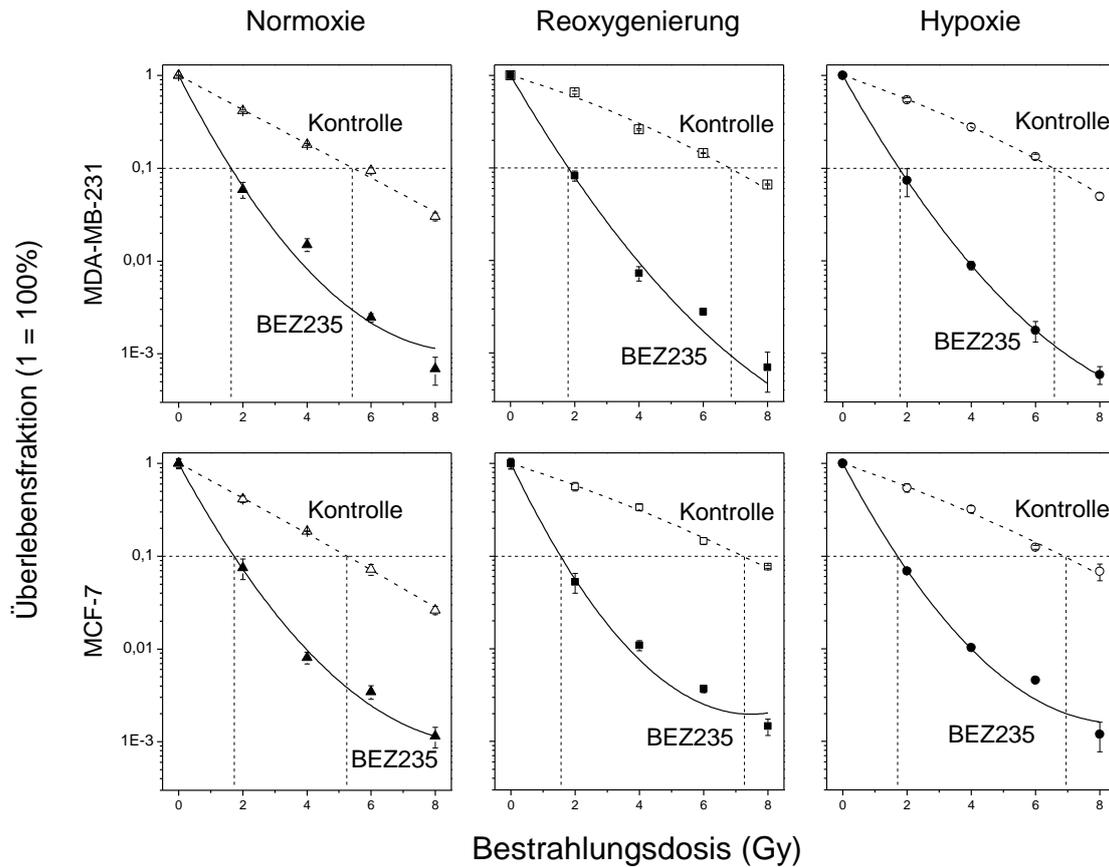


Abbildung 4-17 Koloniebildungstest mit NVP-BE235 behandelten Brustkrebszelllinien unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Repräsentative Koloniebildungstests der beiden untersuchten Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 (obere Reihe) und MCF-7 (untere Reihe) nach Inkubation mit 100 nM NVP-BE235 (gefüllte Symbole). Die Zellen wurden unter normoxischen (Dreiecke), reoxygenierten (Quadrate) oder hypoxischen Bedingungen kultiviert und bestrahlt. Vierundzwanzig Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen ausgesät und nach zwei Wochen in Standardkulturbedingungen wurden die Kolonien fixiert, angefärbt und ausgezählt, wobei eine Kolonie aus mindestens 50 Zellen bestand (für Details vgl. Kapitel 3.2.4). Die Datenpunkte, welche mit dem linearquadratischen Modell angepasst wurden, repräsentieren die Mittelwerte (\pm eine SD) der pro Versuch angefertigten Quadruplikate. Zum leichteren Vergleich wurden die D_{10} durch gestrichelte Linien eingezeichnet. Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

Wie in Abbildung 4-18 dargestellt, war die Plattiereffizienz nicht signifikant durch die Hypoxie oder die Behandlung mit NVP-BE235 beeinflusst. Allerdings wurde in beiden Zelllinien eine erhöhte Überlebensfraktion bei hypoxischen und reoxygenierten Zellen nach Bestrahlung im Vergleich zu den normoxischen Zellen beobachtet. Der OER belief sich für diese milde Hypoxie auf einen Faktor von ca. 1,3 für hypoxische und ca. 1,4 für reoxygenierte Zellen. Zwischen den reoxygenierten und hypoxischen Zellen konnte in keiner der beiden untersuchten Zelllinien signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Allerdings konnte eindrucksvoll belegt werden, dass die Radiosensibilisierung durch NVP-BE235 in beiden Zelllinien unabhängig von der Sauerstoffsättigung ist. Darüber hinaus führte eine Behandlung mit NVP-BE235 dazu, dass

die negativen Effekte der Hypoxie in Bezug auf die Radiosensitivität vollständig durch den dualen PI3K/mTOR Inhibitor aufgehoben wurden, was sich in nahezu identischen SF2 und D_{10} Werten bei sämtlichen Sauerstoffbedingungen nach Behandlung mit NVP-BE235 widerspiegelt.

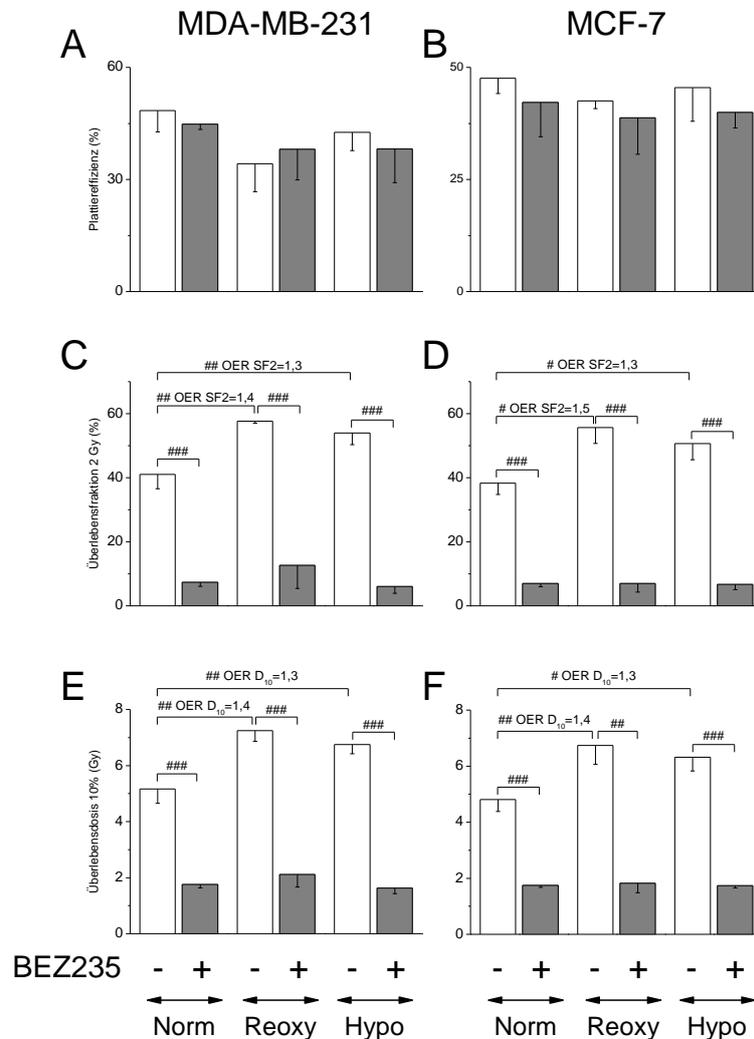


Abbildung 4-18 Mittelwerte der Koloniebildungstests mit Brustkrebszelllinien unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Mittelwerte (\pm eine SD) der PE (A und B), der SF2 (C und D) und der D_{10} (E und F) bei MDA-MB-231 (A, C und E) und MCF-7 Zellen (B, D und F). Der OER wurde für die Überlebensfraktion 2 Gy wie folgt berechnet: $OER_{SF2} = SF2_{Hypoxie} / SF2_{Normoxie}$. Die Berechnung des $OER_{D_{10}}$ erfolgte analog. Statistische signifikante Unterschiede sind wie folgt angegeben: # $\triangleq p < 0,05$; ## $\triangleq p < 0,01$; ### $\triangleq p < 0,001$. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Emre Cörek bei (siehe Abschlussarbeit E. Cörek). Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

4.2.3 NVP-BE235 INDUZIERTÄ ÄNDERUNGEN IN DER EXPRESSION VON PROTEINEN DER PI3K/AKT/MTOR SIGNALKASKADE

Um weitere molekulare Faktoren der NVP-BE235 induzierten und sauerstoffunabhängigen Radiosensibilisierung der untersuchten Tumorzellen zu finden, wurden wichtige

Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges nach kombinierter Bestrahlung und Behandlung mit dem dualen Inhibitor in normoxischen, reoxygenierten und hypoxischen Proben untersucht. Wie in Abbildung 4-19 dargestellt, inhibierte eine Inkubation mit NVP-BE2235 die PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade bereits 30 min nach IR unabhängig vom Oxygenierungszustand der Zellen, wie man an einer verringerten Phosphorylierung von Akt, mTOR, S6 und 4E-BP1 in MCF-7 und mTOR, S6 und 4E-BP1 in MDA-MB-231 Zellen erkennen kann (vgl. blaue, rote, grüne und gelbe Hervorhebungen).

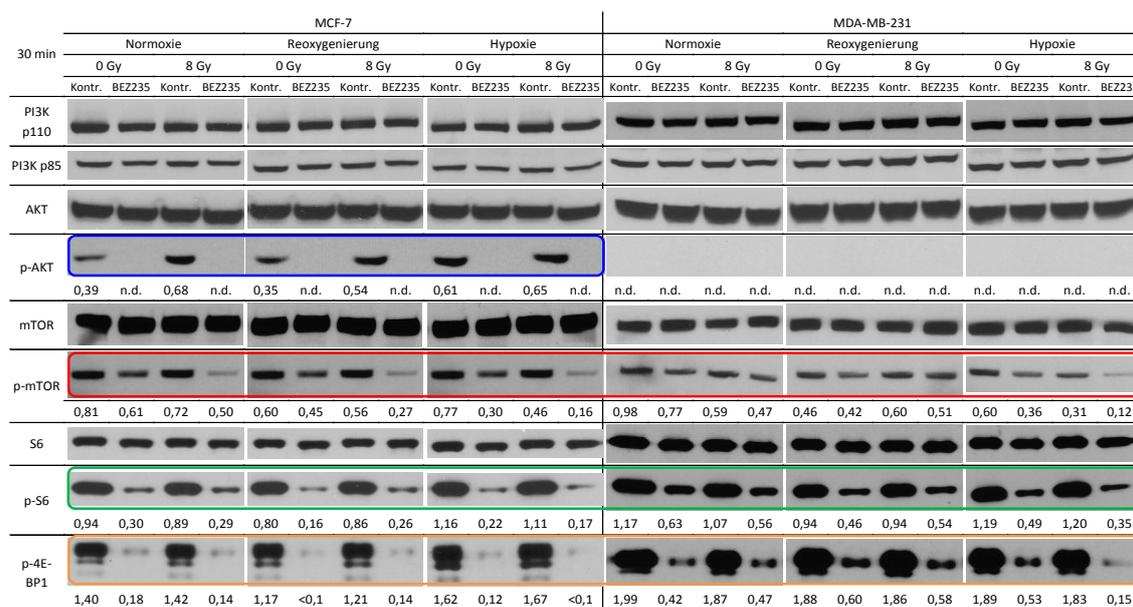


Abbildung 4-19 PI3K/Akt/mTOR Signalweg in Brustkrebszelllinien 30 min nach Bestrahlung

Repräsentative Western blot Analyse (aus drei unabhängigen Versuchen) des Expressionsniveaus relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in MCF7 (linkes Panel) und MDA-MB-231 (rechtes Panel) Zellen, welche 30 min nach Bestrahlung fixiert wurden. Die Zellen wurden mit NVP-BE2235 oder DMSO vor Bestrahlung mit 8 Gy behandelt und wurden unter normoxischen, reoxygenierten oder hypoxischen Bedingungen kultiviert. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität von β -Aktin normalisiert und das Verhältnis eines Proteins zur entsprechenden Aktinbande ist durch die Zahlen angegeben; n.d. bedeutet nicht detektierbar. Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

Wie in Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21 ersichtlich ist, konnte die Inaktivierung von Akt und mTOR in der MCF-7 Zelllinie bis zu 48 h nach IR beobachtet werden (vgl. blaue und rote Hervorhebungen), wohingegen in MDA-MB-231 Zellen 24 und 48 h nach IR lediglich geringfügige Unterschiede in der Phosphorylierung von mTOR verzeichnet wurden (vgl. rote Hervorhebung). Ebenso wurden in beiden Zelllinien lediglich geringe Unterschiede in der Proteinexpression der beiden PI3K Untereinheiten p110 und p85, Akt, mTOR und S6 beobachtet.

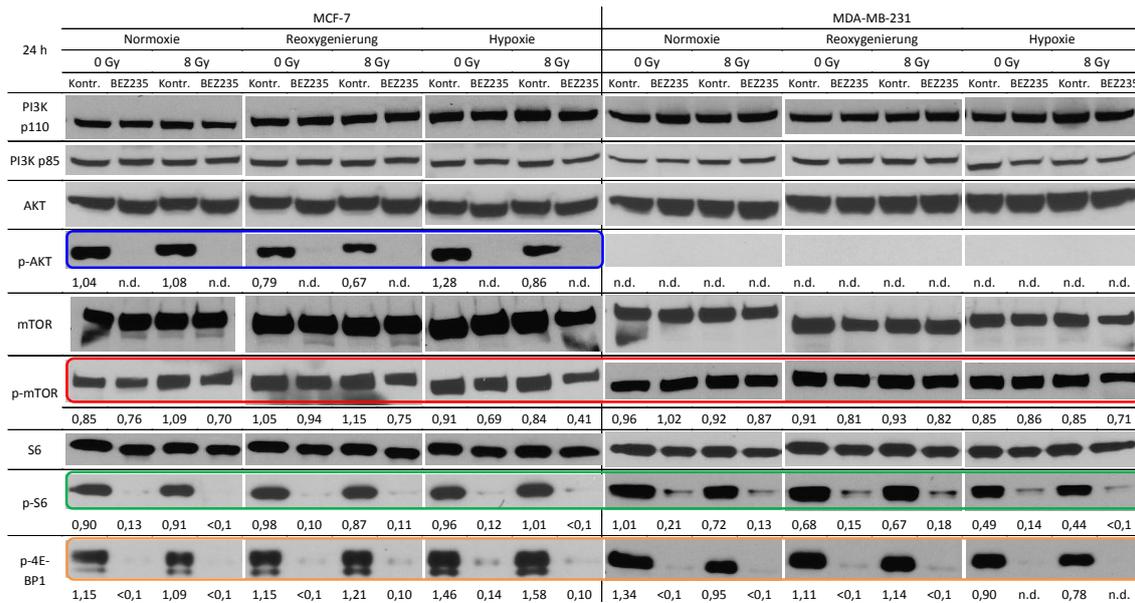


Abbildung 4-20 PI3K/Akt/mTOR Signalweg in Brustkrebszelllinien 24 h nach Bestrahlung

Repräsentative Western blot Analyse (aus drei unabhängigen Versuchen) des Expressionsniveaus relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in MCF7 (linkes Panel) und MDA-MB-231 (rechtes Panel) Zellen, welche 24 h nach Bestrahlung fixiert wurden. Die Zellen wurden mit NVP-BE235 oder DMSO vor Bestrahlung mit 8 Gy behandelt und wurden unter normoxischen, reoxygenierten oder hypoxischen Bedingungen kultiviert. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität von β -Aktin normalisiert und das Verhältnis Protein zur entsprechenden Aktinbande ist durch die Zahlen angegeben; n.d. bedeutet nicht detektierbar. Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

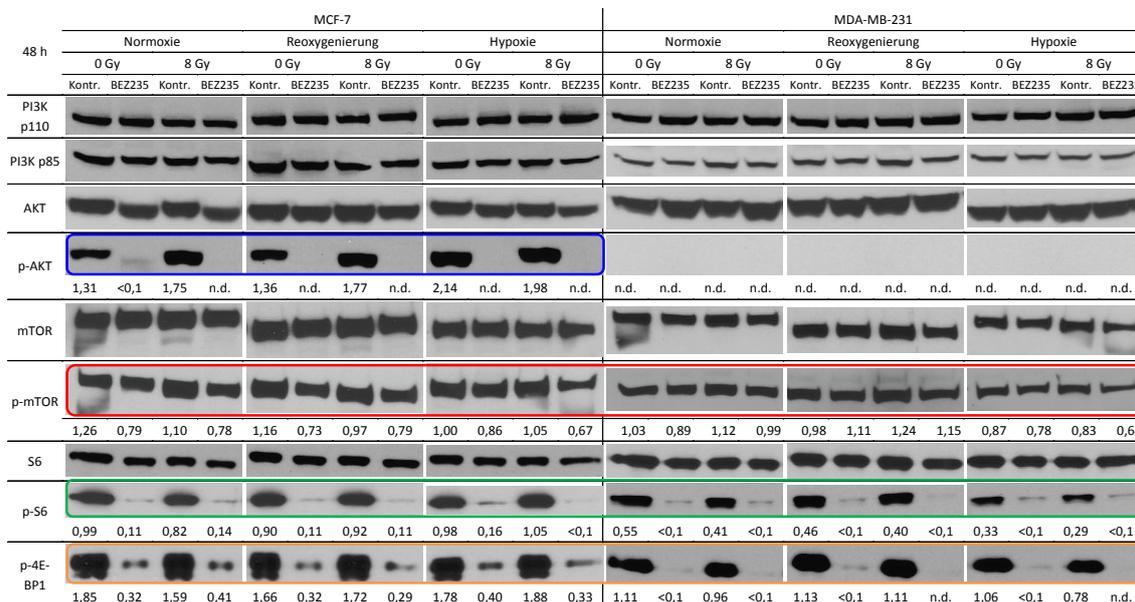


Abbildung 4-21 PI3K/Akt/mTOR Signalweg in Brustkrebszelllinien 48 h nach Bestrahlung

Repräsentative Western blot Analyse (aus drei unabhängigen Versuchen) des Expressionsniveaus relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in MCF7 (linkes Panel) und MDA-MB-231 (rechtes Panel) Zellen, welche 48 h nach Bestrahlung fixiert wurden. Die Zellen wurden mit NVP-BE235 oder DMSO vor Bestrahlung mit 8 Gy behandelt und wurden unter normoxischen, reoxygenierten oder hypoxischen Bedingungen kultiviert. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität von β -Aktin normalisiert und das Verhältnis Protein zur entsprechenden Aktinbande ist durch die Zahlen angegeben; n.d. bedeutet nicht detektierbar. Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in beiden untersuchten Brustkrebszelllinien eine Inaktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, belegt durch eine verminderte Phosphorylierung von S6 und 4E-BP1, durch NVP-BEZ235 induziert wurde und dass diese Inaktivierung unabhängig von der Sauerstoffsättigung der Zellen war.

4.2.4 INDUKTION DER APOPTOSE UND AUTOPHAGIE DURCH NVP-BEZ235

Um weitere molekulare Ursachen für die sauerstoffunabhängige Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235 zu finden, wurde die Induktion von Apoptose und Autophagie untersucht. Wie in Abbildung 4-22 A dargestellt, wurde in MCF-7 Zellen 48 h nach Bestrahlung eine deutlich erhöhte Proportion von hypodiploiden Zellen nach NVP-BEZ235 Behandlung (graue Balken) in normoxischen, reoxygenierten und hypoxischen Zellen gemessen. Eine Bestrahlung der Zellen (gestreifte Balken) bewirkte ebenfalls eine Erhöhung der hypodiploiden Fraktion. Bemerkenswert war weiterhin die Tatsache, dass die mit NVP-BEZ235 und IR behandelten Zellen unabhängig vom Oxygenierungszustand die höchste Fraktion von hypodiploiden Zellen aufwiesen.

Interessanterweise wurde im Bezug auf die späte Apoptose eine andere zelluläre Antwort in MDA-MB-231 als in MCF-7 Zellen festgestellt (vgl. Abbildung 4-22 A und B). Eine Behandlung mit NVP-BEZ235 hatte in MDA-MB-231 Zellen keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil hypodiploider Zellen. Eine Bestrahlung der Zellen führte zwar ebenfalls zu einer gesteigerten Apoptose allerdings wurde im Gegensatz zur MCF-7 Zelllinie diese Apoptose nicht signifikant durch die duale PI3K/mTOR Inhibition erhöht, obwohl Tendenzen erkennbar waren.

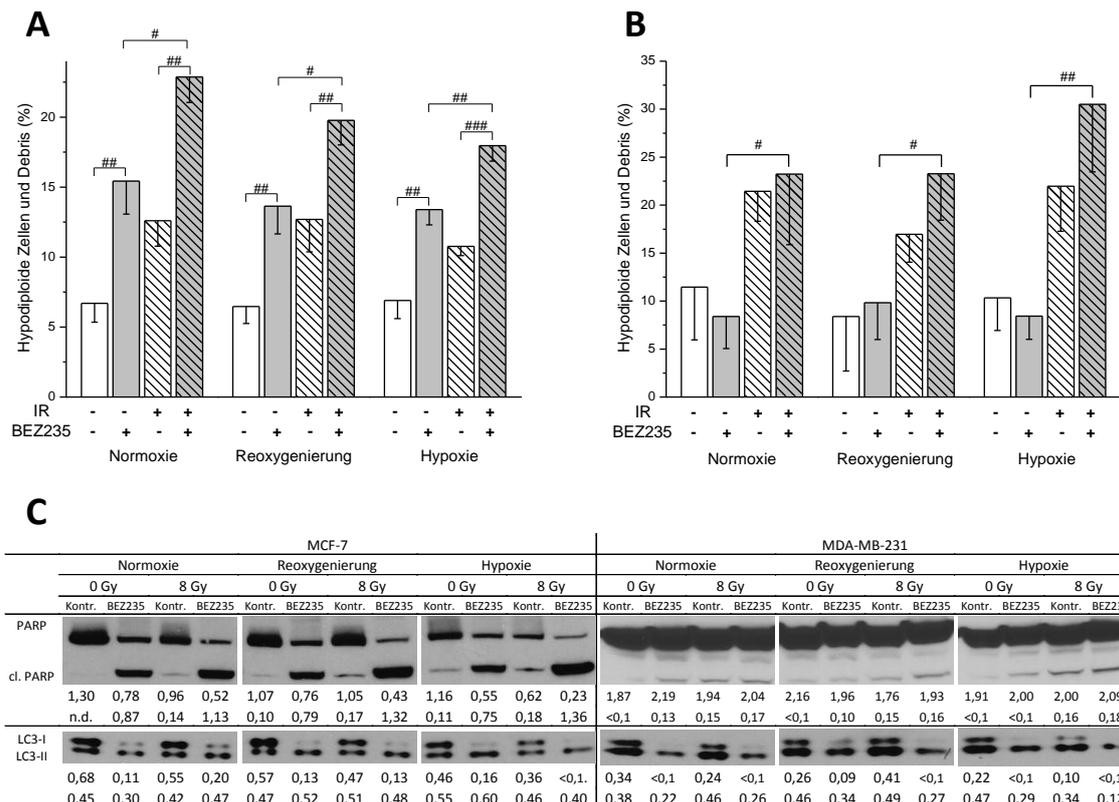


Abbildung 4-22 Apoptose und Autophagie in Brustkrebszelllinien nach NVP-BE235 Behandlung und Bestrahlung

Hypodiploide Zellen und Debris in NVP-BE235 behandelten (graue Balken) und bestrahlten (gestreifte Balken) normoxischen, reoxygenierten und hypoxischen MCF-7 (A) und MDA-MB-231 Zellen (B). DMSO behandelte (weiße Balken) und unbestrahlte Zellen (ungestreifte Balken) dienen als Kontrollen. Die Zellen wurden 48 h nach Bestrahlung enzymatisch durch Trypsin abgelöst, fixiert, permeabilisiert, mit RNase behandelt, mit DAPI angefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (\pm eine SD) aus drei unabhängigen Experimenten. Auf statistische Vergleiche zwischen den Kontrollen wurde aus Übersichtsgründen verzichtet. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt dargestellt: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$. Repräsentative Western blot Analysen von Apoptose und Autophagie relevanten Proteine in MCF-7 (linkes Panel) und MDA-MB-231 Zellen (rechtes Panel), welche 48 h nach Bestrahlung lysiert wurden (C). Die Zellen wurden unter normoxischen, reoxygenierten oder hypoxischen Bedingungen kultiviert und mit DMSO oder NVP-BE235 vor der Bestrahlung mit 8 Gy behandelt. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität von β -Aktin normalisiert und das Verhältnis Protein zur entsprechenden Aktinbande ist durch die Zahlen angegeben; n.d. bedeutet nicht detektierbar. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Emre Cörek bei (siehe Abschlussarbeit E. Cörek). Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

Weiterhin wurde die Expression und der Abbau des DNS-Reparaturprotein PARP und die Expression der Autophagie Marker LC3-I und LC3-II untersucht. In Abbildung 4-22 sind repräsentative Ergebnisse für normoxische, reoxygenierte und hypoxische MCF-7 (linkes Panel) und MDA-MB-231 Zellen (rechtes Panel) 48 h nach Bestrahlung dargestellt. Eine Behandlung mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor führte in MCF-7 Zellen zu einer verminderten Expression von PARP in allen untersuchten Sauerstoffbedingungen. Die Verminderung der PARP Expression korrelierte mit erhöhten Niveaus von gespaltenem PARP, was auf einen enzymatischen Abbau von PARP hindeutet. In Über-

einstimmung mit den vorherigen Daten für den Anteil hypodiploider MCF-7 Zellen, resultierte eine Kombination von NVP-BEZ235 und Bestrahlung in den höchsten Werten für gespaltenes PARP. Wie auch bei dem Anteil hypodiploider Zellen fiel die zelluläre Antwort von MDA-MB-231 Zellen hinsichtlich der PARP Expression und dessen Spaltung anders aus. Eine Behandlung mit NVP-BEZ235 hatte in dieser Zelllinie lediglich geringe Auswirkungen auf die Expressionsniveaus von PARP und gespaltenem PARP, was mit den Daten für die hypodiploide Fraktion korreliert.

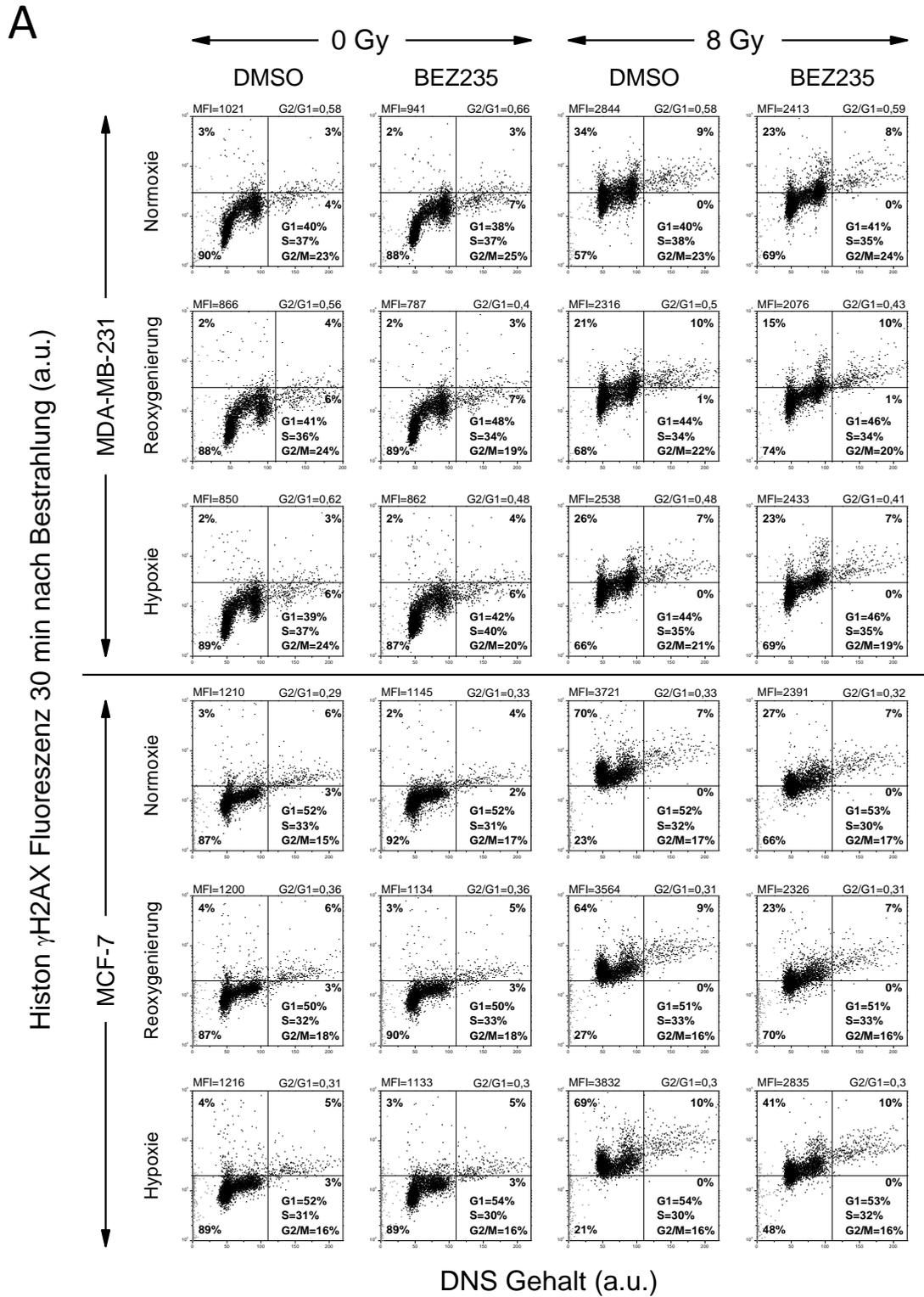
Um den Einfluss von NVP-BEZ235 auf die Induktion von Autophagie zu untersuchen, wurde die Expression von LC3 analysiert, welche während der Autophagie von der zytosolisch gelösten LC3-I in die membranständige LC3-II Form umgewandelt wird. Wie in Abbildung 4-22 dargestellt, verursachte eine Behandlung mit NVP-BEZ235 in normoxischen, reoxygenierten und hypoxischen MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen einen starken Rückgang von LC3-I 48 h nach Bestrahlung, obwohl keine Erhöhung der membranständigen LC3-II Form gemessen wurde.

4.2.5 EINFLUSS DES OXYGENIERUNGSSTATUS, DUALER PI3K/MTOR INHIBITION UND BESTRAHLUNG AUF DEN ZELLYKLUS, DIE INDUKTION VON ROS UND DIE INDUKTION UND REPARATUR VON DNS-SCHÄDEN

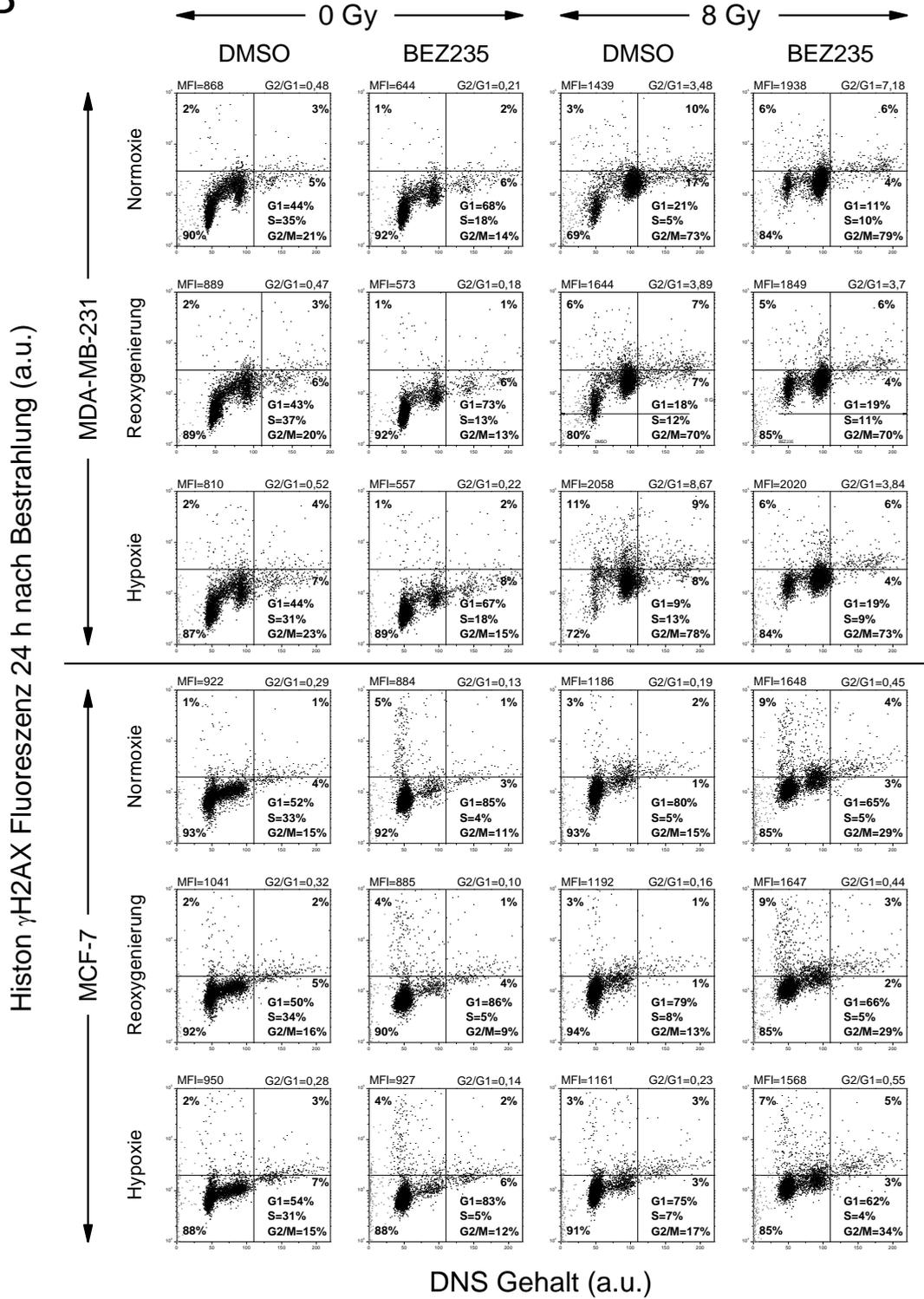
4.2.5.1 ZELLYKLUSALTERATIONEN DURCH NVP-BEZ235, BESTRAHLUNG UND DEN OXYGENIERUNGSSTATUS

Um weitere mögliche Ursachen für die NVP-BEZ235 induzierte Radiosensibilisierung zu finden, wurde untersucht, ob die verschiedenen Sauerstoffkultivierungsbedingungen sowie die Bestrahlung mit 8 Gy und eine Inkubation mit NVP-BEZ235 Auswirkungen auf den Zellzyklus der beiden Brustkrebszelllinien haben. Hierzu wurden die Zellen gemäß dem Behandlungsschema (vgl. Abbildung 3-2) kultiviert, mit NVP-BEZ235 behandelt und bestrahlt und 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert, permeabilisiert, mit RNase behandelt und mit einem DNS-Fluoreszenzfarbstoff sowie einem FITC konjugierten anti- γ H2AX Antikörper angefärbt. Durchflusszytometrisch wurde dann die FITC Fluoreszenz sowie der DNS-Gehalt bestimmt und Rückschlüsse auf DNS-Schäden und die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen gezogen. In Abbildung 4-23 sind repräsentative Ergebnisse von MDA-MB-231 (oberes Panel) und MCF-7 Zellen (unteres Panel) 30 min (A), 24 (B) und 48 h (C) nach Bestrahlung dargestellt, wo-

hingegen in Abbildung 4-24 die Mittelwerte (\pm eine SD) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen der beiden Zelllinien dargestellt sind.



B



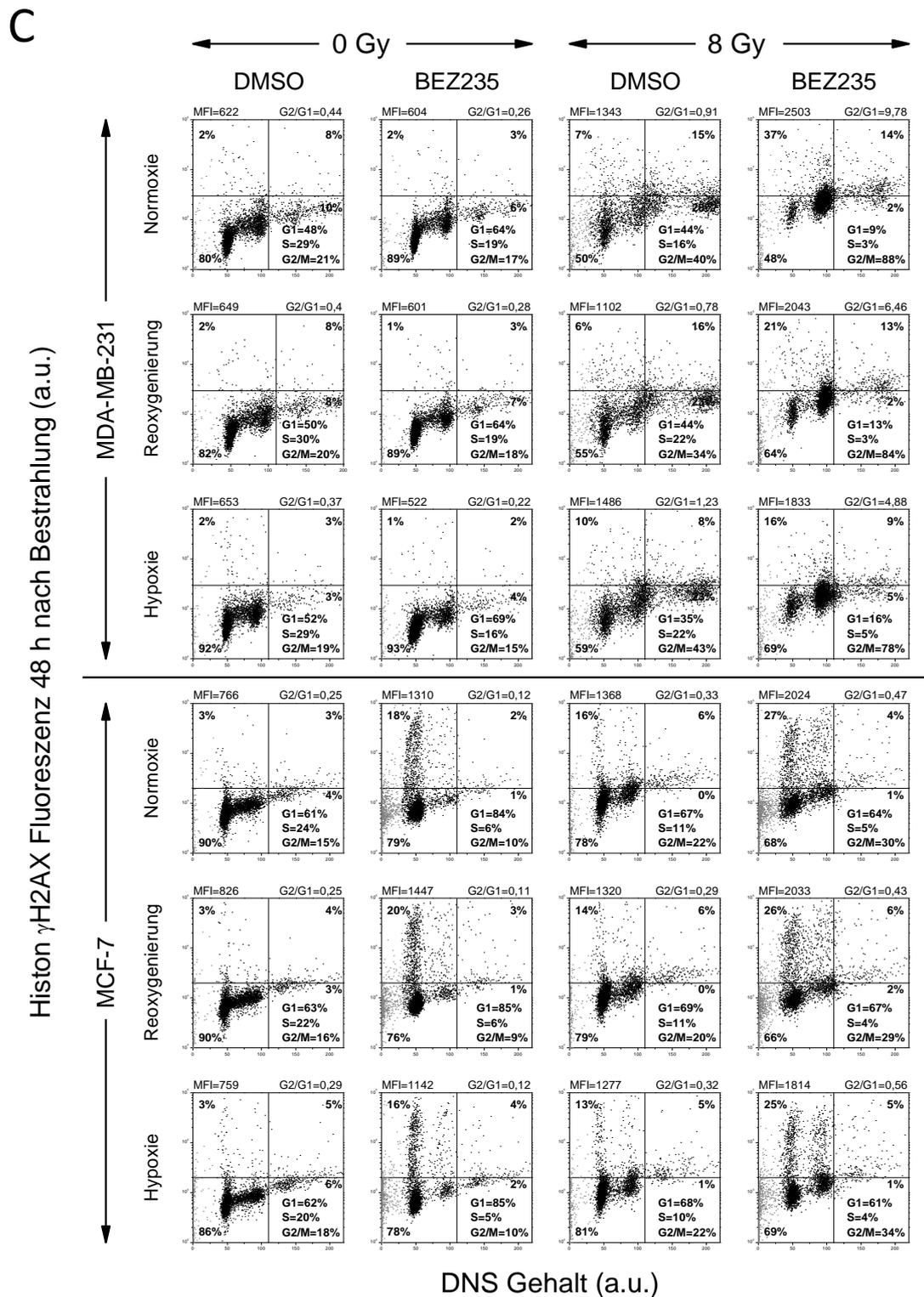


Abbildung 4-23 Zweidimensionale repräsentative Verteilungen des Zellzyklus und der Phosphorylierung von H2AX in Brustkrebszelllinien

Repräsentative zweidimensionale Darstellung des Histons γ H2AX gegen den DNS-Gehalt in MDA-MB-231 (oberes Panel) und MCF-7 Zellen (unteres Panel), welche 30 min (A), 24 (B) und 48 h (C) nach Bestrahlung mit 8 Gy fixiert wurden. Normoxische, reoxygenierte und hypoxische Zellen wurden mit NVP-BEZ235 behandelt. Unbestrahlte und mit DMSO behandelte Zellen dienten als Kontrollen. Die Proben wurden mit einem FITC konjugierten anti- γ H2AX Antikörper und DAPI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (für Details vgl. Kapitel 3.2.6.1). Die Zahlen repräsentieren den Anteil der Zellen in den vier Quadranten. Weiterhin ist die mittlere γ H2AX Fluoreszenz (MFI), der Anteil der Zellen in den

einzelnen Zellzyklusphasen (bestimmt durch Dekonvolution der Daten mittels ModFit) sowie das Verhältnis der Zellen in der G2/M-Phase zu den Zellen in der G1-Phase angegeben.

A MDA-MB-231

B MCF-7

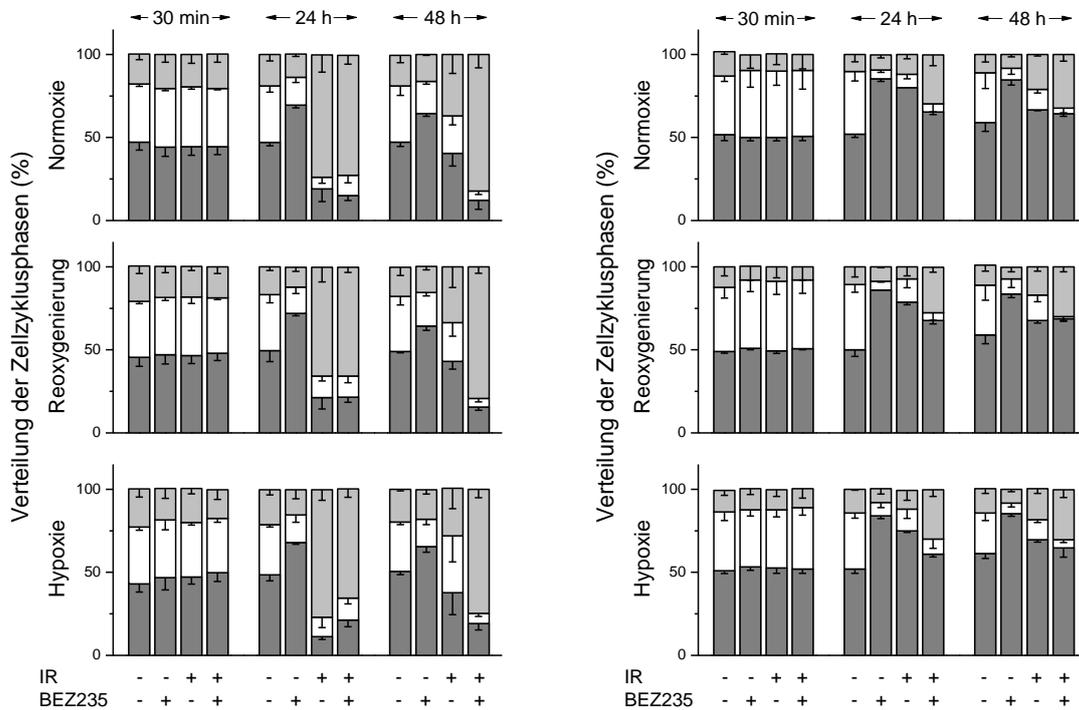


Abbildung 4-24 Mittelwerte der Zellzyklusverteilung in Brustkrebszelllinien

Aus mindestens drei unabhängigen Versuchen gemittelte Verteilung (\pm eine SD) der G1- (dunkelgraue Balken), S- (weiße Balken) und G2/M-Phase (hellgraue Balken) in MDA-MB-231 (A) und MCF-7 Tumorzellen (B), welche mit NVP-BE235 behandelt, mit 8 Gy bestrahlt und unter verschiedenen Oxygenierungsbedingungen kultiviert wurden. Mit DMSO behandelte und unbestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Die Proben wurden 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert, permeabilisiert, mit RNase behandelt, mit DAPI anfärbt und durchflusszytometrisch auf ihren DNS-Gehalt untersucht (für Details vgl. Kapitel 3.2.6.1). Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Emre Cörek bei (siehe Abschlussarbeit E. Cörek). Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

Wie in Abbildung 4-23 A und Abbildung 4-24 dargestellt, hatte weder eine Behandlung mit NVP-BE235 noch eine Bestrahlung mit 8 Gy einen Effekt auf die Zellzyklusphasenverteilung 30 min nach Bestrahlung. Eine Behandlung der Zellen mit NVP-BE235 führte in beiden Zelllinien nach 24 und 48 h zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase (vgl. Abbildung 4-23 B und C sowie Abbildung 4-24). Wurden die Zellen mit DMSO behandelt und mit 8 Gy bestrahlt, so wurden nach 24 h zelllinienspezifische Unterschiede beobachtet. In MDA-MB-231 Zellen wurde ein erhöhter Anteil an Zellen in der G2/M-Phase gemessen, wohingegen in der MCF-7 Zelllinie eine Akkumulation in der G1-Phase beobachtet wurde. In beiden Zelllinien wurde allerdings in den mit DMSO behandelten und bestrahlten Proben nach 48 h eine Normalisierung der Zellzyklusverteilung festgestellt.

Wurden die Zellen zusätzlich zur Bestrahlung mit NVP-BEZ235 behandelt, so wurde 24 h nach IR in der MCF-7 Zelllinie eine Erhöhung des Anteils an Zellen in der G2/M-Phase beobachtet, wohingegen in MDA-MB-231 Zellen kein Unterschied zu den 8 Gy DMSO Proben erkennbar war (vgl. Abbildung 4-24). Allerdings wurden nach 48 h sowohl in MDA-MB-231 als auch in MCF-7 Zellen ein erhöhter Anteil an Zellen in der G2/M-Phase gemessen, wenn diese mit NVP-BEZ235 behandelt und bestrahlt wurden. Die zuvor genannten Effekte in Bezug auf die NVP-BEZ235 induzierten Zellzyklusaberrationen wurden in allen untersuchten Oxygenierungszuständen beobachtet.

4.2.5.2 INDUKTION VON ROS UND DIE INDUKTION UND REPARATUR VON DNS-SCHÄDEN NACH NVP-BEZ235 BEHANDLUNG UND BESTRAHLUNG IN VERSCHIEDENEN OXYGENIERUNGSZUSTÄNDEN

Um zu untersuchen, ob eine Inkubation mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor einen Effekt auf die Induktion von ROS und das Auftreten von DNS-Schäden hat, wurden Analysen mit dem ROS-Indikator H₂DCFDA und dem DSB Marker γ H2AX durchgeführt (vgl. Abbildung 4-25). Da die Messung des ROS Gehalts in lebenden Zellen direkt nach der Bestrahlung erfolgte, gibt es keinen Unterschied zwischen reoxygenierten und hypoxischen Proben, weshalb diese für die ROS-Messung zusammen dargestellt werden.

Wie Abbildung 4-25 A und B gezeigt, resultierte eine Bestrahlung mit 8 Gy in beiden Zelllinien in einer erhöhten ROS Konzentration sowohl in den normoxischen als auch in den reoxygenierten/hypoxischen Proben. Eine Inkubation mit NVP-BEZ235 hingegen hatte in keiner der beiden Zelllinien in den untersuchten Sauerstoffbedingungen einen Einfluss auf die ROS-Induktion. Erwähnenswert ist allerdings, dass sowohl in der MDA-MB-231 als auch in der MCF-7 Zelllinie bei den reoxygenierten/hypoxischen Zellen ein deutlicher Anstieg des ROS Gehaltes im Vergleich zu den normoxischen Proben zu beobachten war.

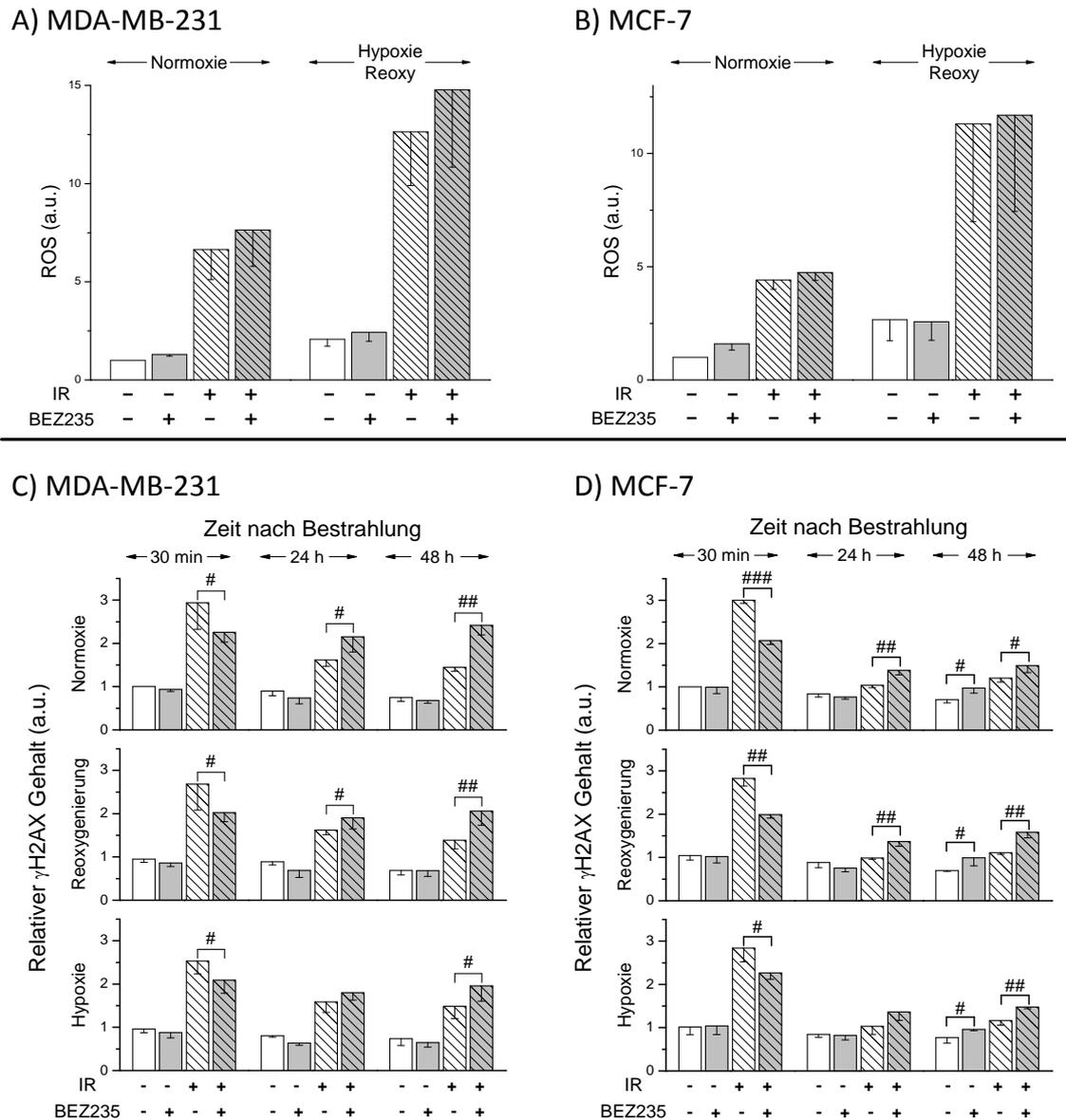


Abbildung 4-25 ROS Gehalt und DNS-Schäden in Brustkrebszelllinien

ROS Gehalt in MDA-MB-231 (A) und MCF-7 (B) Zellen direkt nach Bestrahlung durch Färbung mit H_2DCFDA gemessen. Die Zellen wurden mit NVP-BEZ235 (graue Balken) behandelt und mit 8 Gy (gestreifte Balken) bestrahlt. Da die Zellen direkt nach Bestrahlung gemessen wurden, gibt es keine Unterschiede zwischen den reoxygenierten und hypoxischen Proben. Für die Analyse der DNS-Schäden wurden normoxische, reoxygenierte und hypoxische MDA-MB-231 (C) und MCF-7 (D) Zellen 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert, permeabilisiert, mit einem anti- γ H2AX-FITC gekoppelten Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch die FITC Fluoreszenz analysiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\pm SD) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, wobei die einzelnen Verteilungen jeweils auf den Wert der normoxischen, unbestrahlten Kontrolle nach 30 min normiert wurden. Statistisch signifikante Unterschiede sind wie folgt angegeben: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$. Zu den dargestellten Daten trugen auch Experimente von Emre Cörek bei (siehe Abschlussarbeit E. Cörek). Modifiziert nach Kuger et al. 2014.

Weiterhin wurden die Induktion und der Abbau von DNS-Doppelstrangbrüchen durch eine Immunfluoreszenzanalyse von γ H2AX im Durchflusszytometer gemessen. Hierzu wurden Zellen unter den entsprechenden Sauerstoffbedingungen kultiviert, mit NVP-BEZ235 behandelt und bestrahlt, bevor sie 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung

fixiert wurden (für Details siehe Kapitel 3.2.6.1). Obwohl kein Effekt von NVP-BEZ235 auf die ROS-Induktion gemessen wurde, konnte, wie anhand der repräsentativen Primärdaten in Abbildung 4-23 A und den gemittelten Werten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen in Abbildung 4-25 C und D dargestellt, eine verminderte Induktion von DNS-Schäden in den mit NVP-BEZ235 behandelten Proben 30 min nach Bestrahlung in sämtlichen untersuchten Oxygenierungszuständen beobachtet werden.

In beiden Zelllinien wurden allerdings bereits 24 h nach Bestrahlung signifikant höhere DNS-Schäden in normoxischen und reoxygenierten Proben gemessen, wenn diese bestrahlt und mit NVP-BEZ235 behandelt wurden (vgl. Abbildung 4-23 B und Abbildung 4-25 C und D). Diese signifikanten Unterschiede in den DNS-Schäden konnten 48 h nach Bestrahlung in sämtlichen Oxygenierungszuständen gemessen werden (vgl. Abbildung 4-23 C und Abbildung 4-25 C und D), was auf eine verminderte Reparaturfähigkeit von DNS-Schäden hinweist. Bemerkenswerterweise und in Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen für die Apoptose wurde nach einer längeren Inkubation mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor eine Erhöhung des γ H2AX Niveaus in unbestrahlten und bestrahlten MCF-7 Zellen in allen getesteten Sauerstoffbedingungen gemessen (vgl. Abbildung 4-23 und Abbildung 4-25).

4.3 EINFLUSS DER SIMULTANEN INHIBITION DER PI3K/MTOR UND MAPK SIGNALKASKADEN AUF DIE STRAHLENANTWORT HUMANER KREBSZELLEN

4.3.1 EINFLUSS VON AZD6244 UND NVP-BEZ235 AUF DIE ZELLPROLIFERATION

Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine Inhibition der onkogenen PI3K/Akt/mTOR und MAPK Signalkaskade auf die Proliferation der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 und der humanen Glioblastomzelllinie SNB19 hat, wurden beide Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren AZD6244 (31,25-4000 nM) und NVP-BEZ235 (3,125-400 nM) alleine und in Kombination behandelt. Die Proliferation wurde hierbei durch Messung des ATP Gehalts gemessen und quantifiziert (vgl. Kapitel 3.2.3.1). In Abbildung 4-26 ist der relative, mittlere ATP Gehalt aus zwei Versuchen, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden, dargestellt.

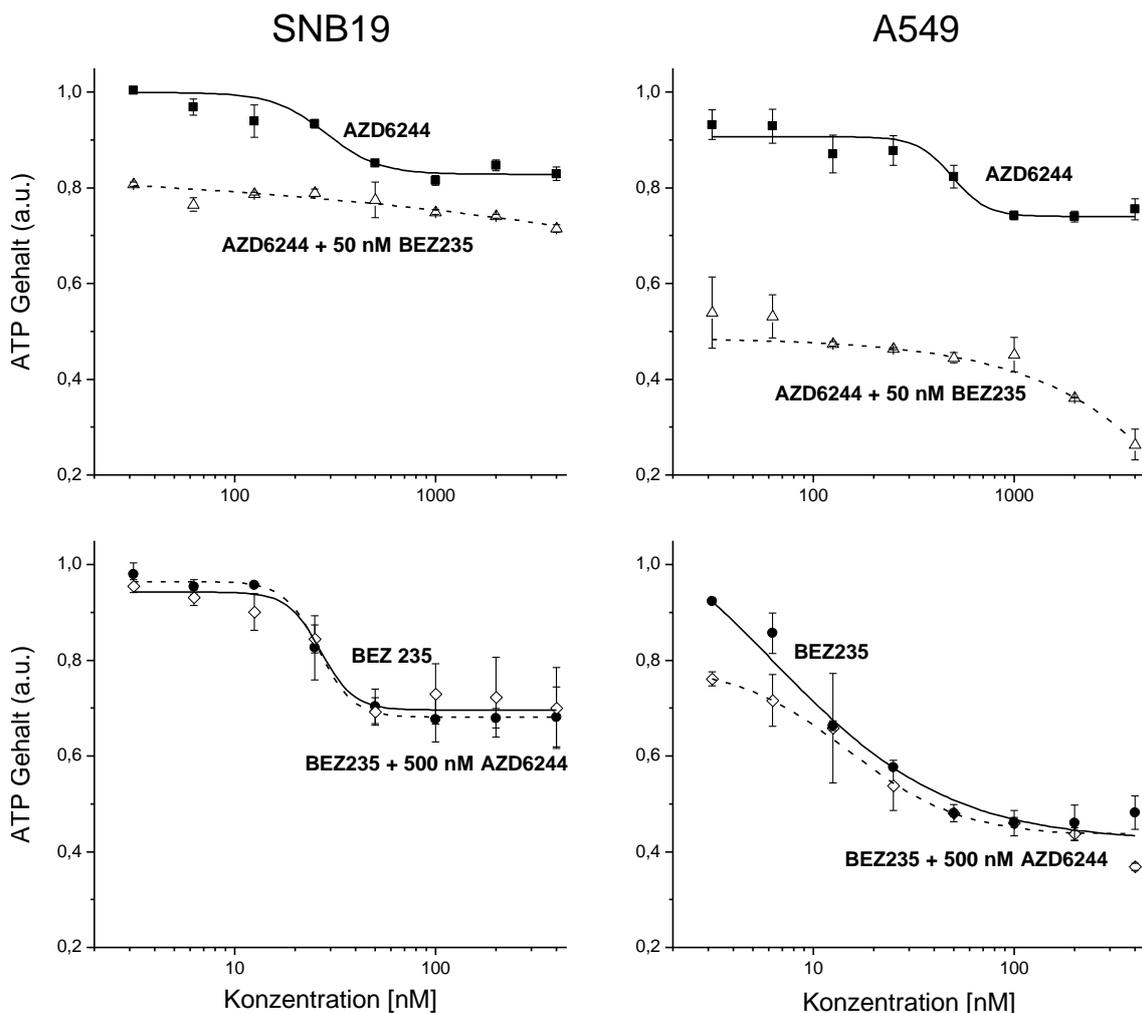


Abbildung 4-26 ATP Gehalt in A549 und SNB19 Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit AZD6244 und/oder NVP-BEZ235

Die beiden humanen Krebszelllinien SNB19 (links) und A549 (rechts) wurden für 24 h mit AZD6244 (oberes Panel) und NVP-BEZ235 (unteres Panel) in einem Konzentrationsbereich von 31,25-4000 nM oder 3,125-400 nM behandelt. Weiterhin wurden beide Zelllinien mit einer Kombination aus AZD6244 und NVP-BEZ235 behandelt. Hierzu wurden eine AZD6244-Konzentration von 500 nM oder eine NVP-BEZ235-Konzentration von 50 nM und variable Konzentrationen von NVP-BEZ235 oder AZD6244 angewandt. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus zwei Versuchen die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden, sowie die beste Anpassung an das 4PLM-Modell.

Wie in Abbildung 4-26 zu erkennen, verringert eine Inkubation mit AZD6244 für 24 h die Proliferation in beiden Zelllinien in Abhängigkeit von der Dosis, wobei der halbmaximale Effekt in beiden Zelllinien in einem Konzentrationsbereich von 300-400 nM beobachtet wurde. Weiterhin reagierten beide Zelllinien auf eine Inkubation mit NVP-BEZ235 mit einer deutlich verringerten Proliferation. Eine Inkubation von SNB19 Zellen mit bis zu 10 nM NVP-BEZ235 hatte keinen nennenswerten Effekt auf die Proliferationsrate. Wurden die Zellen mit einer Konzentration größer als 10 nM NVP-BEZ235 behandelt, so konnte eine deutliche Abnahme des ATP Gehaltes beobachtet werden. Ab einer Konzentration von ca. 100 nM erreichte die gemessene ATP-Konzentration ein Plateau. Im Gegensatz hierzu reagierte die A549 Zelllinie bereits auf niedrigste Konzentrationen von NVP-BEZ235 mit verringerter Proliferation, was sich in einem erniedrigten ATP Gehalt widerspiegelte. Ab einer Konzentration von 50 nM NVP-BEZ235 konnte keine weitere Abnahme des ATP Gehaltes in A549 Zellen beobachtet werden.

Bei einer Kombination von verschiedenen AZD6244 Konzentrationen mit 50 nM NVP-BEZ235 (vgl. Abbildung 4-26 oberes Panel, ungefüllte Dreiecke) wurde in der SNB19 Zelllinie ein relativer ATP Gehalt von ca. 0,8 ermittelt. Dies entspricht ungefähr dem ATP Gehalt, welcher auch für eine alleinige Inkubation mit 50 nM NVP-BEZ235 gemessen wurde. Bei A549 Zellen wurde für die Kombination von 50 nM NVP-BEZ235 mit verschiedenen AZD6244 Konzentrationen ein relativer ATP Gehalt von 0,5 bestimmt, was ebenfalls ungefähr dem ATP Gehalt nach alleiniger Inkubation mit 50 nM NVP-BEZ235 entspricht und was auf eine hohe Zytotoxizität von NVP-BEZ235 in dieser Zelllinie hindeutet. Wurden die A549 Zellen zusätzlich mit höheren Konzentrationen von AZD6244 (größer 1000 nM) behandelt, so konnte eine Reduktion des ATP Gehaltes auf bis zu ca. 10 % beobachtet werden.

Eine Kombination von 500 nM AZD6244 mit steigenden Konzentrationen von NVP-BEZ235 (vgl. Abbildung 4-26 unteres Panel, ungefüllte Rauten) hatte in SNB19 Zellen keinerlei nennenswerte Auswirkungen auf den relativen ATP Gehalt im Ver-

gleich zur alleinigen Inkubation mit NVP-BEZ235. In der A549 Zelllinie hingegen konnte bei niedrigen NVP-BEZ235 Konzentrationen eine leichte Erniedrigung des ATP Gehaltes beobachtet werden. Ab einer NVP-BEZ235 Konzentration von 10 nM war dieser Effekt allerdings nicht mehr nachzuweisen und es konnten keine Unterschiede zwischen einer Behandlung mit NVP-BEZ235 alleine oder in Kombination mit AZD6244 nachgewiesen werden.

Die für weitere Versuche gewählten Konzentrationen von 500 nM für AZD6244 und 50 nM für NVP-BEZ235 sind gemäß den vorhandenen Literaturdaten in einem Bereich, in dem die Aktivität der MAPK und der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade durch AZD6244 und NVP-BEZ235 unterdrückt ist (Chung u. a., 2009; Maira u. a., 2008; Shannon u. a., 2009; Yeh u. a., 2007).

4.3.2 EFFEKTE DER MEK- UND DER DUALEN PI3K/mTOR-INHIBITION AUF DIE KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT NACH BESTRAHLUNG

Um zu untersuchen, ob die beiden in dieser Studie untersuchten Inhibitoren AZD6244 und NVP-BEZ235 einen Einfluss auf das klonogene Überleben der Glioblastomzelllinie SNB19 und der Lungenkarzinomzelllinie A549 nach Bestrahlung haben, wurden Koloniebildungstests gemäß dem in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Protokoll durchgeführt. In Abbildung 4-27 und in Tabelle 4-5 sind die Ergebnisse aus mindestens vier unabhängigen Koloniebildungstests dargestellt.

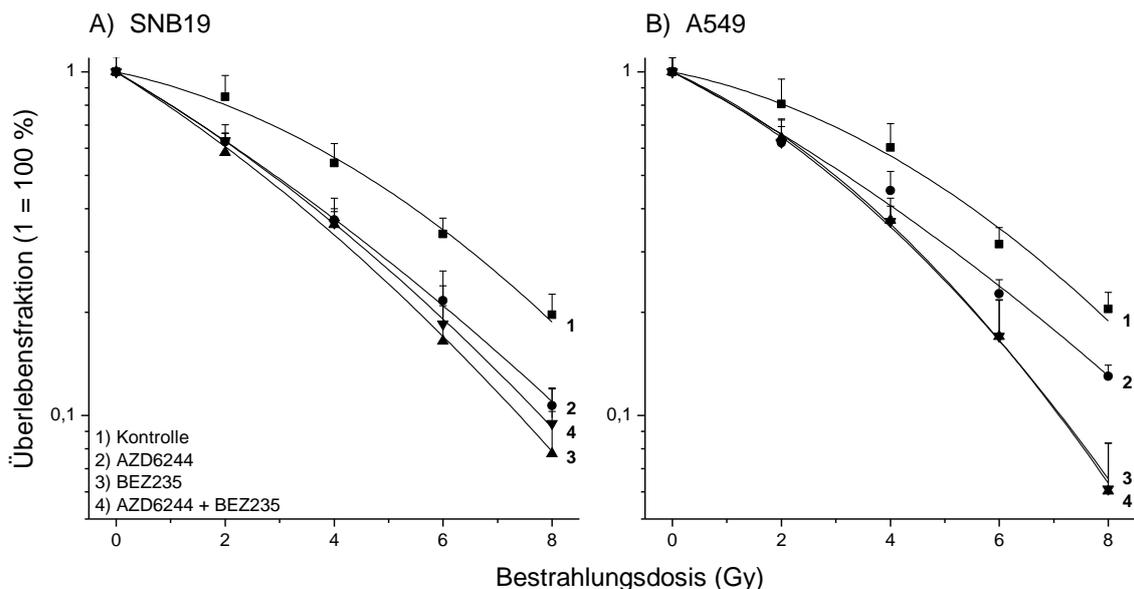


Abbildung 4-27 Koloniebildungsfähigkeit von SNB19 und A549 Zellen nach Inhibition der MAPK- und/oder der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade

Ergebnisse der untersuchten SNB19 (A) und A549 (B) Zellen, welche mit 500 nM des MEK Inhibitors AZD6244 (2), mit 50 nM des dualen PI3K/mTOR Inhibitors NVP-BEZ235 (3) oder mit einer Kombination von beiden Inhibitoren (4) behandelt wurden. Mit DMSO behandelte Zellen (1) dienten als Kontrolle. Die genauen Schemata, der Versuchsablauf, sowie die Auswertung sind in Abbildung 3-2 und Kapitel 3.2.4 detailliert erklärt. Zwei Wochen nach der Aussaat der Zellen wurden diese fixiert und die Anzahl von Kolonien mit mindestens 50 Zellen wurde ermittelt. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Versuchen und die Linien zeigen die besten Anpassungen mit dem linearquadratischen Modell.

Wie in Tabelle 4-5 dargestellt, hatte eine Inkubation mit einem oder beiden der untersuchten Inhibitoren keinen nennenswerten Einfluss auf die Plattiereffizienz der Zellen, was darauf schließen lässt, dass bei den verwendeten Konzentrationen von 500 nM für AZD6244 und 50 nM für NVP-BEZ235 keine zytotoxischen Effekte auftraten.

Tabelle 4-5 Mittelwerte der PE, SF2, D₁₀ und I₁₀ in SNB19 und A549 Zellen

Mittelwerte (\pm SD) der PE, SF2, D₁₀ und I₁₀ aus mindestens vier unabhängig durchgeführten Versuchen nach Behandlung der untersuchten SNB19 und A549 Zellen mit 500 nM AZD6244 und/oder 50 nM NVP-BEZ235.

Zelllinie	Behandlung	PE	SF2	D ₁₀	I ₁₀
SNB19	Kontrolle	53 \pm 9	0,81 \pm 0,10	9,84 \pm 0,89	
	AZD6244	57 \pm 11	0,64 \pm 0,06	8,24 \pm 0,48	1,19 \pm 0,08
	BEZ235	53 \pm 10	0,62 \pm 0,07	7,38 \pm 0,39	1,33 \pm 0,07
	AZD6244+BEZ235	52 \pm 5	0,63 \pm 0,07	7,86 \pm 0,88	1,28 \pm 0,12
A549	Kontrolle	73 \pm 7	0,80 \pm 0,05	9,81 \pm 0,68	
	AZD6244	79 \pm 12	0,66 \pm 0,05	8,86 \pm 0,58	1,11 \pm 0,07
	BEZ235	72 \pm 9	0,66 \pm 0,07	7,15 \pm 0,87	1,39 \pm 0,09
	AZD6244+BEZ235	74 \pm 10	0,65 \pm 0,07	7,06 \pm 0,60	1,38 \pm 0,05

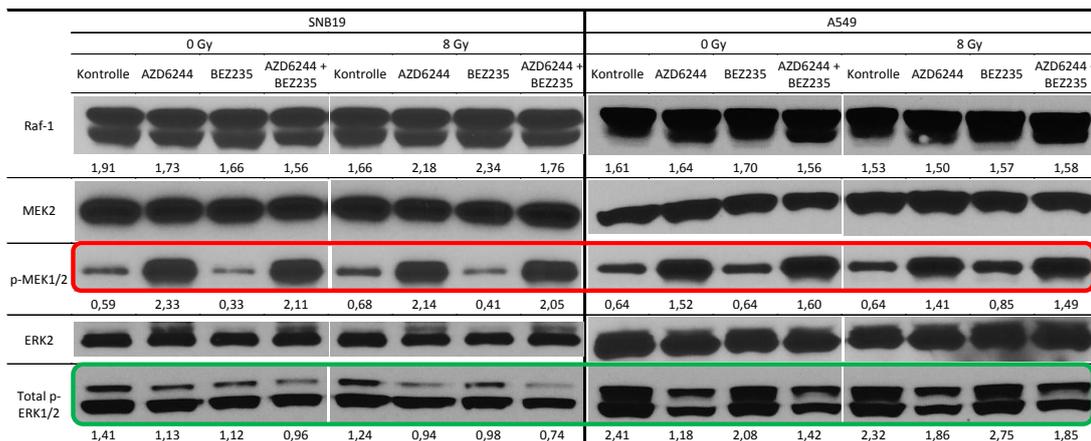
Die unterschiedlichen Kurvenverläufe (siehe Abbildung 4-27) sowie die Änderungen der mittleren SF2 und D₁₀ Werte (vgl. Tabelle 4-5) weisen darauf hin, dass eine Inhibition des onkogenen MAPK Signalweges durch AZD6244 eine moderate Radiosensibilisierung in SNB19 und A549 Zellen bewirkt. Eine Inkubation mit 50 nM des dualen PI3K/mTOR Inhibitors NVP-BEZ235 hingegen resultierte in beiden Zelllinien in einer deutlich stärkeren Radiosensibilisierung, wobei die Lungenkarzinomzelllinie A549 hierbei die größeren Effekte zeigte. So wurden in A549 Zellen für den dualen PI3K/mTOR Inhibitor ein I₁₀ Wert von ungefähr 1,4 und in SNB19 Zellen von ungefähr 1,3 gemessen. Eine Kombination der beiden Inhibitoren resultierte in beiden Zelllinien in ähnlichen I₁₀ Werten wie nach einer alleinigen Behandlung mit NVP-BEZ235.

4.3.3 AZD6244- UND NVP-BEZ235-INDUZIERTE ÄNDERUNGEN IN DER EXPRESSION VON PROTEINEN ONKOGENER SIGNALKASKADEN

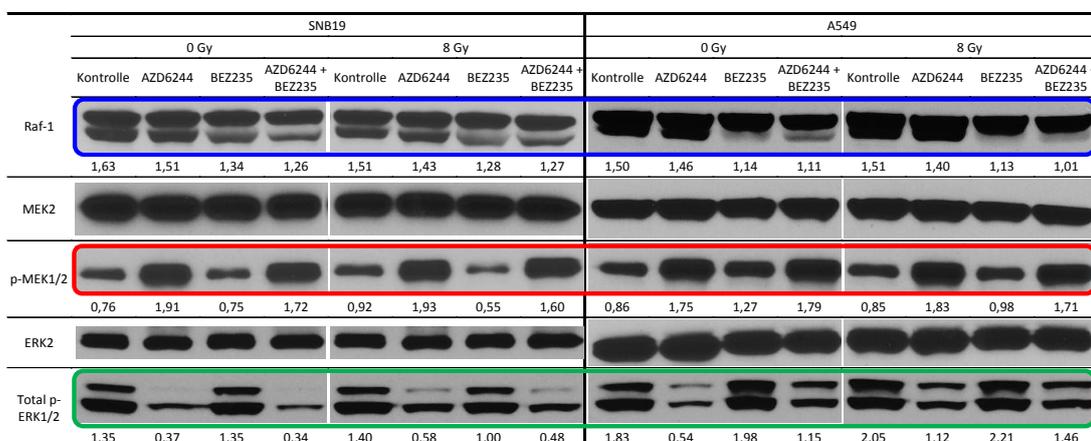
4.3.3.1 ÄNDERUNGEN IN DER MAPK SIGNALKASKADE

Um eine mögliche molekularbiologische Ursache für die Radiosensibilisierung durch die beiden Inhibitoren zu finden, wurde die Expression ausgesuchter wichtiger Proteine des MAPK und des PI3K/Akt/mTOR Signalweges untersucht. Hierfür wurden SNB19 und A549 Zellen mit den Inhibitoren behandelt und Zelllysate zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung angefertigt. In Abbildung 4-28 sind repräsentative Proteinexpressionen wichtiger Komponenten der MAPK/Erk Signalkaskade (Raf-1, MEK2, p-MEK1/2, Erk2, total p-Erk1/2) 30 min (A), 24 (B) und 48 h (C) nach Bestrahlung mit 8 Gy in SNB19 (linkes Panel) und A549 Zellen (rechtes Panel) dargestellt.

A 30 min post IR



B 24 h post IR



C 48 h post IR

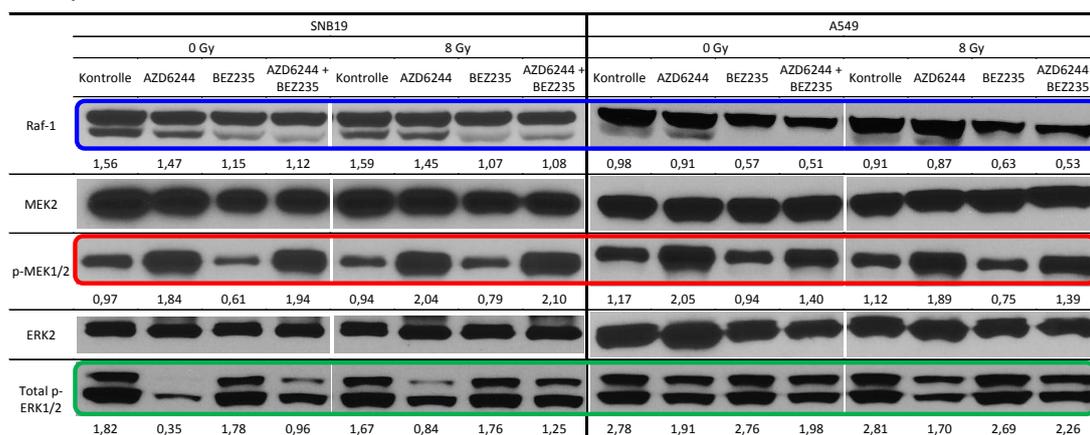


Abbildung 4-28 Western blot Ergebnisse wichtiger Proteine der MAPK Signalkaskade in SNB19 und A549 Zellen

Repräsentative Western blot Ergebnisse von SNB19 (linkes Panel) und A549 Zellen (rechtes Panel) 30 min (A), 24 (B) und 48 h (C) nach Bestrahlung mit 8 Gy. Die Zellen wurden mit 500 nM AZD6244 und/oder 50 nM NVP-BE235 behandelt (vgl. Abbildung 3-2). Mit DMSO behandelte und unbestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zahlen unter den Banden geben das Verhältnis zur entsprechenden β -Aktinbande an, welche als Beladungskontrolle diente.

Eine Inkubation für 16 h mit dem allosterischen MEK Inhibitor AZD6244 hatte, wie in Abbildung 4-28 A dargestellt, keine Auswirkungen auf die Expressionsniveaus von Raf-1, MEK2 oder Erk2 in den beiden untersuchten Zelllinien 30 min nach IR. Interessanterweise konnte eine deutliche Erhöhung der Phosphorylierung von MEK nach Inkubation mit AZD6244 beobachtet werden (vgl. blaue Hervorhebung 0,59 \rightarrow 2,33 rel. Einheiten in SNB19 und von 0,64 \rightarrow 1,41 rel. Einheiten in A549 Zellen). Diese Effekte wurden in beiden Zelllinien ebenso bei einer Kombination von AZD6244 und NVP-2315 und unabhängig von der Bestrahlung mit 8 Gy beobachtet. Ebenfalls in beiden Zelllinien und ebenfalls unabhängig von der Bestrahlung konnte, wie in Abbildung 4-28 A gezeigt, eine Reduktion der Phosphorylierung von Erk1/2 nach Inkubation mit dem MEK Inhibitor beobachtet werden (vgl. grüne Hervorhebung), obgleich diese in den *KRAS* mutierten A549 Zellen prominenter ausfiel (von 2,41 \rightarrow 1,18 rel. Einheiten) als in der Glioblastomzelllinie SNB19 (von 1,41 \rightarrow 1,13 rel. Einheiten).

Eine Inkubation mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BE235 hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die Proteinexpression von Raf-1, MEK, p-MEK, Erk2 oder p-Erk1/2 30 min nach Bestrahlung. Ebenso resultierte die simultane Behandlung mit AZD6244 und NVP-BE235 in keinen weiteren als die bereits für eine alleinige Inkubation mit AZD6244 beschriebenen Effekte. Auch hatte die Bestrahlung in beiden hier

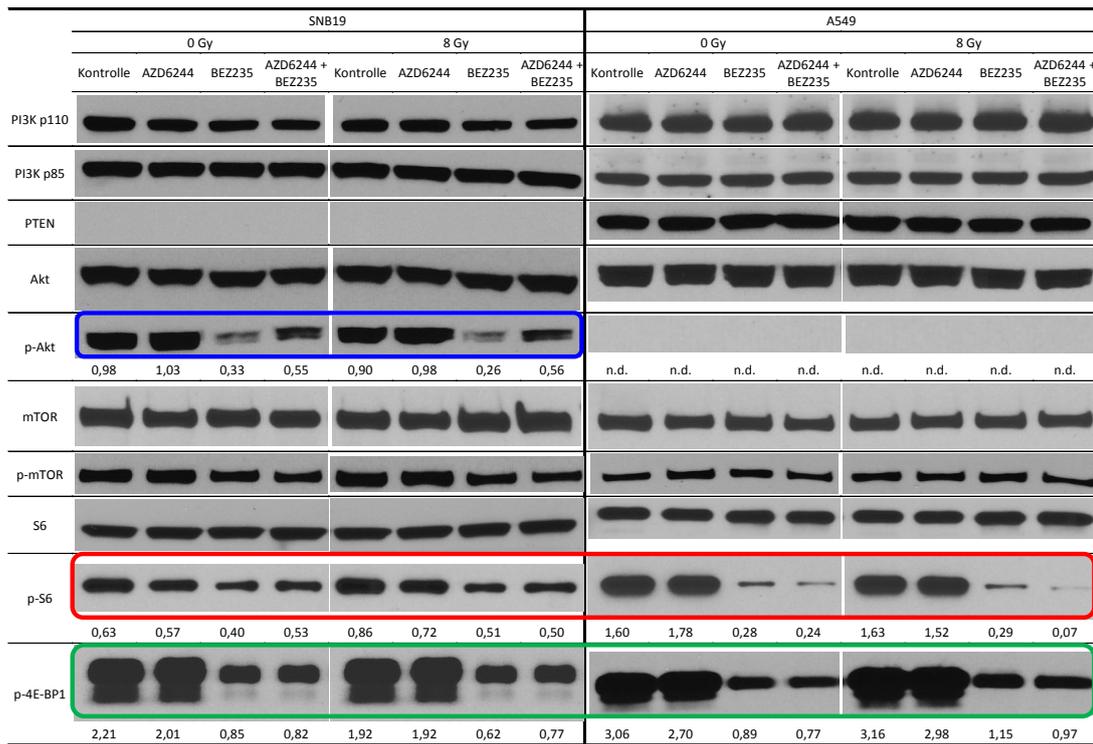
untersuchten Zelllinien keinen weiteren nennenswerten Einfluss auf die untersuchten Proteine.

Wie bereits nach 30 min konnte auch 24 und 48 h nach der Bestrahlung in beiden Zelllinien in den mit AZD6244 behandelten Zellen weiterhin eine erhöhte Phosphorylierung von MEK sowie eine erniedrigte Phosphorylierung von ERK1/2 unabhängig von der Bestrahlung beobachtet werden (vgl. rote und grüne Hervorhebung in Abbildung 4-28 B und C). Interessanterweise resultierte eine Behandlung mit NVP-BEZ235 in beiden Zelllinien 24 und 48 h nach Bestrahlung in einer verminderten Expression von Raf-1 (vgl. blaue Hervorhebung in Abbildung 4-28 B und C), welche in den Lungenkarzinomzellen stärker ausgeprägt war. So verringerte sich der relative Raf-1 Gehalt 24 h nach Bestrahlung in der SNB19 Zelllinie in den NVP-BEZ235 behandelten Proben von 1,63 (Kontrolle) auf 1,34 (BEZ235) und in der A549 Zelllinie von 1,50 (Kontrolle) auf 1,14 (BEZ235) relative Einheiten. Diese Reduzierung der Raf-1 Expression zum Zeitpunkt 24 und 48 h nach Bestrahlung wurde in beiden untersuchten Zelllinien ebenfalls in der Kombination von NVP-BEZ235 mit AZD6244 und unabhängig von der Bestrahlung gemessen.

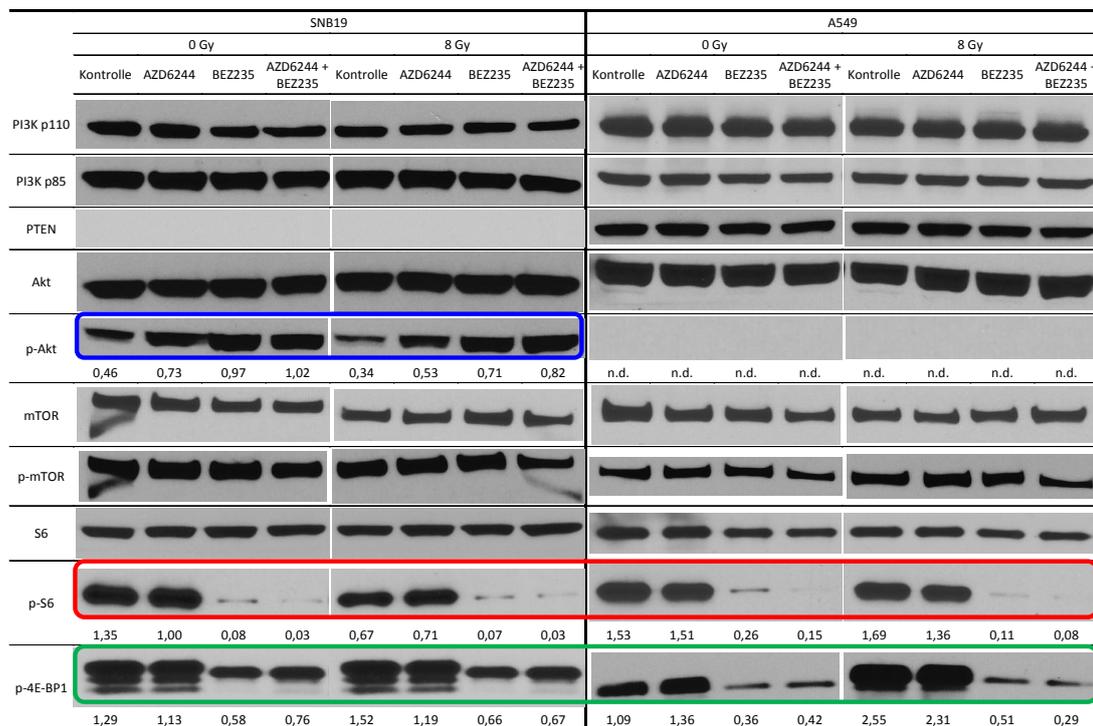
4.3.3.2 ÄNDERUNGEN IN DER PI3K/AKT/MTOR SIGNALKASKADE

Um weitere molekularbiologische Gründe für die Radiosensibilisierung zu finden, wurde die Expression verschiedener Schlüsselproteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. In Abbildung 4-29 sind repräsentative Proteinexpressionen der beiden PI3K Untereinheiten p110 und p85 sowie von PTEN, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, S6, p-S6 und p-4E-BP1 30 min (A), 24 (B) und 48 h (C) nach Bestrahlung dargestellt.

A) 30 min post IR



B) 24 h post IR



C) 48 h post IR

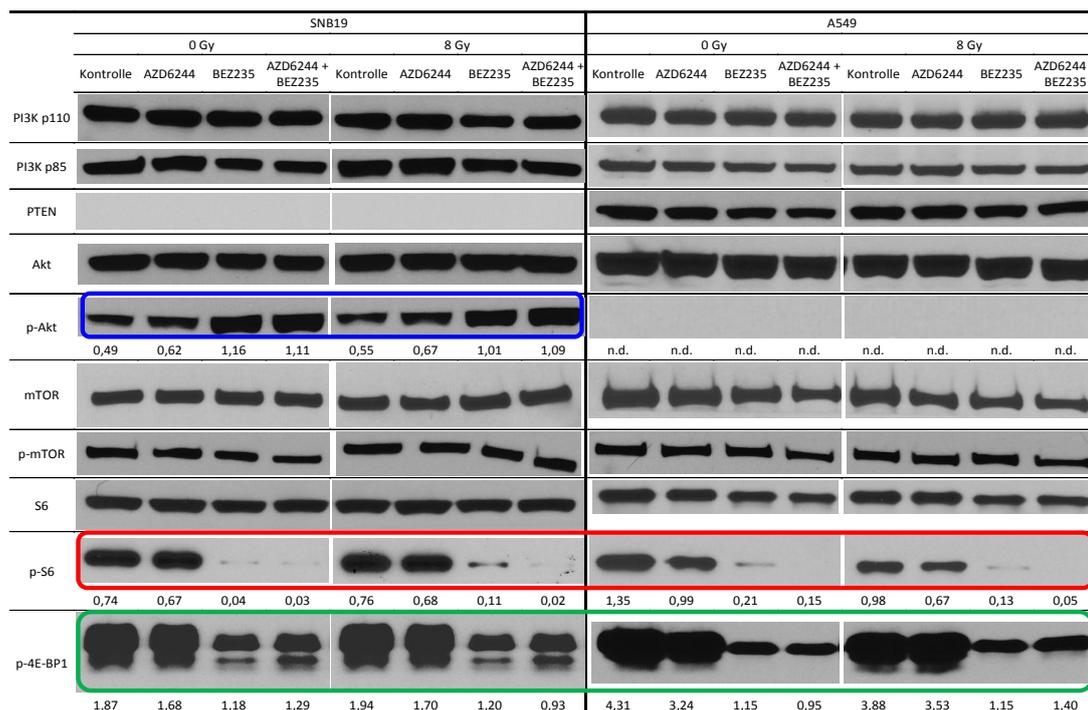


Abbildung 4-29 Western blot Ergebnisse wichtiger Proteine der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade in SNB19 und A549 Zellen

Repräsentative Western blot Ergebnisse von SNB19 (linkes Panel) und A549 Zellen (rechtes Panel) 30 min (A), 24 (B) und 48 h (C) nach Bestrahlung mit 8 Gy. Die Zellen wurden mit 500 nM AZD6244 und/oder 50 nM NVP-BE235 behandelt (vgl. Abbildung 3-2). Mit DMSO behandelte Zellen dienen als Kontrolle. Die Zahlen unter den Banden geben das Verhältnis zur entsprechenden β -Aktinbande an, welche als Beladungskontrolle diente.

Es ist deutlich sichtbar, dass das Tumorsuppressorprotein PTEN in der Glioblastomzelllinie SNB19 zu keinem Zeitpunkt nachweisbar war, wohingegen das PTEN in der Lungenkarzinomzelllinie A549 zu allen drei untersuchten Zeitpunkten stabil und unabhängig von der Behandlung mit AZD6244 oder NVP-BE235 sowie von der Bestrahlung exprimiert wurde (vgl. Abbildung 4-29 A, B und C). Die Abwesenheit von PTEN, welcher ein negativer Regulator des PI3K/Akt/mTOR Signalweges ist (Cully u. a., 2006; Downward, 2008; Phin u. a., 2013), korrelierte zudem mit p-Akt, welches nur in der *PTEN* mutierten SNB19 Zelllinie nachweisbar war (vgl. blaue Hervorhebung in Abbildung 4-29 A, B und C).

Eine Inkubation mit dem allosterischen MEK Inhibitor AZD6244 hatte zu keinem der drei untersuchten Zeitpunkte einen nennenswerten Einfluss auf die Proteinexpression der für den PI3K/Akt/mTOR Signalweg relevanten Proteine (vgl. Abbildung 4-29 A, B und C). Nach einer Inkubation mit 50 nM NVP-BE235 wurden ebenfalls 30 min nach Bestrahlung keine Unterschiede in der Expression der beiden PI3K Untereinheiten p110

und p85 in den beiden untersuchten Zelllinien beobachtet. Wie in Abbildung 4-29 A (linkes Panel) gezeigt, war die Phosphorylierung von Akt hingegen in SNB19 Zellen, welche mit NVP-BEZ235 behandelt wurden, bereits 1,5 h nach Zugabe des Inhibitors deutlich verringert (vgl. blaue Hervorhebung in Abbildung 4-29 A). Dieser Effekt in SNB19 war unabhängig von der simultanen Inkubation mit AZD6244 oder der Bestrahlung und konnte in A549 Zellen nicht beobachtet werden, da p-Akt in diesen Zellen nicht detektierbar war.

Weiterhin wurde die Proteinexpression von mTOR, p-mTOR, S6, p-S6 und p-4E-BP1 untersucht, welche in der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade allesamt Akt nachgeschaltet sind (Holmes, 2011). Weder eine Inkubation mit AZD6244 oder NVP-BEZ235 noch eine Bestrahlung mit 8 Gy hatten 30 min nach Bestrahlung in beiden untersuchten Zelllinien einen Effekt auf die Expression von mTOR, p-mTOR und S6. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 und S6 hingegen wurde unabhängig von der Bestrahlung oder der Behandlung mit AZD6244 in beiden Zelllinien durch den dualen PI3K/mTOR Inhibitor negativ reguliert (vgl. rote und grüne Hervorhebungen in Abbildung 4-29 A).

Auch 24 und 48 h nach Bestrahlung wurde diese NVP-BEZ235 induzierte Dephosphorylierung von 4E-BP1 und S6 in beiden Zelllinien unabhängig von der Bestrahlung beobachtet (vgl. rote und grüne Hervorhebungen in Abbildung 4-29 B und C). Allerdings wurde im Gegensatz zur Inaktivierung von Akt in SNB19 Zellen 30 min nach Bestrahlung (vgl. Abbildung 4-29 A), 24 und 48 h nach IR eine erhöhte Akt Phosphorylierung nachgewiesen (vgl. blaue Hervorhebung in Abbildung 4-29 B und C). Diese zeitlich verzögerte Aktivierung von Akt nach Inhibition des PI3K/Akt/mTOR Signalweges durch NVP-BEZ235 in der Glioblastomzelllinie SNB19 wurde analog ebenso in den anderen untersuchten Glioblastomzelllinien beobachtet (vgl. Kapitel 4.1.3).

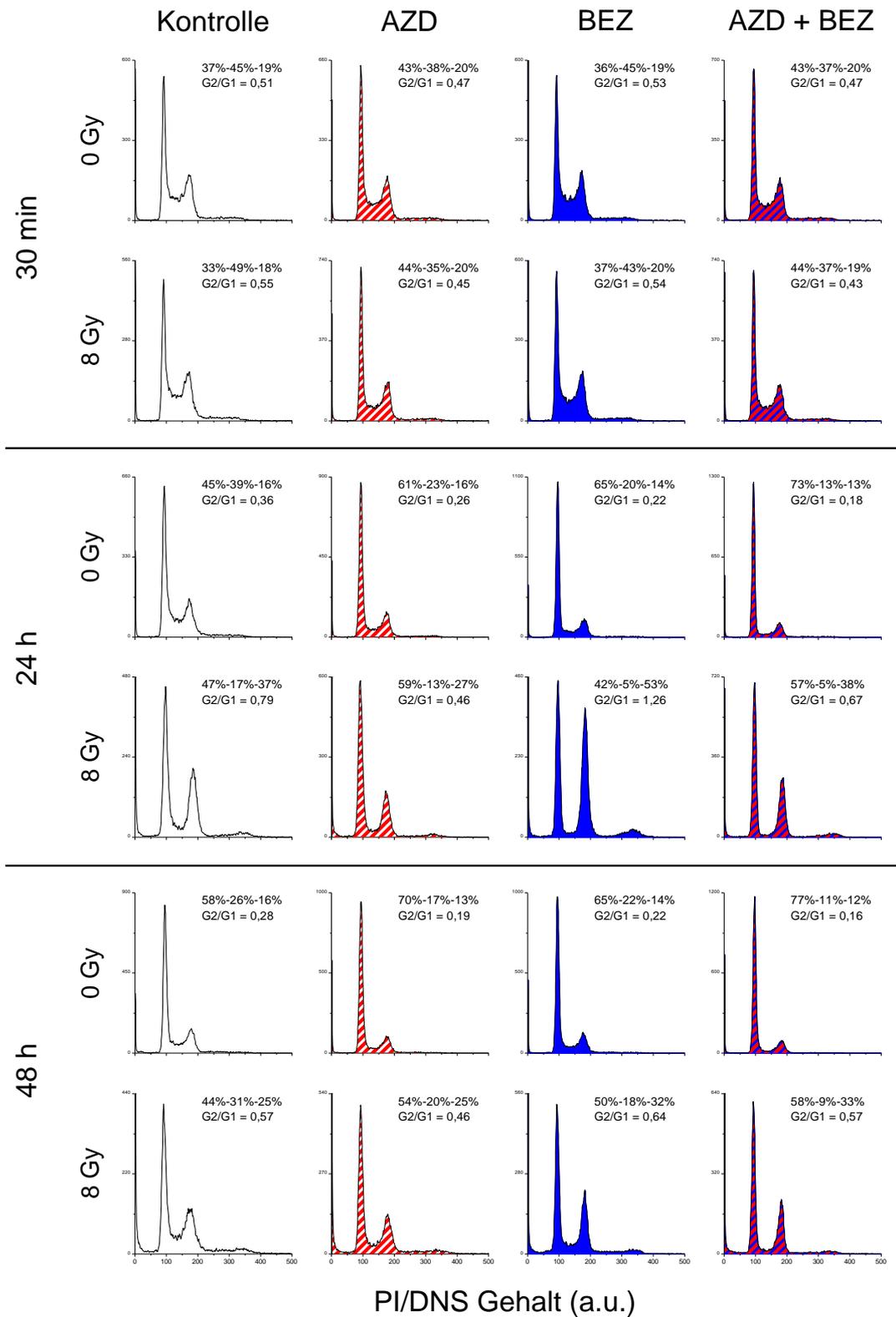
4.3.4 EINFLUSS DER MEK-, PI3K/MTOR-INHIBITION UND BESTRAHLUNG AUF DEN ZELLYKLUS

4.3.4.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN DES ZELLYKLUS

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die beiden Inhibitoren und die Bestrahlung auf den Zellzyklus haben, wurden SNB19 und A549 Zellen 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung mit 8 Gy mit eiskaltem Ethanol fixiert, rehydratisiert, mit RNase behandelt und anschließend mit einem DNS-Farbstoff angefärbt (vgl. Kapitel 3.2.6.1). In Abbildung 4-30 sind die repräsentative Zellzyklusverteilung der untersuchten Glioblastom-

zelllinie SNB19 (A) und der Lungenkarzinomzelllinie A549 (B) abgebildet, wohingegen in Abbildung 4-31 die Mittelwerte (\pm eine SD) aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen dargestellt sind. Um die durch alleinige Behandlung mit AZD6244 oder NVP-BEZ235 sowie durch die simultane Applikation beider Inhibitoren induzierten Effekte auf den Zellzyklus zu verdeutlichen, sind diese in Tabelle 4-6 dargestellt.

A SNB19



B A549

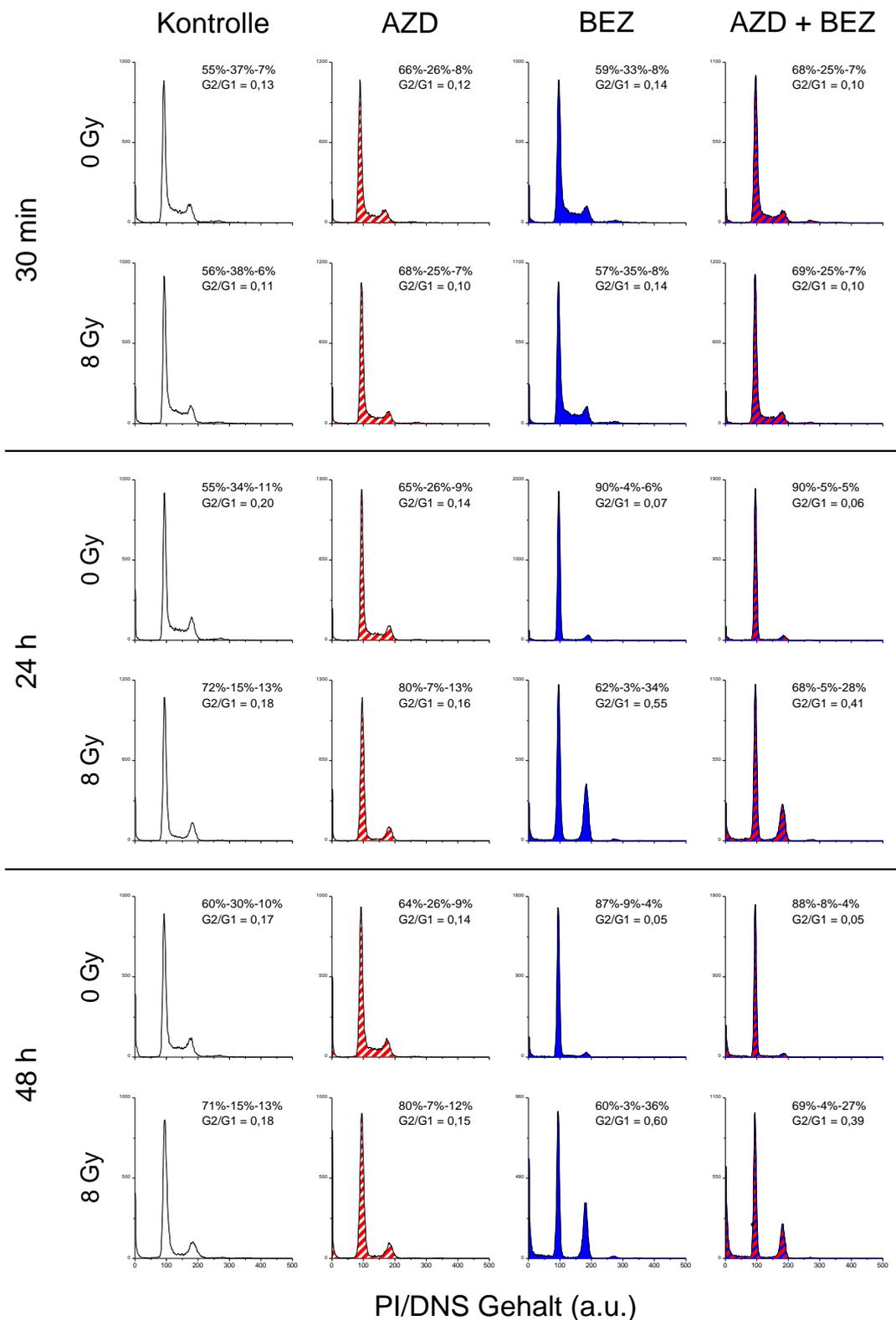


Abbildung 4-30 Repräsentative Zellzyklusverteilung in SNB19 und A549 Zellen

Repräsentative Darstellung der Effekte von AZD6244 (rot gestreifte Histogramme), NVP-BEZ235 (blaue Histogramme), deren Kombination (rot-blau gestreifte Histogramme) sowie einer Bestrahlung mit 8 Gy auf den Zellzyklus in SNB19 (A) und A549 (B) Zellen. Die Proben wurden 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung mit Ethanol fixiert, permeabilisiert, mit RNase behandelt, mit einem DNS-Farbstoff gefärbt

und durchflusszytometrisch auf ihren DNS-Gehalt analysiert. Aus den DNS-Histogrammen wurde mittels der ModFit Software der Anteil an Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet und in den jeweiligen Histogrammen angegeben.

A SNB19

B A549

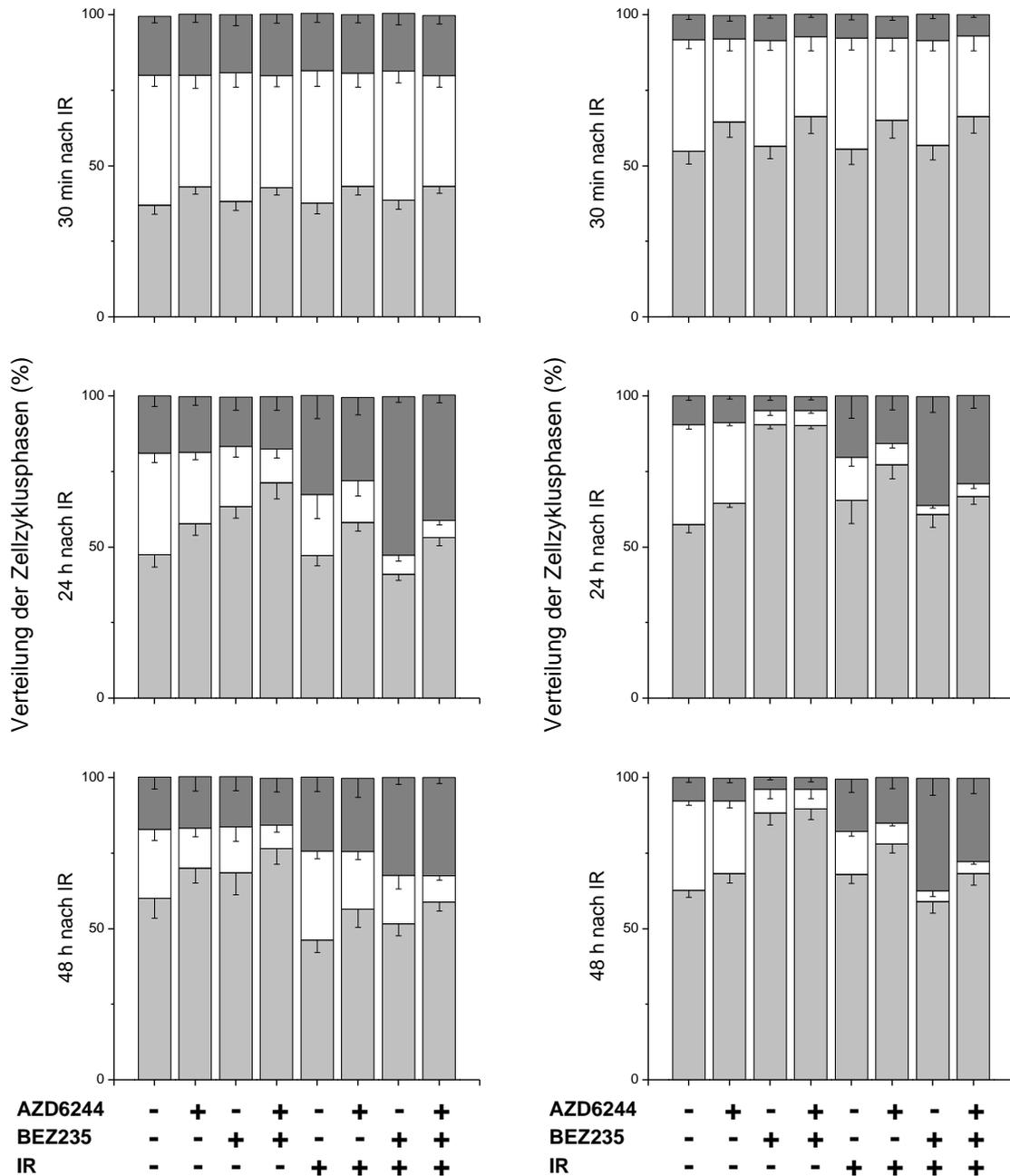


Abbildung 4-31 Mittelwerte der Verteilungen der Zellzyklusphasen nach Behandlung mit AZD6244 und/oder NVP-BEZ235

Aus mindestens drei unabhängigen Versuchen gemittelte Verteilung (\pm eine SD) der G1- (hellgraue Balken), S- (weiße Balken) und G2/M-Phase (dunkelgraue Balken) in SNB19 (A) und A549 (B) Tumorzellen, welche mit AZD6244 und/oder NVP-BEZ235 behandelt und mit 8 Gy bestrahlt wurden. Mit DMSO behandelte und unbestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Die Proben wurden 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert, permeabilisiert, mit einem DNS-Farbstoff angefärbt und durchflusszytometrisch auf ihren DNS-Gehalt untersucht.

Der hohe Anteil an Zellen in der S- und G2/M-Phase 30 min nach Bestrahlung belegt, dass die Zellen zu Beginn der Experimente im exponentiellen Wachstum waren (vgl. Abbildung 4-30 und Abbildung 4-31). Eine Inkubation mit 500 nM des MEK Inhibitors AZD6244 (rot gestreifte Histogramme) führte in SNB19 Zellen zu einer leichten Erhöhung des Anteils von Zellen in der G1-Phase 30 min nach Bestrahlung, wohingegen eine Inkubation mit 50 nM NVP-BEZ235 (blaue Histogramme) und/oder eine Bestrahlung mit 8 Gy keinerlei nennenswerten Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklusphasen 30 min nach Bestrahlung hatten (vgl. Abbildung 4-30 A und Abbildung 4-31).

In den mit AZD6244 behandelten SNB19 Zellen (Abbildung 4-30 A rot gestreifte Histogramme) wurde 24 h nach Bestrahlung, wie auch schon bei 30 min nach Bestrahlung, ein höherer Anteil an Zellen in der G1-Phase als in der Kontrolle (61 % zu 45 %) gemessen (vgl. Abbildung 4-30 A). Wurden die Zellen mit NVP-BEZ235 behandelt (blaue Histogramme), so wurde ebenfalls eine erhöhte Proportion an Zellen in der G1-Phase detektiert (65 %). Eine Kombination beider Inhibitoren (rot-blau gestreifte Histogramme) resultierte in einer weiteren Zunahme des Anteils der Zellen in der G1-Phase (73 %) im Vergleich zu beiden Inhibitoren alleine (vgl. Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6 Effekte der Behandlung mit AZD6244, NVP-BEZ235 und Bestrahlung auf den Zellzyklus

Effekte der Behandlung mit AZD6244, NVP-BEZ235, einer Kombination aus beiden Inhibitoren und Bestrahlung in SNB19 und A549 Zellen 24 und 48 h nach Bestrahlung. Die Tabelle stellt eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abbildung 4-30 und Abbildung 4-31 dar. Die angegebenen Effekte sind bei beiden Zelllinien auf die jeweiligen Kontrollen bezogen (wobei die bestrahlten auf die unbestrahlten Kontrollzellen bezogen sind) und die Effektstärke ist wie folgt dargestellt: ‚**Effekt**‘ beschreibt einen starken Effekt, ‚Effekt‘ beschreibt einen mittelmäßigen Effekt und ‚Effekt‘ beschreibt einen moderaten Effekt.

Zelllinie	Behandlung	0 Gy	8 Gy
SNB19	Kontrolle	-	G2/M-Arrest
	AZD6244	G1-Arrest	G1- und G2/M-Arrest
	BEZ235	G1-Arrest	G2/M-Arrest
	AZD6244+BEZ235	G1-Arrest	G1- und G2/M-Arrest
A549	Kontrolle	-	G1- und G2/M-Arrest
	AZD6244	G1-Arrest	G1-Arrest
	BEZ235	G1-Arrest	G2/M-Arrest
	AZD6244+BEZ235	G1-Arrest	G1- und G2/M-Arrest

Eine Bestrahlung von SNB19 Zellen mit 8 Gy resultierte, wie in Abbildung 4-30 A und Abbildung 4-31 dargestellt, 24 h nach Bestrahlung in einer Akkumulation von Zellen in

der G2/M-Phase (37 % bei Kontrolle 8 Gy vs. 16 % bei Kontrolle 0 Gy) sowie in einer Depletion der S-Phase (17 % bei Kontrolle 8 Gy vs. 39 % bei Kontrolle 0 Gy). Wurden die SNB19 Zellen mit AZD6244 behandelt, so war der zuvor erwähnte G2/M Zellzyklusarrest schwächer ausgeprägt als nach alleiniger Bestrahlung, wobei zusätzlich ein erhöhter Anteil an Zellen in der G1-Phase (59 % bei AZD6244 8 Gy vs. 47 % bei Kontrolle 8 Gy) gemessen wurde. Eine Inkubation mit NVP-BEZ235 (Abbildung 4-30 A blaue Histogramme) bedingte 24 h nach einer Bestrahlung mit 8 Gy eine Depletion der S-Phase (5 %) und eine starke Akkumulation von SNB19 Zellen in der G2/M-Phase (53 %). Eine Kombination beider Inhibitoren (Abbildung 4-30 A rot-blau gestreifte Histogramme) und Bestrahlung mit 8 Gy resultierte in einer Mischform aus den Erscheinungsbildern für die einzelnen Inhibitoren: Es wurde ein schwächerer G1-Arrest als bei Behandlung mit AZD6244 und ein schwächerer G2/M-Arrest als bei Behandlung mit NVP-BEZ235 gefunden (vgl. Abbildung 4-31 und Tabelle 4-6).

Achtundvierzig Stunden nach Bestrahlung wurde in den unbestrahlten SNB19 Kontrollzellen eine Erniedrigung an Zellen in der S- und G2/M-Phase beobachtet (im Vgl. zu 30 min und 24 h nach Bestrahlung), was sich dadurch erklären lässt, dass die Zellen konfluent wurden und somit ihr Wachstum einschränkten (vgl. Abbildung 4-30 A und Abbildung 4-31). Im Großen und Ganzen konnten 48 h nach IR in den SNB19 Zellen die gleichen Effekte der Inhibitoren wie auch schon 24 h nach IR beobachtet werden: eine erhöhte Fraktion an Zellen in der G1-Phase für beide Inhibitoren, sowie eine Verstärkung dieses G1-Arrestes bei simultaner Inkubation mit AZD6244 und NVP-BEZ235 (vgl. Abbildung 4-30 A und Abbildung 4-31).

Wurden die SNB19 Zellen mit 8 Gy bestrahlt, so war 48 h nach der Bestrahlung der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase niedriger als 24 h nach Bestrahlung. Weiterhin konnte eine deutliche Erhöhung der Zellen in der S-Phase gemessen werden (im Vgl. zur Kontrolle 8 Gy 24 h nach IR), was auf eine Aufhebung der Zellzyklusblockade und eine Normalisierung des Zellzyklus hindeutet (vgl. Abbildung 4-30 A und Abbildung 4-31). In den mit AZD6244 behandelten und bestrahlten Zellen (rot gestreifte Histogramme) konnte kein nennenswerter Unterschied in der Zellzyklusverteilung zwischen 48 und 24 h nach Bestrahlung festgestellt werden. Wurden die Zellen mit NVP-BEZ235 behandelt (blaue Histogramme) und bestrahlt, so konnte auch 48 h nach Bestrahlung eine erhöhte Fraktion an Zellen in der G2/M-Phase gemessen werden, auch wenn dieser Unterschied nicht mehr so prominent ausfiel wie 24 h nach Bestrahlung (vgl. Abbildung

4-30 A und Abbildung 4-31). Auch nach einer Kombination beider Inhibitoren (rot-blau gestreifte Histogramme) und Bestrahlung mit 8 Gy glich die Verteilung der Zellzyklusphasen in SNB19 Zellen nach 48 h weitestgehend der Verteilung 24 h nach Bestrahlung (vgl. Abbildung 4-30 A und Abbildung 4-31).

Analog zur SNB19 Zelllinie wurden in der A549 Zelllinie zu Beginn der Experimente hohe Anteile an Zellen in der S- und G2/M-Phase detektiert (vgl. Abbildung 4-30 B und Abbildung 4-31). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass zelllinienspezifische Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien auftraten. So wurden in A549 Zellen ein deutlich geringerer Anteil an G2/M-Phase Zellen gemessen als in SNB19 Zellen. Weiterhin wurde auch in der A549 Zelllinie 30 min nach Bestrahlung eine erhöhte Fraktion der G1-Phase Zellen nach Inkubation mit dem MEK-Inhibitor alleine (rot gestreifte Histogramme) oder nach Kombination von AZD6244 mit NVP-BEZ235 (rot-blau gestreifte Histogramme) beobachtet. Wie auch in den Glioblastomzellen wurde in den A549 Zellen kein nennenswerter Einfluss einer Bestrahlung mit 8 Gy oder einer Behandlung mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor alleine (blaue Histogramme) 30 min nach IR nachgewiesen (vgl. Abbildung 4-31).

Wie in Abbildung 4-30 B und Abbildung 4-31 gezeigt, wurde 24 h nach Bestrahlung analog zu 30 min nach Bestrahlung ein erhöhter Anteil an Zellen in der G1-Phase nach einer Behandlung mit AZD6244 beobachtet (65 % bei AZD6244 0 Gy vs. 55 % bei Kontrolle 0 Gy). Eine noch stärkere Erhöhung des Anteils der G1-Phase auf ca. 90 % wurde 24 h nach Bestrahlung in NVP-BEZ235 behandelten A549 Zellen (blaue Histogramme) gemessen (vgl. Abbildung 4-30 B und Abbildung 4-31). Nach einer Behandlung mit beiden Inhibitoren gleichzeitig (Abbildung 4-30 B rot-blau gestreifte Histogramme) wurden 24 h nach IR keine nennenswerten Unterschiede zur alleinigen Inkubation mit NVP-BEZ235 festgestellt.

Im Gegensatz zur *TP53* mutierten SNB19 Zelllinie resultierte eine Bestrahlung mit 8 Gy in der *TP53* wildtypischen A549 Zelllinie 24 h nach IR nicht in einem G2/M- sondern hauptsächlich in einem G1-Arrest (vgl. Abbildung 4-30 B 24 h; 72 % bei Kontrolle 8 Gy vs. 55 % bei Kontrolle 0 Gy), obgleich auch ein leichter G2/M Arrest beobachtet wurde (vgl. Abbildung 4-31). Wurden die Zellen zusätzlich zur Bestrahlung mit AZD6244 behandelt (rot gestreifte Histogramme), so erhöhte dies den Anteil an Zellen in der G1-Phase 24 h nach Bestrahlung nochmals von ca. 70 % (Kontrolle 8 Gy) auf ca. 80 % (AZD6244 8 Gy) der Zellen (vgl. Abbildung 4-30 B und Abbildung 4-31). Wur-

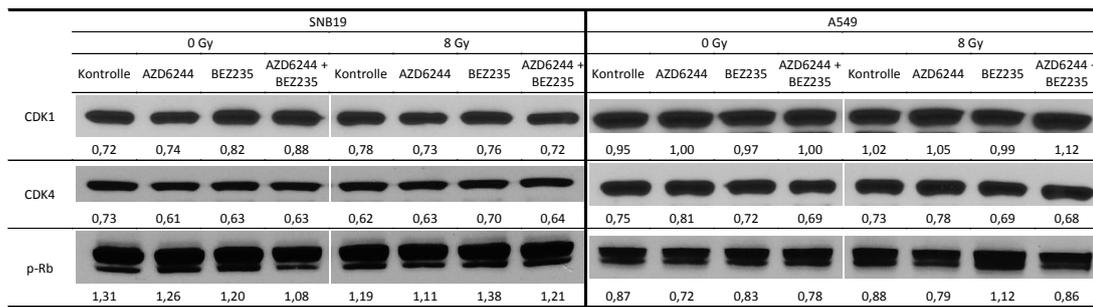
den die A549 Zellen hingegen vor der Bestrahlung mit NVP-BEZ235 behandelt (blaue Histogramme), so resultierte dies analog zur Glioblastomzelllinie in einer deutlich erhöhten Proportion an G2/M-Phase Zellen 24 h nach Bestrahlung (vgl. Abbildung 4-30 B und Abbildung 4-31). Ebenfalls analog zur SNB19 Zelllinie wurde 24 h nach IR in bestrahlten und simultan mit AZD6244 und NVP-BEZ235 behandelten A549 Zellen (rot-blau gestreifte Histogramme) eine Zellzyklusverteilung detektiert, die zwischen denen von bestrahlten und mit AZD6244 oder NVP-BEZ235 behandelten Zellen lag. So wurde ein niedrigerer Anteil von G1-Phase Zellen als in den mit AZD6244 behandelten Proben und ein niedrigerer Anteil von G2/M-Phase Zellen als in den mit NVP-BEZ235 behandelten Proben gemessen.

Auch in unbehandelten Lungenkarzinomzellen wurde 48 h nach Bestrahlung eine Erhöhung des Anteils an unbestrahlten Zellen in der G1-Phase beobachtet, obwohl diese im Vergleich zur Glioblastomzelllinie aufgrund des höheren Anteils an A549 G1-Phase Zellen im exponentiellen Wachstumszustand (ca. 55 %; vgl. Abbildung 4-30 B und Abbildung 4-31) nicht so prominent war. Wurden die Zellen mit AZD6244 (rot gestreifte Histogramme), NVP-BEZ235 (blaue Histogramme) oder einer Kombination aus beiden Inhibitoren (rot-blau gestreifte Histogramme) behandelt, so wurden 48 h nach Bestrahlung in den unbestrahlten und in den bestrahlten Zellen keine nennenswerten Unterschiede zu den Daten nach 24 h nach IR festgestellt (vgl. Abbildung 4-30 B und Abbildung 4-31).

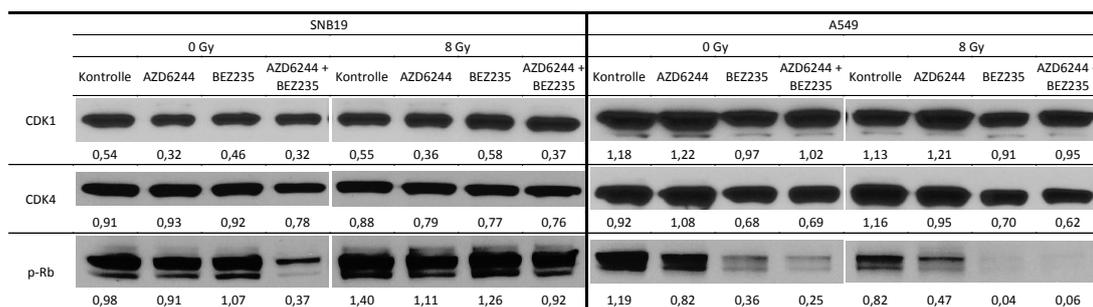
4.3.4.2 UNTERSUCHUNGEN ZELLYKLUSREGULATORISCHER PROTEINE MITTELS WESTERN BLOT

Um die durchflusszytometrischen Daten für die Zellzyklusverteilung zu überprüfen und zu validieren, wurden Western blots zellzyklusregulatorischer Proteine angefertigt. Hierfür wurden SNB19 und A549 Zellen gemäß dem Schema (vgl. Abbildung 3-2 C) mit den Inhibitoren behandelt und Zelllysate zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung angefertigt. In Abbildung 4-32 sind repräsentative Proteinexpressionen von CDK1, CDK4 und p-Rb 30 min (A), 24 (B) und 48 h (C) nach Bestrahlung mit 8 Gy in SNB19 (linkes Panel) und A549 Zellen (rechtes Panel) dargestellt.

A 30 min post IR



B 24 h post IR



C 48 h post IR

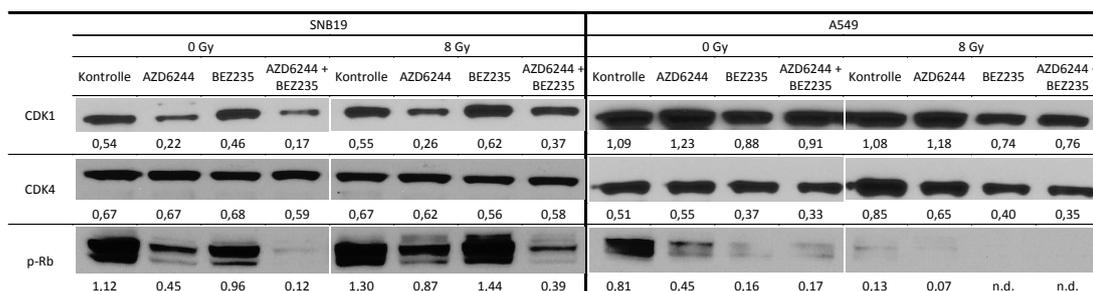


Abbildung 4-32 Western blot Ergebnisse zellzyklusrelevanter Proteine in SNB19 und A549 Zellen nach Behandlung mit AZD6244 und/oder NVP-BE235 und Bestrahlung

Repräsentative Western blot Ergebnisse von SNB19 (linkes Panel) und A549 Zellen (rechtes Panel) 30 min (A), 24 (B) und 48 h (C) nach Bestrahlung. Die Zellen wurden mit 500 nM AZD6244 und/oder 50 nM NVP-BE235 behandelt und mit 8 Gy bestrahlt (für weitere Details siehe Abbildung 3-2). Mit DMSO behandelte und unbestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zahlen unter den Banden geben das Verhältnis zur entsprechenden β -Aktin Beladungskontrolle an; n.d. bedeutet nicht detektierbar.

Wie in Abbildung 4-32 A dargestellt, wurden in SNB19 (linkes Panel) Zellen 30 min nach Bestrahlung keine nennenswerten Unterschiede in der Expression von CDK1, CDK4 und p-Rb in Abhängigkeit von einem der beiden untersuchten Inhibitoren oder von der Bestrahlung mit 8 Gy festgestellt. Ebenso wurde in den A549 Zellen zu diesem Zeitpunkt des Experiments keine nennenswerte Änderung in der Expression der drei untersuchten Zellzyklusregulatoren gemessen.

Wurden SNB19 Zellen mit dem MEK Inhibitor AZD6244 behandelt, so war 24 h nach Bestrahlung (vgl. Abbildung 4-32 B) eine leichte Reduktion der Expression von CDK1

nachweisbar. Dieser Effekt wurde ebenfalls nach einer kombinierten Behandlung mit AZD6244 und NVP-BEZ235 detektiert. Eine Inkubation mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor alleine hingegen hatte keinen nennenswerten Effekt auf die Expression von CDK1. In den bestrahlten SNB19 Zellen wurden 24 h nach IR qualitativ die gleichen Ergebnisse in Bezug auf die CDK1 Expression gemessen, nämlich eine leichte Reduktion in Abhängigkeit von der Behandlung mit AZD6244. Wie auch schon 30 min nach IR, war die Expression von CDK4 weder durch einen der beiden Inhibitoren, noch durch beide Inhibitoren zusammen und auch nicht durch die Bestrahlung mit 8 Gy beeinflusst.

Die Expression des G1-,checkpoint‘ Kontrollproteins p-Rb 24 h nach IR wurde in SNB19 Zellen durch eine Behandlung mit AZD6244 oder NVP-BEZ235 alleine nur marginal beeinflusst (vgl. Abbildung 4-32 B). Nach einer simultanen Inkubation mit AZD6244 und NVP-BEZ235 hingegen wurde eine deutliche Reduktion von p-Rb von ca. 1 relativen Einheit (Kontrolle oder nur mit einem Inhibitor behandelten Zellen) auf 0,37 relative Einheiten in den mit beiden Inhibitoren behandelten SNB19 Zellen beobachtet. Diese Reduktion von p-Rb korrelierte mit den durchflusszytometrisch bestimmten Zellzyklusdaten, da auch hier in SNB19 Zellen, die mit beiden Inhibitoren behandelt wurden, 24 h nach IR die höchste Fraktion von Zellen in der G1-Phase gemessen wurde (vgl. Abbildung 4-31).

Eine Bestrahlung von SNB19 Zellen resultierte 24 h nach IR in einem leichten Anstieg von p-Rb, was wiederum mit der erhöhten Anzahl an Zellen in der G2/M-Phase korrelierte (vgl. Abbildung 4-31 und Abbildung 4-32 B). Im Vergleich zu den bestrahlten Kontrollzellen wurde in den mit AZD6244 behandelten SNB19 Zellen eine leichte Reduktion von p-Rb von 1,40 auf 1,11 rel. Einheiten detektiert, was ebenfalls durch einen erhöhten Anteil an Zellen in der G1-Phase (im Vergleich zu bestrahlten Kontrollzellen) widerspiegelt wurde. Eine Behandlung mit NVP-BEZ235 und Bestrahlung hatte lediglich geringe Effekte auf das Expressionsniveau von p-Rb 24 h nach IR, wohingegen in bestrahlten und mit beiden Inhibitoren behandelten SNB19 Zellen wiederum eine leichte Reduktion von p-Rb messbar war.

Achtundvierzig Stunden nach der Bestrahlung (vgl. Abbildung 4-32 C) wurde in SNB19 Zellen eine deutliche Reduktion der CDK1 Expression in Abhängigkeit von der Behandlung mit AZD6244, wie sie bereits 24 h nach IR ansatzweise sichtbar war, beobachtet. Diese AZD6244-induzierte CDK1 Reduktion in den SNB19 Zellen war unab-

hängig von der Bestrahlung und wurde auch nach einer simultanen Behandlung mit NVP-BEZ235 gemessen. Eine Inkubation mit NVP-BEZ235 oder eine Bestrahlung der SNB19 Zellen hatte auch nach 48 h keinen Einfluss auf die Höhe der CDK4 Expression.

Im Gegensatz hierzu war das Expressionsniveau von p-Rb in der SNB19 Zelllinie 48 h nach IR deutlich durch AZD6244 reduziert (vgl. Abbildung 4-32 C). Auch nach einer Inkubation mit NVP-BEZ235 war die Expression von p-Rb in den Glioblastomzellen erniedrigt, wie in Abbildung 4-32 C dargestellt, wenn auch in einem geringeren Maße als nach Behandlung mit AZD6244. Wie auch schon nach 24 h nach IR, hatte auch 48 h nach IR eine simultane Behandlung mit beiden Inhibitoren den stärksten Effekt auf das p-Rb Expressionsniveau in der SNB19 Zelllinie. Diese massive Reduktion von p-Rb korrelierte auch 48 h nach IR mit der stärksten Erhöhung des Anteils an SNB19 Zellen in der G1-Phase (vgl. Abbildung 4-31).

Der Effekt des erhöhten p-Rb Niveaus in bestrahlten Kontrollzellen nach 24 h (vgl. Abbildung 4-32 B) wurde nach 48 h nur noch in deutlich schwächerer Form beobachtet (vgl. Abbildung 4-32 C). Diese Normalisierung des p-Rb Proteinlevels ging mit einer Normalisierung der Zellzyklusverteilung einher, wie in Abbildung 4-31 dargestellt. In SNB19 Zellen, welche mit AZD6244 behandelt und bestrahlt wurden, wurde 48 h nach IR ein niedrigeres p-Rb Proteinlevel gemessen als in den bestrahlten Kontrollzellen, was sich auch in einem erhöhten Anteil von G1-Phase Zellen widerspiegelte (vgl. Abbildung 4-31). Wurden die SNB19 Zellen mit NVP-BEZ235 behandelt und bestrahlt, so resultierte dies, wie in Abbildung 4-32 C dargestellt, lediglich in geringen Auswirkungen auf das Expressionsniveau von p-Rb 48 h nach IR. Im Gegensatz hierzu wurden in SNB19 Zellen, welche mit beiden Inhibitoren behandelt und bestrahlt wurden, 48 h nach IR eine deutliche Reduktion von p-Rb detektiert. Auch diese verminderte Expression von p-Rb korrelierte mit den durchflusszytometrischen Zellzyklusdaten, da 48 h nach IR in den entsprechenden Zellen eine deutlich erhöhte Proportion von SNB19 Zellen in der G1- und ein deutlich verringerter Anteil von Zellen in der S-Phase gemessen wurde (vgl. Abbildung 4-31).

Wie in Abbildung 4-32 B gezeigt, wurden in den Lungenkarzinomzellen 24 h nach IR lediglich marginale Änderungen der CDK1 Expression in Abhängigkeit von der Behandlung mit AZD6244 oder NVP-BEZ235 beobachtet. Ebenso hatte eine simultane Behandlung mit beiden Inhibitoren keine nennenswerten Effekte auf das CDK1 Expressionsniveau. Wurden die Inhibitoren alleine oder zusammen mit einer Bestrahlung mit

8 Gy kombiniert, so hatte dies ebenfalls wenig Einfluss auf die Expression von CDK1 24 h nach IR in A549 Zellen. Ebenso hatte eine Inkubation von A549 Zellen mit AZD6244 24 h nach IR keinen Einfluss auf die Expression von CDK4, weder in unbestrahlten noch in bestrahlten Zellen. Eine Inkubation mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor hingegen resultierte 24 h nach IR in einer leichten Reduktion des CDK4 Expressionsniveaus, wie in Abbildung 4-32 B gezeigt. Dieser NVP-BEZ235-induzierte Effekt war sowohl bei Kombination mit AZD6244 als auch nach Bestrahlung nachweisbar.

Die drastischsten Änderungen wurden allerdings wie auch in der SNB19 Zelllinie in der Expression von p-Rb beobachtet. So resultierte eine Inkubation mit AZD6244 24 h nach IR in einer leichten Erniedrigung des p-Rb Gehaltes, wohingegen eine Inkubation mit NVP-BEZ235 das Expressionsniveau von p-Rb nochmals deutlich stärker reduzierte (vgl. Abbildung 4-32 B). Diese Effekte spiegeln sich ebenfalls in den Zellzyklusverteilungsdaten wider, da hier eine Inkubation mit AZD6244 eine leichte Verstärkung und eine Inkubation mit NVP-BEZ235 eine massive Verstärkung der G1-Phase bewirkte (vgl. Abbildung 4-31). Eine Kombination beider Inhibitoren hatte 24 h nach Bestrahlung keine weiteren nennenswerten Effekte auf die Expression von p-Rb als die alleinige Inkubation mit NVP-BEZ235 (vgl. Abbildung 4-32 B), was mit den Zellzyklusdaten korreliert, da auch hier die Effekte von NVP-BEZ235 weitestgehend dominierten.

In den bestrahlten Kontrollproben wurde 24 h nach IR eine leichte Erniedrigung des p-Rb Niveaus gemessen, welche mit einer leichten Erhöhung des Anteils von A549 Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus einher ging (vgl. Abbildung 4-31 und Abbildung 4-32 B). Weiterhin wurde auch bei den bestrahlten A549 Zellen eine reduzierte Phosphorylierung von Rb nach Inkubation mit AZD6244 beobachtet, wobei diese ebenfalls mit einer erhöhten G1-Fraktion korrelierte (vgl. Abbildung 4-31). Der stärkste Effekt in den bestrahlten A549 Zellen 24 h nach IR wurde allerdings wie auch in den unbestrahlten Zellen in den mit NVP-BEZ235 behandelten Proben beobachtet, da die Behandlung mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor (alleine oder in Kombination mit AZD6244) die Phosphorylierung von Rb vollständig unterdrückte.

Im Gegensatz zu 24 h nach IR wurden 48 h nach IR Unterschiede in der Expression von CDK1 gemessen. So resultierte eine Behandlung mit NVP-BEZ235 (alleine oder in Kombination mit AZD6244) in unbestrahlten und bestrahlten A549 Zellen in einer leichten Reduktion der CDK1 Expression (vgl. Abbildung 4-32 C), wohingegen eine Inkubation mit AZD6244 alleine oder eine Bestrahlung mit 8 Gy nach wie vor keinen

Effekt auf die CDK1 Expression hatten. Qualitativ gleiche Daten, nämlich eine leichte NVP-BEZ235-induzierte Reduktion, wurde 48 h nach IR ebenfalls für das CDK4 Protein nachgewiesen.

Wie bereits 24 h nach IR wurden auch 48 h nach IR große Unterschiede in der Proteinexpression von p-Rb in A549 Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit den Inhibitoren festgestellt, wobei im Großen und Ganzen die Effekte nach 24 h validiert wurden. So war, wie in Abbildung 4-32 C dargestellt, die Phosphorylierung von Rb in den mit AZD6244 behandelten A549 Zellen verringert und in den mit NVP-BEZ235 behandelten Zellen nahezu komplett unterdrückt. Wie auch schon 24 h nach IR bewirkte die Inkubation mit beiden Inhibitoren gleichzeitig auch 48 h nach IR keine Änderung der NVP-BEZ235-induzierten Reduktion von p-Rb. Wie auch schon 24 h nach Bestrahlung spiegeln sich diese niedrigen p-RB Niveaus in Abhängigkeit von der Behandlung mit AZD6244 und NVP-BEZ235 sehr gut in den durchflusszytometrisch gemessenen Zellzyklusdaten wider (vgl. Abbildung 4-31 und Abbildung 4-32 C), da auch 48 h nach Bestrahlung eine leichte Erhöhung an G1-Phase Zellen nach Behandlung mit AZD6244 und eine massive Erhöhung nach Behandlung mit NVP-BEZ235 gemessen wurde.

In den bestrahlten, unbehandelten A549 Zellen wurde, wie in Abbildung 4-32 C dargestellt, 48 h nach IR ein deutlich reduziertes Expressionsniveau von p-Rb detektiert. Wurden die Zellen zusätzlich zur Bestrahlung noch mit AZD6244, NVP-BEZ235 oder einer Kombination beider Inhibitoren behandelt, so wurde die Unterdrückung der Rb Phosphorylierung nochmals verstärkt, so dass in diesen A549 Zellen 48 h nach IR kaum (Behandlung mit AZD6244) bzw. überhaupt kein (Behandlung mit NVP-BEZ235 oder einer Kombination beider Inhibitoren) p-Rb mehr detektiert wurde.

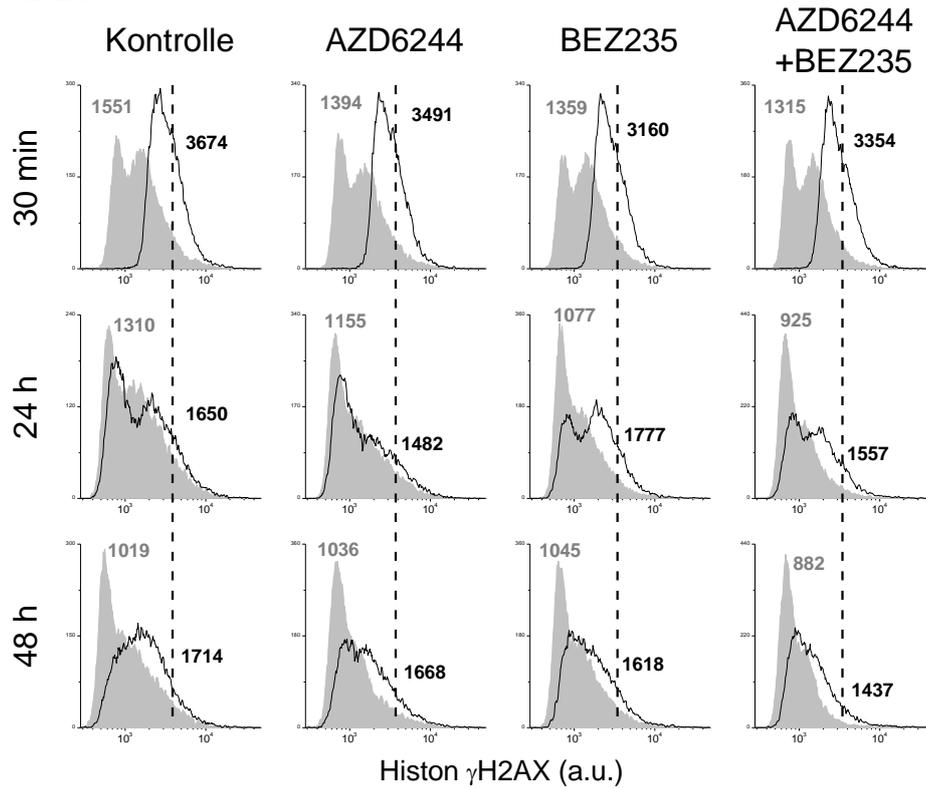
4.3.5 EFFEKT VON AZD6244, NVP-BEZ235 UND BESTRAHLUNG AUF DNS-SCHÄDEN UND APOPTOSE

4.3.5.1 INDUKTION UND REPARATUR VON DNS-DOPPELSTRANGBRÜCHEN

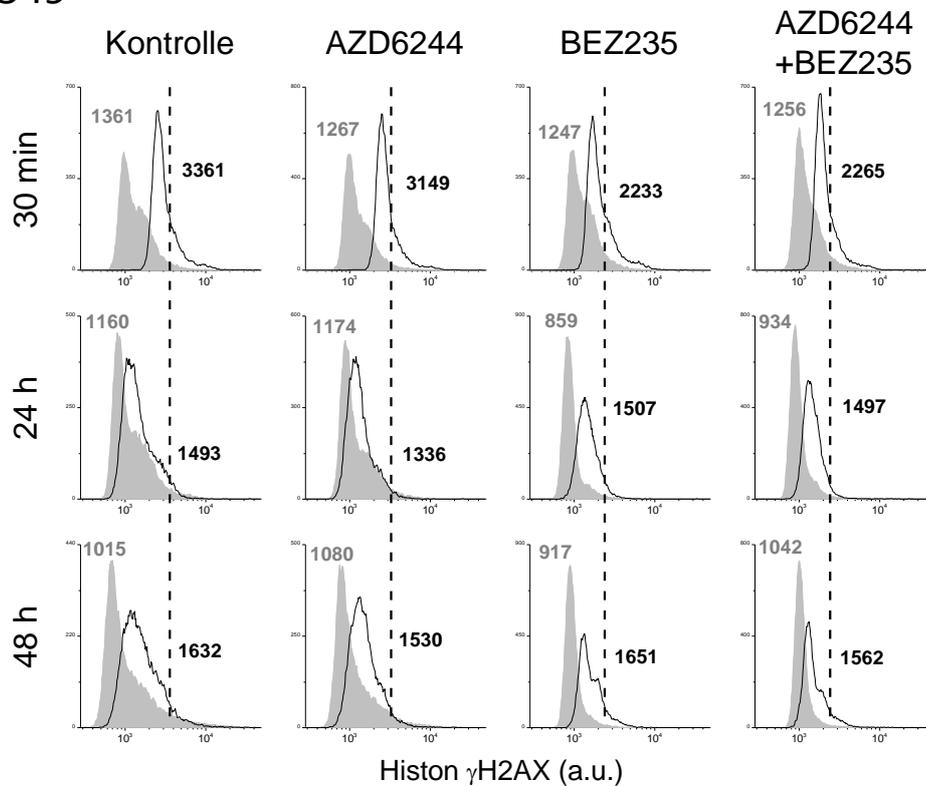
Um zu untersuchen, ob die Induktion und der Abbau von DNS-Schäden durch die Behandlung mit AZD6244 und/oder NVP-BEZ235 beeinflusst wurden, wurde die Expression des Histonproteins γ H2AX durch eine Immunfluoreszenzfärbung durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt, bestrahlt, 30 min, 24 oder 48 h nach Bestrahlung fixiert und im Anschluss mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen γ H2AX angefärbt (vgl. Kapitel 3.2.6.1). In

Abbildung 4-33 sind repräsentative Verteilungen des Proteins γ H2AX in Abhängigkeit von der Inkubation mit AZD6244 und NVP-BEZ235 sowie Bestrahlung mit 8 Gy (30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung) für SNB19 (A) und A549 Zellen (B) dargestellt, wohingegen in Abbildung 4-34 die gemittelten Werte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen abgebildet sind.

A SNB19



B A549

Abbildung 4-33 Repräsentative Verteilung des Histons γ H2AX in SNB19 und A549 Zellen

Durchflusszytometrisch über Immunfluoreszenzfärbung gemessene repräsentative Verteilung des Histons γ H2AX in SNB19 (A) und A549 Zellen (B), welche 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert wurden. Die Zellen wurden mit AZD6244 und/oder NVP-BEZ235 behandelt (vgl. Abbildung 3-2 C). Graue und schwarze Histogramme stellen unbestrahlte und mit 8 Gy bestrahlte Proben dar. Die Zahlen beschreiben die mittlere γ H2AX Expression in jeder Probe und zur besseren Visualisierung der Reparatur von DNS-Schäden wurde die mittlere Expression von γ H2AX bei 8 Gy 30 min durch eine gestrichelte Linie längs über die verschiedenen Messzeitpunkte eingezeichnet.

Wie in Abbildung 4-33 A (obere Reihe, graue Histogramme) und Abbildung 4-34 A gezeigt, hatte eine Behandlung mit AZD6244 und NVP-BEZ235 30 min nach Bestrahlung in unbestrahlten SNB19 Zellen lediglich geringe Auswirkungen auf die Expression von γ H2AX. Nach einer Bestrahlung mit 8 Gy hingegen wurde 30 min nach IR eine Erhöhung des γ H2AX Gehaltes in SNB19 Zellen von 1551 auf 3674 rel. Einheiten beobachtet (vgl. Abbildung 4-33 A, obere Reihe). Dies entspricht einer Erhöhung der DNS-Schäden durch die Bestrahlung um einen Faktor von ca. 2,4 (vgl. Abbildung 4-34 A). Wurden die SNB19 Zellen vor der Bestrahlung mit 500 nM AZD6244 behandelt, so wurden, wie in Abbildung 4-33 A obere Reihe und Abbildung 4-34 A dargestellt, 30 min nach der Bestrahlung ähnliche Ergebnisse, nämlich eine Änderung um einen Faktor von ca. 2,3, beobachtet.

Im Gegensatz hierzu wurde in den mit NVP-BEZ235 behandelten und bestrahlten SNB19 Zellen 30 min nach Bestrahlung eine niedrigere Induktion von DNS-Schäden gemessen (vgl. Abbildung 4-33 A). So wurde im Mittel in den mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor behandelten Zellen 30 min nach Bestrahlung lediglich eine Erhöhung der γ H2AX Expression um den Faktor 1,9 gemessen (Abbildung 4-34 A). Eine kombinierte Behandlung mit beiden Inhibitoren resultierte ebenfalls in einer verminderten Induktion der Phosphorylierung von H2AX 30 min nach Bestrahlung und zwar in ähnlichem Maße wie nach alleiniger Inkubation mit NVP-BEZ235 (vgl. Abbildung 4-33 A obere Reihe und Abbildung 4-34 A).

Vierundzwanzig Stunden nach der Bestrahlung (vgl. Abbildung 4-33 A, mittlere Reihe und Abbildung 4-34 A) wurde in sämtlichen unbestrahlten SNB19 Zellen unabhängig von der Behandlung mit einem der Inhibitoren ein niedrigerer γ H2AX Gehalt gemessen als 30 min nach der Bestrahlung. Diese Abnahme an γ H2AX im Vergleich zur 0 Gy Kontrolle nach 30 min (vgl. Abbildung 4-33 A, obere Reihe und Abbildung 4-34 A) ging einher mit der Zunahme an G1-Phase Zellen (vgl. Abbildung 4-31). So korrelierte das wachstumsinhibierende Potential der Inhibitoren (gemessen an dem Anteil an G1-Phase SNB19 Zellen 24 h nach Bestrahlung in unbestrahlten Zellen: DMSO <

AZD6244 < NVP-BEZ235 < AZD6244 + NVP-BEZ235) exakt mit der Expression von γ H2AX (DMSO > AZD6244 > NVP-BEZ235 > AZD6244 + NVP-BEZ235).

Wurden die SNB19 Zellen mit 8 Gy bestrahlt, so wurde, wie in Abbildung 4-33 A mittlere Reihe und Abbildung 4-34 A dargestellt, 24 h nach IR in allen Proben ein deutlicher Rückgang der strahleninduzierten DNS-Schäden im Vergleich zu 30 min nach IR beobachtet. In Zellen, die vor der Bestrahlung mit AZD6244 behandelt wurden, waren 24 h nach Bestrahlung weniger DNS-Schäden detektierbar als in den bestrahlten Kontrollproben, wohingegen in den mit NVP-BEZ235 behandelten Proben in etwa gleich viele DNS-Schäden messbar waren (vgl. Abbildung 4-33 A mittlere Reihe und Abbildung 4-34 A). In Zellen, die vor der Bestrahlung mit 8 Gy mit einer Kombination von AZD6244 und NVP-BEZ235 behandelt wurden, war der γ H2AX Gehalt 24 h nach IR in etwa vergleichbar mit dem nach alleiniger Behandlung mit AZD6244 und Bestrahlung.

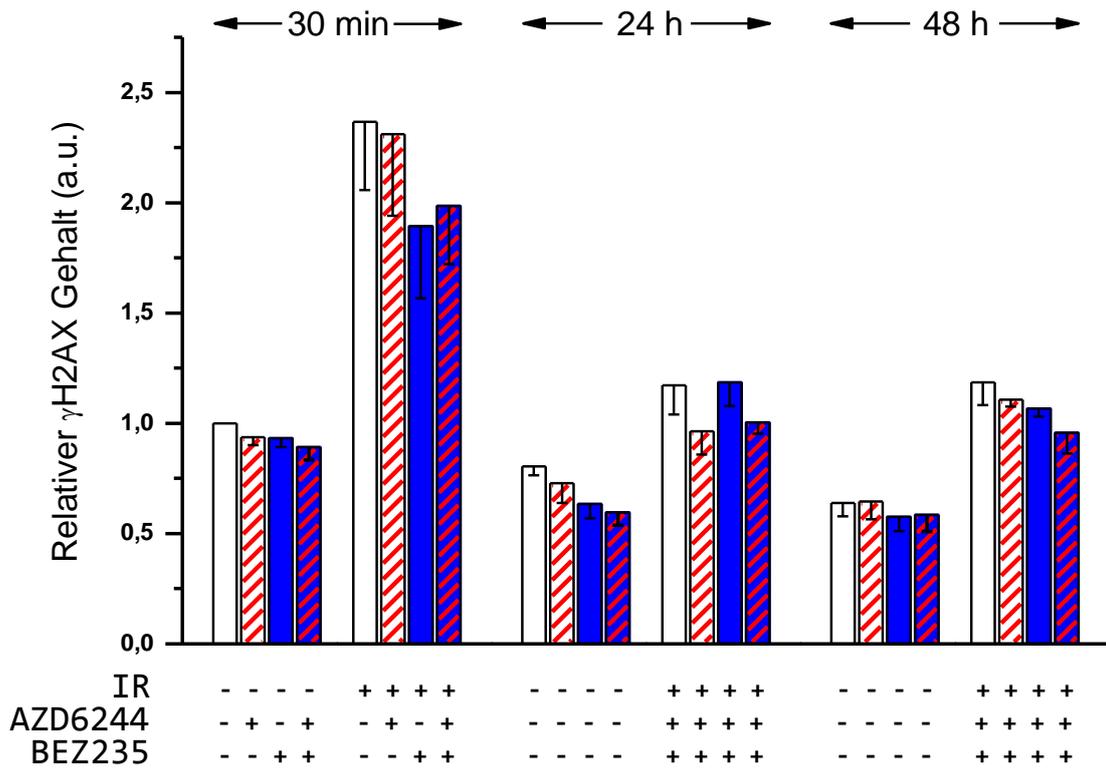
Achtundvierzig Stunden nach der Bestrahlung unterschied sich der relative γ H2AX Gehalt in den verschiedenen unbestrahlten SNB19 Proben nur marginal voneinander (vgl. in Abbildung 4-33 A untere Reihe und Abbildung 4-34 A). Auch die Werte für die bestrahlten Proben unterschieden sich nur noch leicht voneinander, so wurde für die bestrahlten Kontrollzellen ein rel. Wert von 1,2, für die mit AZD6244 behandelten Zellen ein rel. Wert von 1,1, für die mit NVP-BEZ235 behandelten Zellen ein rel. Wert von 1,1 und für die mit AZD-6244 und NVP-BEZ235 behandelten Zellen ein rel. Wert von 1,0 (jeweils normiert auf den Wert der Kontrolle 0 Gy 30 min) gemessen (vgl. in Abbildung 4-33 A untere Reihe und Abbildung 4-34 A).

Die Ergebnisse der Lungenkarzinomzelllinie A549 zeigten weitgehend ähnliche Resultate wie die der Glioblastomzelllinie SNB19. Auch bei A549 Zellen wurden, wie in Abbildung 4-33 B obere Reihe und Abbildung 4-34 B gezeigt, 30 min nach Bestrahlung lediglich geringe Unterschiede in der γ H2AX Expression in den unbestrahlten Proben gemessen. Ebenso wurde nach Bestrahlung mit 8 Gy auch in dieser Zelllinie in den mit AZD6244 behandelten Proben ein ähnlicher Anstieg der strahlungsinduzierten DNS-Doppelstrangbrüche wie in den mit DMSO behandelten und bestrahlten Zellen gemessen. Weiterhin bedingte eine Behandlung mit NVP-BEZ235 auch in dieser Zelllinie eine verringerte Phosphorylierung von H2AX nach Bestrahlung mit 8 Gy sowohl bei alleiniger Inkubation mit NVP-BEZ235 als auch bei Kombination mit AZD6244.

Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung wurde in den unbestrahlten Kontrollzellen wie auch schon in der SNB19 Zelllinie ein leicht verminderter γ H2AX Gehalt gemessen (im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen 30 min nach IR). Eine Inkubation mit AZD6244 zeigte in A549 Zellen 24 h nach IR keinen relevanten Unterschied zur unbestrahlten Kontrollprobe (vgl. Abbildung 4-33 B mittlere Reihe und Abbildung 4-34 B). Wurden die Zellen hingegen mit NVP-BEZ235 behandelt (sowohl bei alleiniger Behandlung, als auch in Kombination mit AZD6244), so konnte eine deutlich verminderte Expression von γ H2AX in den unbestrahlten Zellen gemessen werden, die, wie für die SNB19 Zelllinie bereits gezeigt, mit einer deutlichen Erhöhung des Anteils an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus korrelierte. Wurden die A549 Zellen mit 8 Gy bestrahlt, so waren 24 h nach Bestrahlung keine nennenswerten Unterschiede in der γ H2AX Expression zwischen den einzelnen Behandlungen und der Kontrolle messbar (vgl. Abbildung 4-33 B mittlere Reihe und Abbildung 4-34 B).

Achtundvierzig Stunden nach Bestrahlung wurden zwischen den unbestrahlten Kontrollzellen und den mit AZD6244, NVP-BEZ235 oder einer Kombination beider Inhibitoren behandelten Zellen keine relevanten Unterschiede in der γ H2AX Expression mehr festgestellt. Ebenso hatte 48 h nach Bestrahlung analog zu den Ergebnissen der SNB19 Zelllinie eine Inkubation der A549 Zellen mit einem oder mit beiden Inhibitoren keinen Einfluss auf die DNS-Schäden im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Abbildung 4-33 B untere Reihe und Abbildung 4-34 B).

A SNB19



B A549

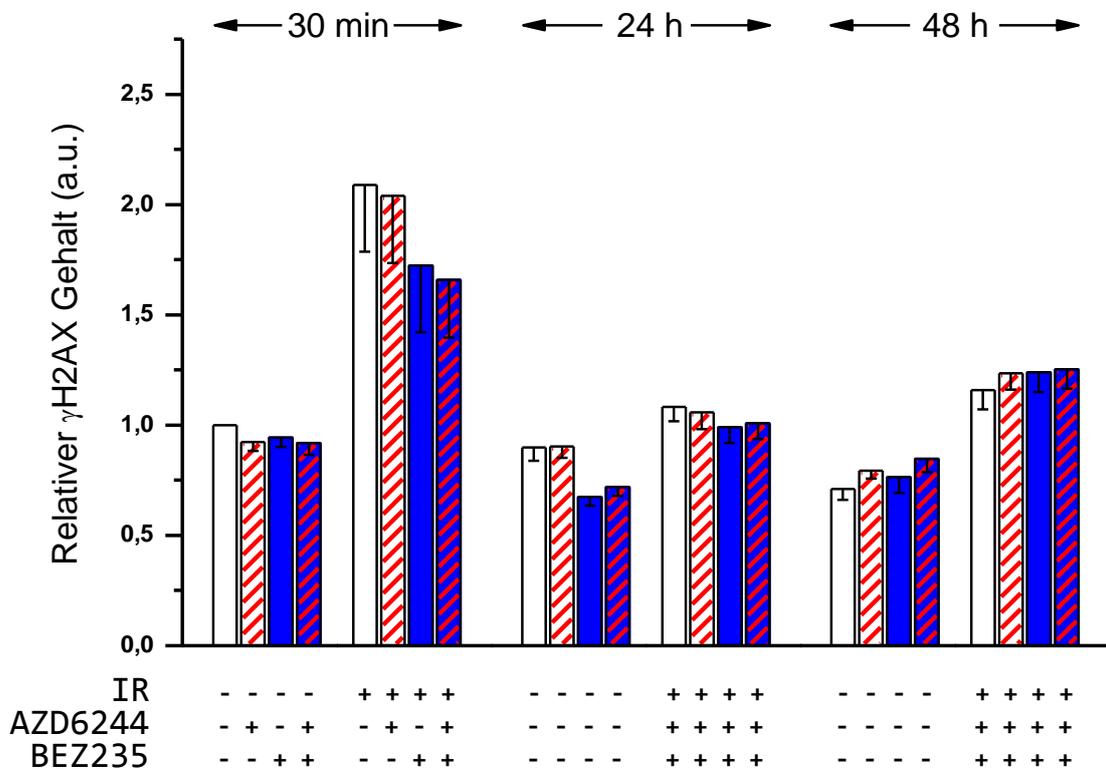


Abbildung 4-34 Mittlere Verteilung des Hists γ H2AX in SNB19 und A549 Zellen

Dargestellt sind die auf 0 Gy 30 min DMSO normierten Mittelwerte (\pm SD) aus mindestens drei unabhängigen durchflusszytometrischen Messungen der Immunfluoreszenz des Hists γ H2AX in SNB19 (A)

und A549 Zellen (B), welche 30 min, 24 und 48 h nach Bestrahlung fixiert wurden. Die Zellen wurden mit 500 nM AZD6244 (rot gestreifte Säulen), 50 nM NVP-BEZ235 (blaue Säulen) oder einer Kombination beider Inhibitoren (rot-blau gestreifte Säulen) behandelt und mit einer Dosis von 8 Gy bestrahlt. Mit DMSO behandelte und unbestrahlte Zellen (ungefärbte Säulen) dienten als Kontrollen.

4.3.5.2 EFFEKTE VON AZD6244, NVP-BEZ235 UND BESTRAHLUNG AUF DIE APOPTOSE

Um weitere molekularbiologische Ursachen für die Radiosensibilisierung von AZD6244 und NVP-BEZ235 zu finden, wurde untersucht, ob die beiden Inhibitoren einen Einfluss auf die Apoptose und Autophagie haben. Hierzu wurden SNB19 und A549 Zellen mit den Inhibitoren behandelt und bestrahlt, um anschließend den Anteil der hypodiploiden Zellen als Marker für das Spätstadium der Apoptose sowie die Expression der Apoptosemarker PARP und gespaltenem PARP sowie des Autophagiemarkers LC3 zu messen. Abbildung 4-35 zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte Fraktion an hypodiploiden SNB19 (A) und A549 Zellen (B). Weiterhin sind in Abbildung 4-36 repräsentative Western blot Ergebnisse für die Expression von PARP, gespaltenem PARP und LC3 in SNB19 (linkes Panel) und A549 Zellen (rechtes Panel) 24 (A) und 48 h (B) nach Bestrahlung dargestellt.

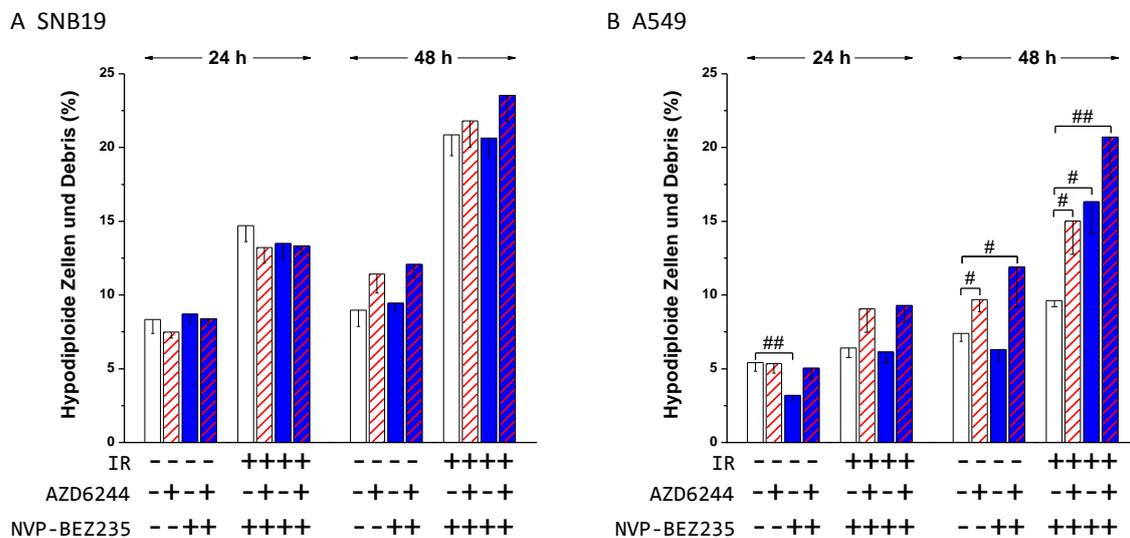


Abbildung 4-35 Anteil hypodiploider Zellen in SNB19 und A549 Zellen nach Behandlung mit AZD6244 und NVP BEZ235 sowie Bestrahlung

Hypodiploide Zellen und Debris in mit AZD6244 (rot gestreifte Säulen), NVP-BEZ235 (blaue Säulen) oder einer Kombination beider Inhibitoren (rot-blau gestreifte Säulen) behandelten und bestrahlten SNB19 (A) und A549 Zellen (B) 24 und 48 h nach Bestrahlung. Mit DMSO behandelte (weiße Säulen) und unbestrahlte Zellen dienten als Kontrollen. Die Zellen wurden 24 und 48 h nach Bestrahlung enzymatisch abgelöst, fixiert, permeabilisiert, mit RNase behandelt, mit einem DNS-Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (\pm ein SE) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der bestrahlten und unbestrahlten Proben zwischen den jeweiligen Kontrollen und Behandlungen wurden durch multiple t-Tests mit einer Bonferroni-Holm Fehlerkorrektur durchgeführt und sind wie folgt dargestellt: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$.

Wie in Abbildung 4-35 A gezeigt, hatte eine Inkubation mit AZD6244, NVP-BEZ235 oder einer Kombination beider Inhibitoren weder 24 noch 48 h nach Bestrahlung einen signifikanten Einfluss auf den Anteil hypodiploider SNB19 Zellen. Lediglich die Bestrahlung mit 8 Gy resultierte in einer erhöhten hypodiploiden Fraktion, allerdings bei sämtlichen Behandlungen gleichermaßen. Die Western blot Daten für die Expression des DNS-Reparaturproteins PARP (Abbildung 4-36 A und B jeweils linkes Panel) sowie dessen gespaltenen Form („cleaved PARP“) korrelierten mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen. So konnte kein relevanter Unterschied in der Expression von gespaltenem PARP innerhalb der unbestrahlten und bestrahlten SNB19 Zelllysate 24 und 48 h nach Bestrahlung erkannt werden. Allerdings wurde wie auch bei den durchflusszytometrisch erhobenen Daten für die hypodiploide Fraktion eine deutlich erhöhte Apoptose 24 und vor allem 48 h nach Bestrahlung beobachtet.

In A549 Zellen hingegen wurde 24 h nach Bestrahlung eine leichte, aber signifikante Erniedrigung des Anteils an hypodiploiden Zellen nach Inkubation mit NVP-BEZ235 von 5,4 auf 3,2 % gemessen (vgl. Abbildung 4-35 B). Wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt, so wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen festgestellt. Achtundvierzig Stunden nach Bestrahlung resultierte eine Behandlung von unbestrahlten A549 Zellen mit AZD6244 alleine und in Kombination mit NVP-BEZ235 in einer signifikanten Erhöhung der hypodiploiden Fraktion, wobei eine Kombination mit beiden Inhibitoren die deutlichste Erhöhung von 7,4 (Kontrolle) auf 11,9 % bewirkte. Eine Behandlung mit NVP-BEZ235 hingegen zeigte keinen signifikanten Effekt (vgl. Abbildung 4-35 B).

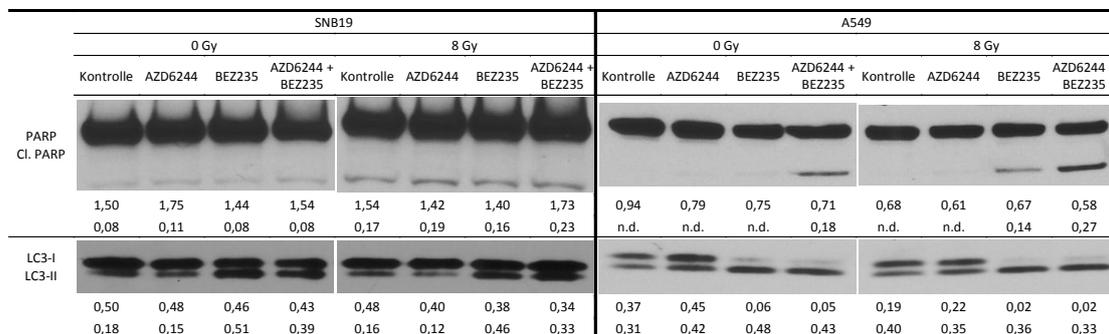
Wie in Abbildung 4-35 B dargestellt, wurden 48 h nach IR signifikante Unterschiede in der hypodiploiden Fraktion zwischen den mit DMSO, den mit den einzelnen Inhibitoren sowie den mit AZD6244 und NVP-BEZ235 behandelten und bestrahlten A549 Zellen festgestellt. Eine Inkubation mit AZD6244 oder NVP-BEZ235 bewirkte hierbei eine Erhöhung der hypodiploiden Fraktion von 9,6 (Kontrolle) auf 15,0 (AZD6244) beziehungsweise 16,3 % (NVP-BEZ235). Eine Kombination beider Inhibitoren resultierte in der stärksten Erhöhung der hypodiploiden Fraktion auf 20,7 %.

Eine Inkubation mit einem der beiden Inhibitoren alleine hatte, wie in Abbildung 4-36 A dargestellt, 24 h nach Bestrahlung keinen Einfluss auf die Expression oder die Spaltung von PARP in unbestrahlten A549 Zellen. Lediglich eine Inkubation mit beiden Inhibitoren simultan resultierte in einer Erhöhung von gespaltenem PARP. Wurden die

Zellen mit 8 Gy bestrahlt, so konnte eine erhöhte Spaltung von PARP in den mit NVP-BEZ235 behandelten Proben beobachtet werden, wobei eine simultane Behandlung mit AZD6244 die Degradierung von PARP noch verstärkte.

Achtundvierzig Stunden nach Bestrahlung wurde sowohl nach Inkubation mit AZD6244, als auch nach Inkubation mit NVP-BEZ235 ein im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöhtes gespaltenes PARP Level in den unbestrahlten A549 Zellen detektiert (vgl. Abbildung 4-36 B). Wie bereits nach 24 h nach IR wurde nach simultaner Inkubation mit beiden Inhibitoren die höchste Expression von gespaltenem PARP detektiert. Wurden die A549 Zellen mit 8 Gy bestrahlt, so wurde 48 h nach IR in den mit NVP-BEZ235 behandelten Proben ein erhöhtes Niveau von gespaltenem PARP gemessen (vgl. Abbildung 4-36 B). Im Gegensatz zu den Zellen, welche 24 h nach IR lysiert wurden (vgl. Abbildung 4-36 A), resultierte eine simultane Behandlung der bestrahlten A549 Zellen mit AZD6244 und NVP-BEZ235 nach 48 h allerdings in einer niedrigeren Expression von gespaltenem PARP als bei alleiniger Behandlung mit NVP-BEZ235 und Bestrahlung.

A 24 h post IR



B 48 h post IR

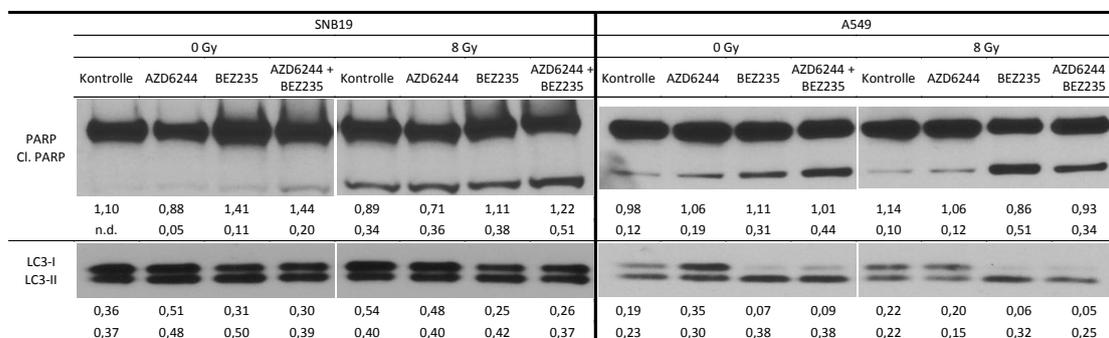


Abbildung 4-36 Western blot relevanter Proteine der Apoptose und Autophagie in SNB19 und A549 Zellen nach Behandlung mit AZD6244 und NVP-BEZ235 sowie Bestrahlung

Repräsentative Western blot Analysen der Apoptose und Autophagie relevanten Proteine PARP, cleaved PARP und LC3 in SNB19 (linkes Panel) und A549 Zellen (rechtes Panel), welche 24 (A) und 48 h nach

Bestrahlung (B) lysiert wurden. Die Zellen wurden mit AZD6244, NVP-BEZ235 oder einer Kombination beider Inhibitoren behandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Mit DMSO behandelte und unbestrahlte Zellen dienten als Kontrollen. Die Proteinbanden wurden durch die Intensität von β -Aktin normalisiert und das Verhältnis Protein zur entsprechenden Aktinbande ist durch die Zahlen angegeben.

Um zu untersuchen, ob die beiden Inhibitoren einen Einfluss auf den Autophagieprozess hatten, wurde die Expression des Autophagiemarkers LC3, welcher im Rahmen der Autophagie vom zytosolischen LC3-I in die membranständige LC3-II Form umgewandelt wird (Mizushima & Yoshimori, 2007), untersucht. Wie in Abbildung 4-36 A dargestellt, hatte eine Inkubation mit dem MEK Inhibitor AZD6244 24 h nach Bestrahlung keinerlei nennenswerte Auswirkungen auf die Expression von LC3-I und LC3-II in SNB19 Zellen (linkes Panel). Eine Inkubation mit NVP-BEZ235 hingegen, resultierte sowohl in unbestrahlten als auch bestrahlten SNB19 Zellen 24 h nach Bestrahlung in einer leicht erhöhten Expression des membranständigen LC3-II. Eine parallele Inkubation mit AZD6244 hatte keine nennenswerten Effekte auf die Expression von LC3-I und -II. Ebenso konnte 48 h nach Bestrahlung weder ein Effekt für AZD6244 noch für NVP-BEZ235 auf die Proteinexpression von LC3 in SNB19 Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4-36 B).

Auch in den A549 Zellen hatte eine Inkubation mit AZD6244 weder 24 noch 48 h nach Bestrahlung einen Effekt auf die Expression von LC3 (vgl. Abbildung 4-36 A und B). Allerdings konnte sowohl 24 als auch 48 h nach Bestrahlung in der Lungenkarzinomzelllinie deutlich eine strahlungsunabhängige, durch NVP-BEZ235 induzierte Depletion des zytosolischen LC3-I Proteins nachgewiesen werden, wobei die Expression des membranständigen LC3-II Proteins nicht nennenswert beeinflusst wurde. Diese Depletion von LC3-I 24 und 48 h nach IR in den mit NVP-BEZ235 behandelten A549 Zellen wurde ebenso nach Kombination mit AZD6244 detektiert.

5 DISKUSSION

5.1 EINFLUSS DES BEHANDLUNGSSCHEMAS AUF DIE NVP-BEZ235 INDUZIERTE RADIOSENSIBILISIERUNG IN HUMANEN GLIOBLASTOMZELLINIEN

Die Kombination von Chemo- und Strahlentherapie wird bereits seit den 80er Jahren im klinischen Alltag eingesetzt (Nyati u. a., 2006; Weischedel & Wieland, 1989). In den letzten Jahren wurde für verschiedene Tumorentitäten weiterhin belegt, dass die Substanzklasse der kleinmolekularen Inhibitoren, welche gezielt onkologische Signalkaskaden angreifen, auch wirkungsvoll mit Strahlentherapie kombiniert werden kann (Chun u. a., 2006). Neben verschiedenen anderen Faktoren, spielt das Behandlungsschema eine wichtige Rolle bei der Effektivität der kombinierten Radiochemotherapie (Chun u. a., 2006). Insbesondere die Kombination von Gemcitabine gefolgt von einer Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib zeigte bessere Resultate in Bezug auf die Tumorkontrolle, als wenn Gefitinib vor Gemcitabine verabreicht wurde (Chun u. a., 2006). Weiterhin konnte die Effektivität der Strahlentherapie erhöht werden, wenn parallel Inhibitoren der Angiogenese verabreicht wurden (Kleibecker u. a., 2012). Allerdings war auch bei dieser Kombination zu beobachten, dass das Behandlungsschema einen enormen Einfluss auf den Erfolg der Kombinationsbehandlung hatte (Kleibecker u. a., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Effektivität der Kombination des dualen PI3K/mTOR Inhibitors NVP-BEZ235 mit Bestrahlung in Bezug auf eine Radiosensibilisierung vom Behandlungsschema abhängig ist. Ein Hauptergebnis dieser Arbeit war, dass in Abhängigkeit des Inhibitor-Bestrahlungs-Schemas NVP-BEZ235 entweder einen zytostatischen oder einen radiosensibilisierenden Effekt auf die vier untersuchten Glioblastomzelllinien hatte. Der radiosensibilisierende Effekt wurde nur beobachtet, wenn die Zellen kurz vor der Bestrahlung und für 24 h im Anschluss (vgl. Abbildung 3-2, A, Schema II) mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor behandelt wurden (vgl. Abbildung 4-2 und Tabelle 4-1), wobei weder der *PTEN* noch der *TP53* Status einen Einfluss hatte. Dieses Resultat ist im Einklang mit bereits publizierten Ergebnissen, die von einer radiosensibilisierenden Wirkung von NVP-BEZ235, wenn es kurz vor Bestrahlung appliziert wird, in verschiedenen Tumorzelllinien berichten (Azad u. a., 2011; Fokas u. a., 2012a, 2012b; Konstantinidou u. a., 2009; Mukherjee u. a., 2012). Im Ge-

gensatz hierzu konnte nach längerer Behandlung mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor für 24 h vor der Bestrahlung (vgl. Abbildung 3-2, A, Schema I) keine Radiosensibilisierung in sämtlichen getesteten Glioblastomzelllinien beobachtet werden.

Um die molekularbiologischen Hintergründe für die Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235 in Abhängigkeit vom Behandlungsschema zu untersuchen, wurden die Expressionsniveaus bestimmter wichtiger Proteine der PI3K/Akt/PI3K Signalkaskade, das Auftreten von Apoptosemarkern, die Induktion und Reparatur von DNS-Schäden und die Zellzyklusverteilung untersucht. Die beobachteten Unterschiede der zellulären Antwort zwischen den beiden Behandlungsmodalitäten sind in Abbildung 5-1 dargestellt (da kaum relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien beobachtet wurden, wurden diese zusammengefasst).

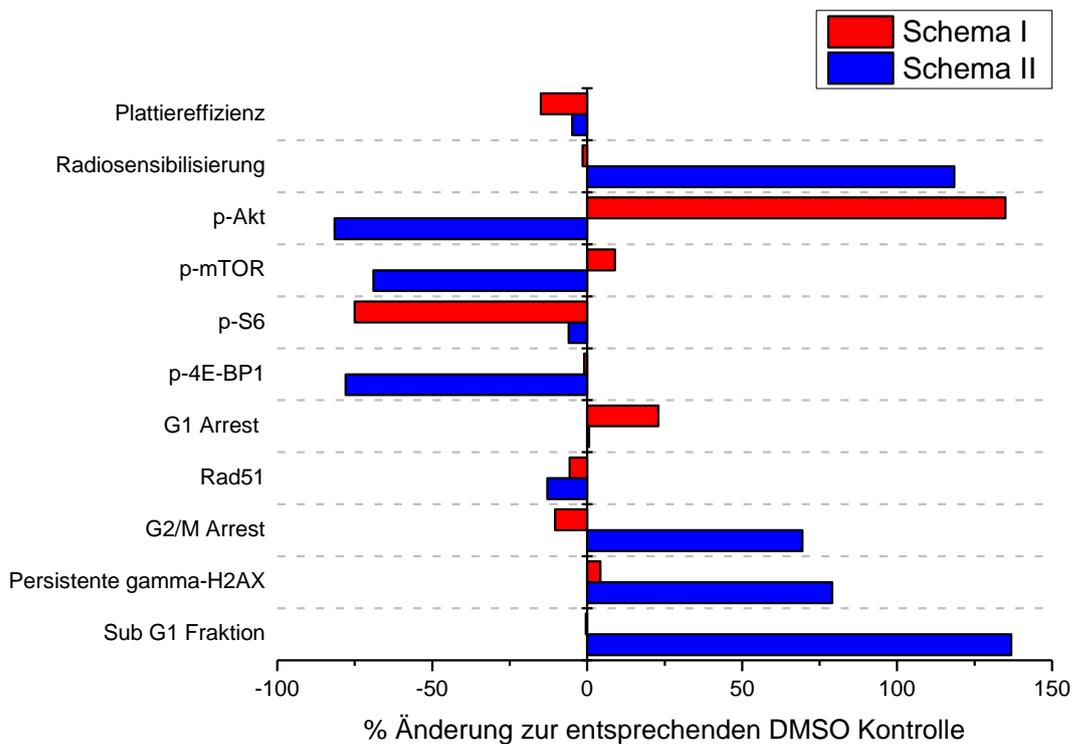


Abbildung 5-1 Zelluläre Antwort der Glioblastomzelllinien auf die beiden Behandlungsschemata

Zusammenfassung der Effekte der beiden untersuchten Behandlungsmodalitäten (für Details siehe Abbildung 3-2) in den untersuchten Glioblastomzelllinien (da kaum relevante Unterschiede zwischen den Zelllinien auftraten, wurden diese zusammengefasst) auf die Radiosensibilisierung (errechnet durch I_{10} Werte), die Proteinexpression, die DNS-Schäden Reparatur und den Zellzyklus durch NVP-BEZ235 und Bestrahlung mit 8 Gy. Die Effekte der Behandlungsmodalität auf die Phosphorylierung von Akt, mTOR, S6 und 4EBP1 sowie auf die G1 Phase des Zellzyklus beruhen auf Proben, welche 30 min nach Bestrahlung fixiert wurden. Die Expression von Rad51, γ H2AX, der Effekt auf die G2/M Phase des Zellzyklus sowie das Auftreten hypodiploider Zellen hingegen beruhen auf Proben, welche 48 h nach Bestrahlung fixiert wurden.

Ein möglicher vereinfachter Mechanismus, der auf den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen beruht und die unterschiedliche zelluläre Antwort erläutert, ist in Abbildung 5-2 schematisch dargestellt. Das Modell berücksichtigt die durch die beiden Behandlungsschemata verursachten Unterschiede in der Koloniebildungsfähigkeit (vgl. Abbildung 4-2 und Tabelle 4-1), der Expression wichtiger Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges (vgl. Abbildung 4-3, Abbildung 4-4, Abbildung 4-5 und Abbildung 4-6), der Apoptose (vgl. Abbildung 4-7, Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9), der Induktion sowie deren Reparatur von DNS-Schäden (vgl. Abbildung 4-10, Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12) und im Zellzyklus (vgl. Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4) der untersuchten Glioblastomzelllinien.

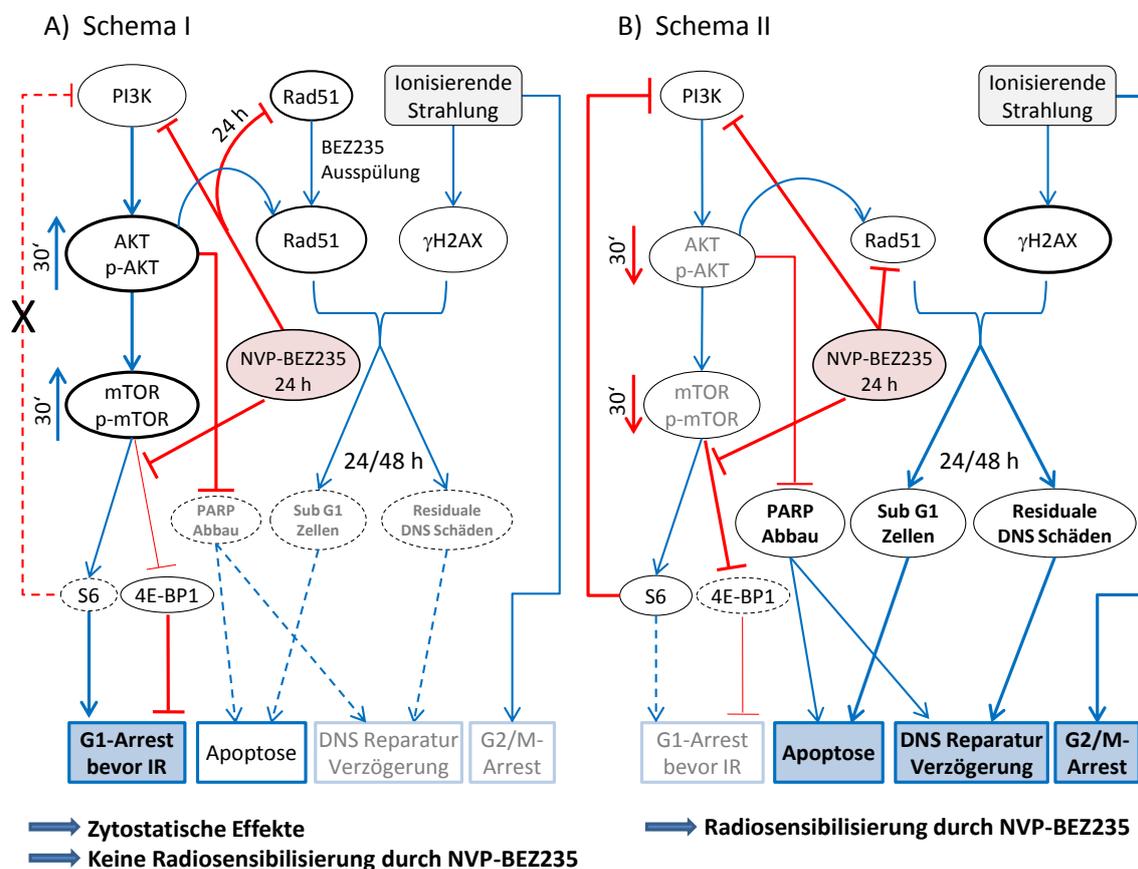


Abbildung 5-2 Signalkaskaden in den Glioblastomzelllinien nach NVP-BE235 Behandlung

Ein vereinfachtes Modell, welches die unterschiedlichen Antworten der Glioblastomzelllinien in Abhängigkeit vom NVP-BE235-Bestrahlungs-Behandlungsschema erläutert. Inkubation der Tumorzellen mit NVPBE235 für 24 h vor der Bestrahlung (A) führt, wahrscheinlich durch Inhibierung einer negativen Rückkopplung von S6 (vgl. Abbildung 4-3 und Abbildung 4-5), zu einer Aktivierung der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade zum Zeitpunkt der Bestrahlung. In Folge dessen unterdrückt die antiapoptotische Kinase Akt die strahlungsinduzierte Apoptose. Im Gegensatz dazu sind bei Behandlung nach Schema II (B) die Kinasen Akt und mTOR zum Zeitpunkt der Bestrahlung herunterreguliert. Weiterhin verursacht eine Inkubation mit NVP-BE235 über 24 h einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase des Zellzyklus (vgl. Abbildung 4-13, Tabelle 4-2, Tabelle 4-3 und Tabelle 4-4). Der hohe Anteil an Zellen in der radioresistenten G1 Phase zum Zeitpunkt der Bestrahlung bei Behandlungsschema I resultiert nach Bestrahlung in einer verminderten Induktion von γ H2AX, im Vergleich zu den Kontroll- und den nach

Schema II behandelten Zellen (vgl. Abbildung 4-10). Weiterhin zeigen die gemäß Schema I behandelten Zellen eine verringerte Expression des DNS-Reparaturproteins Rad51 zum Zeitpunkt der Bestrahlung, wobei sich das Rad51 Expressionslevel nach Ausspülung des Inhibitors wieder normalisierte (vgl. Abbildung 4-12), was in einer normalen DNS-Reparatur resultierte. Zellen, die hingegen gemäß Schema II behandelt wurden, zeigten eine verringerte Rad51-Expression 24 und 48 h nach Bestrahlung, welche mit einer erhöhten Fraktion an Sub G1 Zellen und persistenten DNS-Schäden korreliert (vgl. Abbildung 4-7, Abbildung 4-8, Abbildung 4-10 und Abbildung 4-12). Weiterhin wurde bei Zellen, die gemäß Schema II behandelt wurden, ein starker G2/M Arrest nach kombinierter Inhibitorbehandlung und Bestrahlung beobachtet. Zusammenfassend verursachte eine Behandlung mit NVP-BEZ235 gemäß Schema I hauptsächlich zytostatische Effekte, wohingegen eine Behandlung nach Schema II zu einer starken Radiosensibilisierung der Zelllinien führte. Modifiziert mit freundlicher Genehmigung von Neoplasia Press nach Kuger et al. 2013.

Interessanterweise zeigen unsere Immunoblot Analysen, dass eine längere Behandlung mit NVP-BEZ235 in drei der vier hier untersuchten Zelllinien eine Aktivierung der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade bewirkt, wie durch erhöhte Expressionsniveaus von p-Akt und p-mTOR belegt (vgl. Abbildung 5-2 A). Dieser Effekt wurde sogar verstärkt beobachtet, wenn der PI3K/mTOR Inhibitor mit Bestrahlung kombiniert wurde (vgl. Abbildung 4-3 und Abbildung 4-5). Eine erhöhte Aktivität des Signalweges nach Inhibition wurde bereits für Derivate des mTOR Inhibitors Rapamycin beobachtet (Gulati u. a., 2009; Julien u. a., 2010; Rodrik-Outmezguine u. a., 2011) und lässt sich durch Inaktivierung einer negativen Rückkopplung von S6 zu PI3K erklären, wodurch in den Zellen der PI3K/Akt/mTOR Signalweg letztendlich verstärkt wird. So wird paradoxerweise trotz eines Inhibitors letztendlich das Zellüberleben gefördert. Dieser Mechanismus kann somit auch erklären, weshalb bei Behandlungsschema I keine Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235 beobachtet wurde.

Wurden die Zellen hingegen gemäß Schema II mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor behandelt (vgl. Abbildung 5-2 B), so konnte eine reduzierte Expression von p-Akt und p-mTOR kurz nach Bestrahlung beobachtet werden. Im Einklang mit dieser Beobachtung wurde bei kurzzeitiger NVP-BEZ235 Inkubation vor der Bestrahlung ein erhöhter Anteil von hypodiploiden Zellen und Apoptose in den DK-MG, U87-MG und GaMG Zelllinien nach der Bestrahlung beobachtet (vgl. Abbildung 4-7, Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9). Eine zelltypspezifische Antwort auf NVP-BEZ235 wurde auch bereits von anderen Wissenschaftlern beobachtet: Laut Fokas et al. induziert NVP-BEZ235 Apoptose und Nekrose in SQ20B Zellen, wohingegen in der FaDu Zelllinie keine Apoptose beobachtet wurde (Fokas u. a., 2012b). Weitere Studien belegen, dass NVP-BEZ235 in Lungenkarzinom-, Sarkom- und Leukämiezelllinien Apoptose induziert (Chiarini u. a., 2010; Konstantinidou u. a., 2009). Dies wurde bis dato allerdings nicht in Glioblastomzelllinien nachgewiesen (Liu u. a., 2009b; Marone u. a., 2009).

Ein wichtiger Schritt bei der strahleninduzierten Apoptose ist die Induktion und Reparatur von DNS-Schäden, welche in dieser Arbeit durch die Expression des Histons γ H2AX untersucht wurde. Im Rahmen der Versuche wurde herausgefunden, dass in den Zellen, welche für 24 h vor der Bestrahlung mit NVP-BEZ235 behandelt wurden, kaum Effekte von NVP-BEZ235 auf die strahleninduzierten DNS-Doppelstrangbrüche nachweisbar waren (vgl. Abbildung 4-10). Weiterhin wurden diese Strahlenschäden von den Zellen nahezu vollständig repariert. Wurden die Zellen hingegen erst kurz vor der Bestrahlung mit dem Inhibitor gemäß Schema II behandelt, so wurden 30 min nach Bestrahlung paradoxerweise weniger Strahlenschäden gemessen als in den bestrahlten mit DMSO behandelten Zellen (vgl. Abbildung 4-11).

Weiterhin konnten in den mit NVP-BEZ235 gemäß Schema II behandelten und bestrahlten Proben deutlich erhöhte residuale DNS-Schäden bis zu 48 h nach IR beobachtet werden, was auf eine verringerte Reparaturkapazität schließen lässt. Ein möglicher Grund hierfür kann in der verminderten Expression des DNS-Reparaturproteins Rad51 liegen (vgl. Abbildung 4-12), welches ein wichtiger Bestandteil der homologen Rekombinationsreparatur ist (Sak u. a., 2005). Eine weitere mögliche Erklärung für die verminderten DNS-Schäden direkt nach Bestrahlung sowie für die verzögerte Reparatur in NVP-BEZ235 behandelten Zellen ist die Inhibition der DNA-PK, ATM und ATR Kinasen als Nebenwirkung des dualen PI3K/mTOR Inhibitors (Mukherjee u. a., 2012; Shortt u. a., 2013; Toledo u. a., 2011). Die Aktivierung dieser Kinasen ist Teil der zellulären Antwort auf DNS-Schäden und ist in beiden Prozessen involviert, der Ausbildung und dem Abbau von γ H2AX Foci (Kinner u. a., 2008; Shiloh & Ziv, 2013). Somit kann die Inhibition dieser Kinasen durch NVP-BEZ235 gleichermaßen die reduzierte Induktion sowie die verringerte Reparatur von DNS-Schäden erklären.

Abgesehen von den Effekten auf die DNS-Reparatur führte eine längere Inkubation zu einer Erhöhung des Anteiles an Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus (vgl. Abbildung 4-13 und Tabelle 4-2). Dieser G1 Arrest ist vor der Bestrahlung unvorteilhaft, da diese Zellzyklusphase relativ radioresistent ist (Pawlik & Keyomarsi, 2004), was im Einklang mit der verminderten Spaltung von PARP beim Schema I ist (vgl. Abbildung 4-9). Die Kombination von NVP-BEZ235 und Bestrahlung gemäß Schema II hingegen führte zu keinen Aberrationen der Verteilung der Zellzyklusphasen zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Ferner resultierte eine Behandlung mit NVP-BEZ235 und Bestrahlung gemäß Schema II in einer Akkumulation von Zellen in der G2/M Phase, welche bis zu 48 h

nach der Bestrahlung beobachtet wurde (vgl. Abbildung 4-13 und Tabelle 4-4). Dies deutet auf einen stabilen Arrest des Zellzyklus hin.

Abschließend lässt sich sagen, dass dieser Teil der vorgelegten Arbeit die Wichtigkeit der Abfolge bei der Kombination verschiedener Therapieansätze verdeutlicht, wie sie auch schon von anderen Wissenschaftlern beschrieben wurde (Chun u. a., 2006). Weiterhin sind die hier vorgelegten Ergebnisse die ersten Hinweise, dass eine längere Behandlung mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Glioblastomzelllinien nicht radiosensibilisiert, was möglicherweise durch die NVP-BEZ235-induzierte Aktivierung der Akt und mTOR Kinasen erklärt werden kann. Trotz der fehlenden radiosensibilisierenden Eigenschaften bei Langzeitbehandlung rechtfertigen die starken zytostatischen Effekte weitere Experimente, um das vollständige Potential von NVP-BEZ235, welches momentan in klinischen Studien getestet wird (Internetseite: „Search of: BEZ235 - List Results - ClinicalTrials.gov“), auszuschöpfen. Die hier gezeigten *in vitro* Daten verdeutlichen die Wichtigkeit des Behandlungs-Bestrahlungs-Setups bei der Radiosensibilisierung von Tumorzellen und ebnen den Weg, um die neu gewonnenen Erkenntnisse im Mausxenograft Modell zu validieren.

5.2 RADIOSENSIBILISIERUNG HUMANER BRUSTKREBSZELLINIEN DURCH NVP-BEZ235 IN PATHOPHYSIOLOGISCH RELEVANTEN SAUERSTOFF-KONZENTRATIONEN

Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurde die antiapoptotische PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade als ein vielversprechendes Ziel für die Tumorkontrolle validiert (Courtney u. a., 2010; Paez & Sellers, 2003). Allerdings zeigten die ersten Inhibitoren dieses Signalweges, wie z.B. Wortmann, LY294002 oder Rapamycin und dessen Derivate, unerwünschte Nebenwirkungen und geringe Spezifität in einigen Experimenten (Markman u. a., 2010; Prevo u. a., 2008; Wan u. a., 2006). Aus diesem Grund wurden neue Inhibitoren dieser Signalkaskade mit verbesserter Spezifität und pharmakologischen Eigenschaften entwickelt, welche derzeit in klinischen Studien getestet werden (Fan u. a., 2006; Kurtz & Ray-Coquard, 2012; Maira u. a., 2008). Einer dieser neuen Inhibitoren ist der oral verfügbare duale PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235. Dieses Imidazo-[4,5-c]-quinolinderivat hat bereits in mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien antiproliferative und radiosensibilisierende Effekte gezeigt (Cho u. a., 2010; Fokas u. a., 2012a, 2012b; Kong u. a., 2010; Konstantinidou u. a., 2009; Liu u. a., 2009b; Manara u. a., 2010; Mukherjee u. a., 2012; Santiskulvong u. a., 2011; Zhu u. a., 2013). Obwohl es bereits Belege dafür gibt, dass NVP-BEZ235 Fibrosarkom sowie Pharynx- und Prostatakarzinomzellen unter normoxischen und stark hypoxischen Bedingungen radiosensibilisiert (Fokas u. a., 2012a; Potiron u. a., 2013), gibt es bis heute keine Daten über das radiosensibilisierende Potential des dualen PI3K/mTOR Inhibitors in hypoxischen Brustkrebszellen.

Die Experimente dieser Arbeit wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Behandlung mit NVP-BEZ235 TN MDA-MB-231 und ER positive MCF-7 Brustkrebszellen unter den drei klinisch relevanten Oxygenierungsbedingungen normoxisch, reoxygeniert und hypoxisch radiosensibilisiert. Die wichtigsten Ergebnisse der Studie sind in Abbildung 5-3 dargestellt, wohingegen Abbildung 5-4 ein vereinfachtes Schema zeigt, wie die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse letztendlich eine Radiosensibilisierung bewirken können. Da die Daten für die reoxygenierten Proben zu Beginn des Experimentes (0 und 30 min nach Bestrahlung) weitestgehend den Daten der hypoxischen Zellen und im weiteren Verlauf der Versuche (24 und 48 h nach Bestrahlung) den Daten für normoxische Zellen entsprachen, wurde in Abbildung 5-3 auf eine gesonderte Darstellung der Resultate für reoxygenierte Zellen verzichtet.

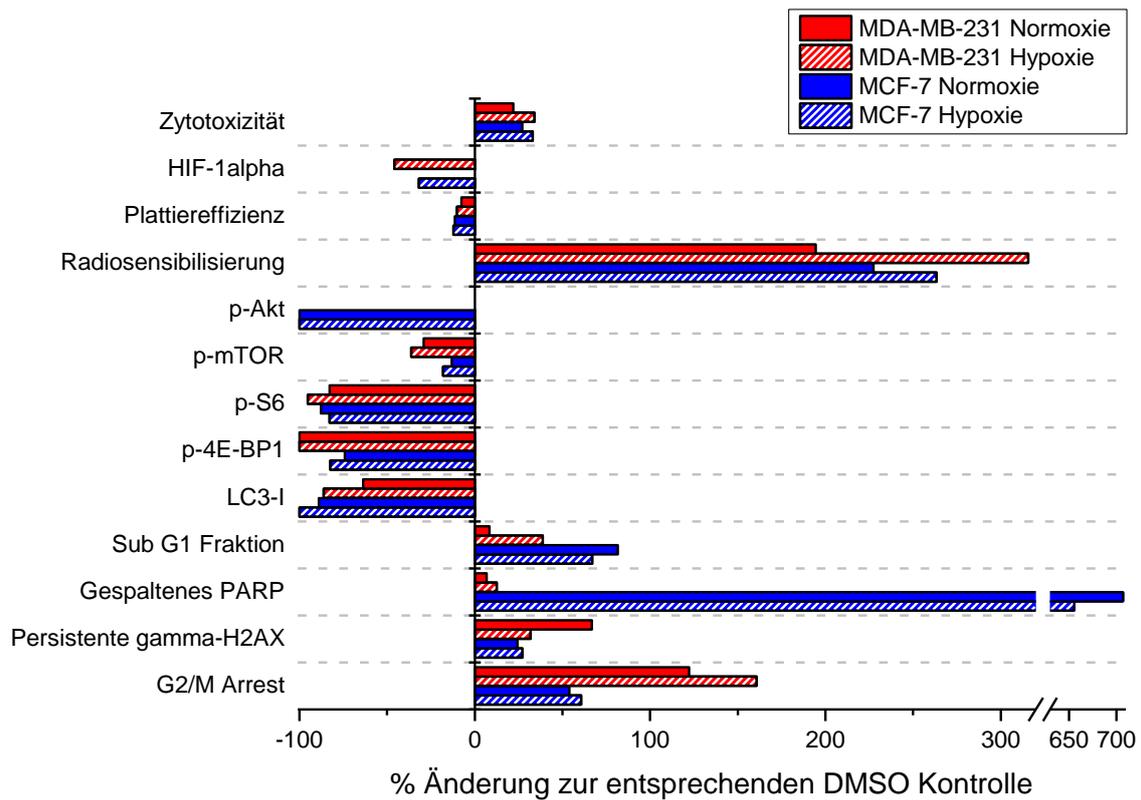


Abbildung 5-3 Effekte von NVP-BEZ235 in MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Zusammenfassung der Effekte von NVP-BEZ235 auf die Radiosensibilisierung, die Expression von Proteinen des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, der Apoptose und der Autophagie, die Reparatur von DNS-Schäden und den Zellzyklus humaner Brustkrebszelllinien in pathophysiologisch relevanten Sauerstoffkonzentrationen im Vergleich zur entsprechenden DMSO Kontrolle. MDA-MB-231 (rote Balken) oder MCF-7 Zellen (blaue Balken) wurden unter normoxischen (vollständig eingefärbte Balken) oder hypoxischen Bedingungen (gestrichelt Balken) mit NVP-BEZ235 behandelt und mit 8 Gy bestrahlt. Die angegebenen Effekte für die HIF1- α Expression beziehen sich auf 30 min nach der Bestrahlung, die der anderen Proteinexpressionen, der Reparatur von DNS-Schäden sowie des Zellzyklus beziehen sich hingegen auf 48 h nach Bestrahlung.

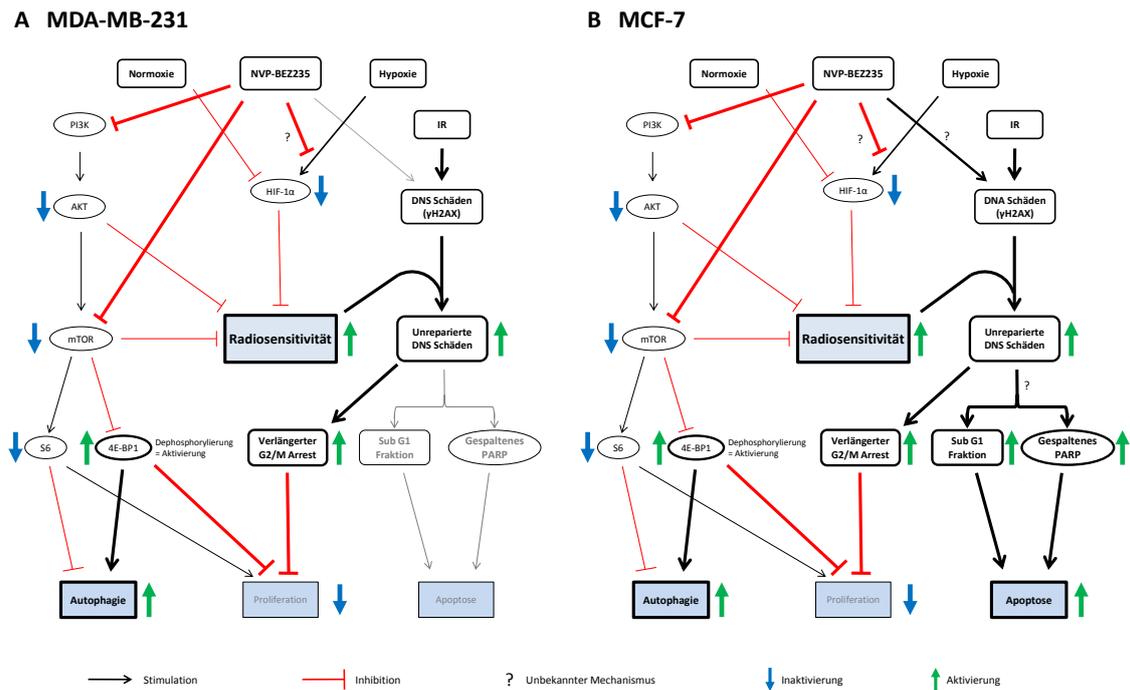


Abbildung 5-4 Schematische Darstellung der radiosensibilisierenden Effekte von NVP-BE235 in Brustkrebszellen

Vereinfachtes Diagramm, welches die radiosensibilisierenden Effekte von NVP-BE235 in normoxischen und hypoxischen MDA-MB-231 (A) und MCF-7 Zellen (B) darstellt. Eine Inkubation von Tumorzellen mit NVP-BE235 für eine Stunde vor und bis zu 48 h nach Bestrahlung reduzierte die Expression von HIF-1 α in hypoxischen Zellen (Abbildung 4-16) und verhinderte so die negativen Effekte der Hypoxie auf die Strahlensensitivität (Abbildung 4-15). Darüber hinaus inaktivierte NVP-BE235 die PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade, wie durch Dephosphorylierung von Akt, mTOR, S6 und 4E-BP1 validiert (Abbildung 4-19, Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21), was im Falle des Translationsrepressorproteins 4E-BP1 eine Aktivierung bewirkt. Die Inaktivierung von mTOR induziert anschließend indirekt Autophagie (Abbildung 4-22) und verringert die Proliferationsrate. Abgesehen von diesen Effekten, radiosensibilisiert NVP-BE235 beide Zelllinien unter normoxischen, reoxygenierten und hypoxischen Bedingungen (Abbildung 4-17 und Abbildung 4-18). Diese Radiosensibilisierung geht einher mit einer Reduktion von HIF-1 α und einer Inaktivierung der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade. Weiterhin verursacht eine Behandlung mit NVP-BE235 durch bis jetzt nicht vollständig geklärte Mechanismen eine Erhöhung der residualen DNS-Schäden (gemessen durch γ H2AX Immunfluoreszenz) nach Bestrahlung (Abbildung 4-23 und Abbildung 4-25). Diese unreparierten DNS-Schäden verursachen wahrscheinlich nachfolgend einen Arrest des Zellzyklus (Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24), welcher ebenfalls die Proliferationsrate reduziert. Neben den bereits erwähnten Effekten induziert NVP-BE235 in MCF-7 Zellen bei längerer Inkubationsdauer DNS-Schäden und erhöht die strahlungsinduzierte Apoptose (Abbildung 4-22, Abbildung 4-23 und Abbildung 4-25).

Wie in Abbildung 4-16 und bereits anderweitig gezeigt (Karar u. a., 2012), reduziert eine Behandlung mit NVP-BE235 die Expression von HIF-1 α in hypoxischen Zellen. Dies ist von sehr großem Interesse, da HIF-1 α ein vielversprechendes Protein für die Radiosensibilisierung von Tumoren darstellt (Meijer u. a., 2012). Fokas et al. haben kürzlich gezeigt, dass duale PI3K/mTOR Inhibition das anomale Gefäßsystem in Xenografttumoren normalisiert und somit das Resultat einer Radiotherapie verbessern kann (Fokas u. a., 2012a). Abgesehen von der Normalisierung des vaskulären Systems ist der exakte molekulare Mechanismus, durch den der PI3K/Akt/mTOR Signalweg die

HIF-1 α Expression reguliert, nicht vollständig identifiziert. Da unsere *in vitro* Versuche zeigen, dass die Inhibition von HIF-1 α auch ein wichtiger Bestandteil der NVP-BEZ235 induzierten Radiosensibilisierung sein kann, sollte dieser Effekt in weiteren Studien näher untersucht werden.

Eine weitere wichtige Zielstruktur für eine Radiosensibilisierung ist die PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade, welche in der Mehrheit von Krebsgeschwüren überaktiviert ist (Bartholomeusz & Gonzalez-Angulo, 2012; Courtney u. a., 2010). Wie in Abbildung 4-19, Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21 gezeigt, reduziert eine Behandlung mit NVP-BEZ235 die Phosphorylierung von Akt, mTOR, S6 und 4E-BP1, was in Falle von 4E-BP1 eine Aktivierung des Translationsrepressors bewirkt. Es wurde insbesondere für die beiden Kinasen Akt und mTOR in verschiedenen Versuchen gezeigt, dass diese das Zellüberleben und die Radioresistenz fördern (Chautard u. a., 2010; Gupta u. a., 2003). Nennenswert ist ebenfalls, dass die Inaktivierung von Akt in der MCF-7 Zelllinie stabil war. Dies ist interessant, da in mehreren Versuchen eine erhöhte Phosphorylierung von Akt bei längerer Inkubationsdauer mit NVP-BEZ235 beobachtet wurde (Kuger u. a., 2014; Liu u. a., 2009b; Manara u. a., 2010; Masuda u. a., 2011; Roper u. a., 2011), was in diesen Experimenten das Potential des dualen Inhibitors schwächen kann. Zusätzlich zur stabilen Akt Inaktivierung ist der Umstand, dass aktivierende Mutationen im *PIK3CA* Gen der katalytischen Untereinheit von PI3K mit 40 % die häufigste genetische Aberration in Brustkrebszellen darstellen (Campbell u. a., 2004), eine weitere Begründung den PI3K/Akt/mTOR Signalweg mit molekularen Inhibitoren anzugreifen. Eine Kombination von NVP-BEZ235 mit Bestrahlung hat daher das Potential das Therapieergebnis von vielen Brustkrebspatienten zu verbessern.

In der MCF-7 Zelllinie wurde in allen untersuchten Oxygenierungsbedingungen Apoptose nach Behandlung mit NVP-BEZ235 beobachtet, wohingegen dies in MDA-MB-231 Zellen nicht festgestellt wurde. Dies ist sehr wahrscheinlich durch die bereits erwähnte Inhibition von Akt bedingt, welche nur in MCF-7 Zellen beobachtet wurde und für die bereits in verschiedenen Experimenten gezeigt wurde, dass sie den Zelltod auslöst (Bjornsti & Houghton, 2004; Nakashio u. a., 2000; Vivanco & Sawyers, 2002) in Verbindung mit einer wildtypischen Version des *TP53* Gens in der MCF-7 Zelllinie. Der Umstand, dass im Gegensatz zu vielen anderen soliden Krebsarten Mutationen im *TP53* Gen nur mit geringerer Frequenz in Brustkrebs auftreten (Gasco u. a.,

2002), untermauert weiterhin das Potential von NVP-BEZ235 in der Behandlung von Brustkrebs.

Neben der Apoptoseinduktion, welche wahrscheinlich vom *TP53* Mutationsstatus abhing, beobachteten wir die Induktion von Autophagie in beiden Zelllinien nach Behandlung mit NVP-BEZ235 in allen getesteten Oxygenierungsbedingungen. Im Gegensatz zum gegenwärtigen Paradigma von Autophagie, wonach eine Akkumulation des LC3-II Proteins auftritt (Barth u. a., 2010; Tanida u. a., 2008), beobachteten wir nach Inkubation mit NVP-BEZ235 eine starke Reduktion der LC3-I, aber keine Erhöhung der LC3-II Niveaus. Allerdings haben Mizushima und Yoshimori berichtet, dass das initial erhöhte LC3-II Niveau innerhalb weniger Stunden nach Induktion der Autophagie durch die Verschmelzung der Autophagosomen mit Lysosomen degradiert wird (Mizushima & Yoshimori, 2007). Die Autophagieinduktion durch NVP-BEZ235 ist von enormem Interesse, da die Rolle von Autophagie in Krebserkrankungen bis heute nicht vollständig verstanden ist und dieser zelluläre Prozess momentan kontrovers in der Literatur diskutiert wird (Hippert u. a., 2006; Roy & Debnath, 2010). So versuchen z.B. mehrere Forschungsgruppen den Autophagieprozess zur Krebstherapie zu nutzen, indem der Abbau von Autophagosomen oder Autolysosomen mit Chloroquine oder Bafilomycin A1 verhindert wird, wofür bereits eine radiosensibilisierende Wirkung berichtet wurde (Apel u. a., 2008; Krakstad & Chekenya, 2010). Ob eine simultane Blockade des Autophagieprozesses die von NVP-BEZ235 induzierte Radiosensibilisierung in Brustkrebszelllinien synergistisch verstärkt, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, um das radiosensibilisierende Potential von NVP-BEZ235 voll auszuschöpfen.

Obwohl keine Unterschiede in der Induktion von ROS in den mit DMSO und NVP-BEZ235 behandelten Zellen gemessen wurden, beobachteten wir, wie auch schon bei den zuvor untersuchten Glioblastomzelllinien (vgl. Abbildung 4-11), eine verringerte Phosphorylierung von H2AX sowie eine verringerte Reparatur von DNS-Schäden nach kombinierter Bestrahlung und Behandlung mit NVP-BEZ235. Wie bereits zuvor erwähnt, ist eine möglich Erklärung, dass der duale PI3K/mTOR Inhibitor als Nebenwirkung ebenfalls die DNA-PK, ATM und ATR Kinasen inhibiert (Mukherjee u. a., 2012; Shortt u. a., 2013; Toledo u. a., 2011), welche Bestandteil der DDR sind (Kinner u. a., 2008; Shiloh & Ziv, 2013).

Der Umstand, dass 24 h nach Bestrahlung in hypoxischen Zellen im Gegensatz zu den normoxischen und den reoxygenierten Zellen keine Unterschiede zwischen den DMSO

und NVP-BEZ235 behandelten Proben erkennbar waren, ist wahrscheinlich durch die verringerte Reparaturfähigkeit von hypoxischen Zellen bedingt (Bindra u. a., 2007; Kumareswaran u. a., 2012). Nach 48 h wurde allerdings in allen untersuchten Oxygenierungsbedingungen eine verzögerte Reparatur von DNS-Schäden durch NVP-BEZ235 beobachtet, was von besonderem Interesse ist, da bereits mehrere Forschergruppen berichteten, dass eine Inhibition der Reparatur von DNS-Schäden Krebszellen gegenüber zytotoxischen Agenzien, wie z.B. Bestrahlung, sensibilisieren kann (Dumont u. a., 2009; Fuhrman u. a., 2008; Senra u. a., 2011). Daraus lässt sich folgern, dass die Verzögerung der Reparatur von DNS-Schäden, welche bei sämtlichen untersuchten Oxygenierungsbedingungen beobachtet wurde, ein weiterer Grundstein der hier beschriebenen Radiosensibilisierung der Brustkrebszelllinien ist.

Die Unterschiede bezüglich des Zellzyklusarrestes zwischen bestrahlten MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen, nämlich ein G2/M Arrest 24 h nach IR bei der TN und ein G1 Arrest 24 h nach IR bei der ER positiven Zelllinie, beruhen wahrscheinlich ebenfalls auf dem unterschiedlichen *TP53* Status der beiden Zelllinien, da bereits gezeigt wurde, dass der G1 Kontrollpunkt von funktionsfähigem p53 abhängig ist (Bouwman & Jonkers, 2012; Samuel u. a., 2002). Wurden die Zellen hingegen mit NVP-BEZ235 behandelt und bestrahlt, so wurde in beiden Zelllinien 48 h nach Bestrahlung unabhängig vom Oxygenierungszustand eine erhöhte Fraktion an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus gemessen. Dies kann wie auch schon bei den Glioblastomzelllinien als ein stabiler Zellzyklusarrest interpretiert werden, der ebenfalls einen Beitrag an der antiproliferativen und radiosensibilisierenden Wirkung von NVP-BEZ235 hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der duale PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 die TN MDA-MB-231 und die ER positive MCF-7 Brustkrebszelllinie in den verschiedenen physiologisch relevanten Oxygenierungszuständen normoxisch, nach Bestrahlung reoxygeniert und hypoxisch radiosensibilisierte. Diese sauerstoffunabhängige Radiosensibilisierung ist höchstwahrscheinlich durch Inhibition von HIF-1 α und des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, durch Reduzierung der DNS-Doppelstrangbruch-Reparaturfähigkeit sowie durch Autophagie und zu gewissem Teil durch Apoptose bedingt. Weiterhin reduzierte eine Kombination von Bestrahlung mit NVP-BEZ235 die Proliferation in beiden Zelllinien zu einem höheren Maß als Bestrahlung oder eine Behandlung mit NVP-BEZ235 für sich alleine, was weitere additive oder synergistische Effekte impliziert. NVP-BEZ235 wird momentan in klinischen Studien der Phase I und

II getestet und insbesondere die vielversprechenden Ergebnisse in der ER positiven MCF-7 Zelllinie zusammen mit den Fakten, dass die Mehrheit der humanen Brusttumore ER positiv sind sowie PI3K-aktivierende Mutationen aber einen wildtypischen *TP53* Status haben (Campbell u. a., 2004; Castoria u. a., 2010; Gasco u. a., 2002), weisen auf eine klinisch relevante Anwendung von NVP-BEZ235 in der Strahlentherapie von Brustkrebs hin.

5.3 EINFLUSS DER SIMULTANEN INHIBITION DER PI3K/MTOR UND MAPK SIGNALKASKADEN AUF DIE STRAHLENANTWORT HUMANER KREBSZELLEN

Onkogene Signalkaskaden sind bereits seit Jahrzehnten als molekulares therapeutisches Ziel anerkannt und in den letzten Jahren belegten mehrere Studien beeindruckende Erfolge in verschiedenen Tumorentitäten (Akinleye u. a., 2013; Courtney u. a., 2010; Dhillon u. a., 2007; Engelman, 2009; Hernandez-Aya & Gonzalez-Angulo, 2011; Kong & Yamori, 2008; Sebolt-Leopold & Herrera, 2004). Weiterhin wurde von mehreren Forschern gezeigt, dass eine kombinierte Inhibition mehrerer Signalkaskaden synergistische Effekte induziert, wobei insbesondere die Inhibition der MAPK/Erk und der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade vielversprechende Resultate zeigte, da diese in einer Vielzahl humaner Tumorerkrankungen aktiviert sind (Aksamitiene u. a., 2012; Downward, 2008; Grant, 2008; Mendoza u. a., 2011; Rexer u. a., 2009; Valentino u. a., 2014).

Auch in der Strahlentherapie wird bereits seit den 80er Jahren eine kombinierte Therapie eingesetzt (Nyati u. a., 2006; Weischedel & Wieland, 1989), wobei gezeigt wurde, dass die Inhibition des MAPK/Erk oder des PI3K/Akt/mTOR Signalweges ein radiosensibilisierendes Potential in Tumorzellen hat (Chung u. a., 2009, 2013; Dumont u. a., 2009; Konstantinidou u. a., 2009; Ruan u. a., 2010). So wurde auch für den dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 und den MEK Inhibitor AZD6244, welche momentan beide in klinischen Studien getestet werden (Internetseite: „Search of: BEZ235 - List Results - ClinicalTrials.gov“, Internetseite: „Search of: Selumetinib - List Results - ClinicalTrials.gov“), eine Radiosensibilisierung in verschiedenen Experimenten nachgewiesen (Chung u. a., 2009, 2013; Fokas u. a., 2012b; Konstantinidou u. a., 2009; Shannon u. a., 2009). Weiterhin wurden die beiden Inhibitoren bereits in *in vitro* und *in vivo* Studien in Kombination eingesetzt, wobei vielversprechende Synergismen entdeckt wurden (Migliardi u. a., 2012; Qu u. a., 2014; Roberts u. a., 2012). Allerdings gibt es bis heute keine publizierte Studie, welche die Kombination von AZD6244 und NVP-BEZ235 gemeinsam mit ionisierender Strahlung untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Auswirkung der Behandlung mit den einzelnen und den kombinierten Inhibitoren auf die klonogene Fähigkeit von SNB19 Glioblastom- und A549 Lungenkarzinomzellen nach Bestrahlung mittels Koloniebildungstest untersucht. Ferner wurden die molekularbiologischen Effekte von AZD6244 und

NVP-BEZ235 sowie von einer Bestrahlung mit 8 Gy auf den Zellzyklus, die Apoptose die Autophagie sowie auf die Expression wichtiger Proteine der MAPK/Erk und der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade mittels Durchflusszytometrie und Western blot bestimmt. In Abbildung 5-5 sind die wichtigsten Ergebnisse für eine Behandlung mit AZD6244 (rot gestreifte Balken), NVP-BEZ235 (blaue Balken) und der Kombinationsbehandlung mit AZD6244 und NVP-BEZ235 (rot-blau gestreifte Balken) für die untersuchten SNB19 (linke Seite) und A549 Zellen (rechte Seite) in Relation zur entsprechenden Kontrolle dargestellt.

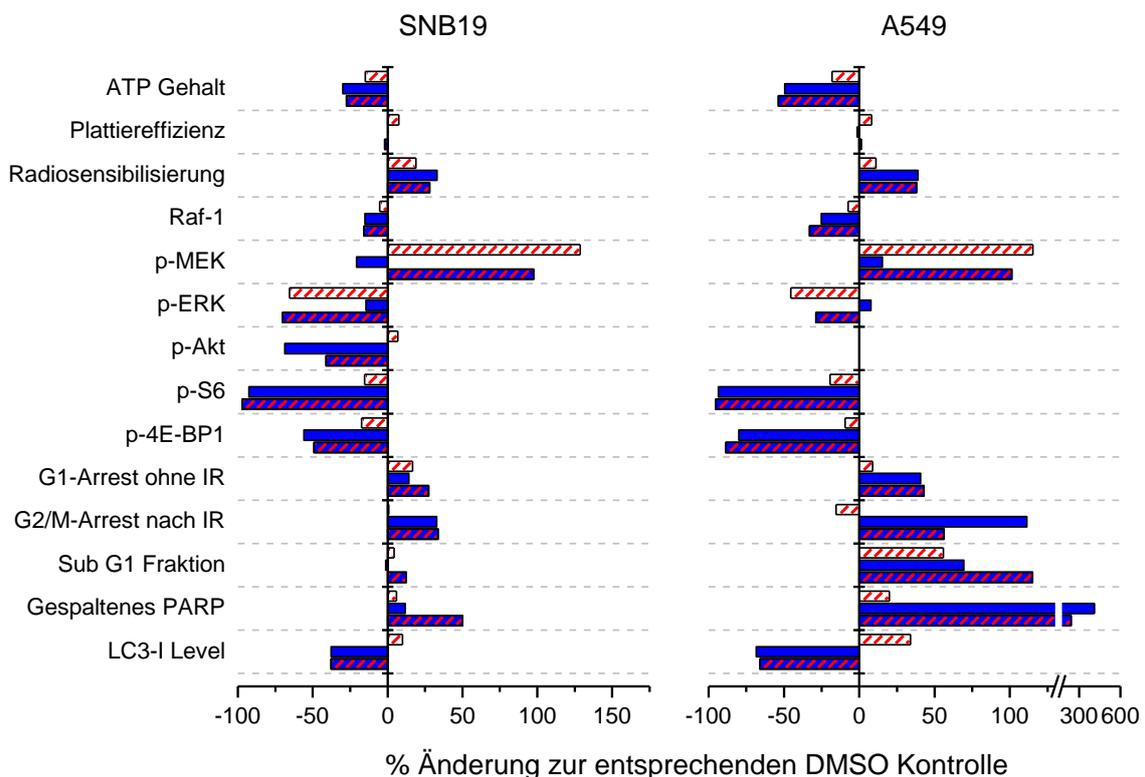


Abbildung 5-5 Effekte von AZD6244, NVP BEZ235 sowie einer Kombination beider Inhibitoren in SNB19 und A549 Zellen

Zusammenfassung der Effekte von AZD6244 (rot gestreifte Balken), NVP-BEZ235 (blaue Balken) und einer Kombination beider Inhibitoren (rot-blau gestreifte Balken) auf die Proliferation, die Radiosensibilisierung, die Expression von Proteinen der MAPK/Erk und PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade, den Zellzyklus, die Apoptose und die Autophagie in SNB19 (linke Seite) und A549 Zellen (rechte Seite) im Vergleich zur entsprechenden DMSO Kontrolle. Die angegebenen Effekte für p-Akt beziehen sich auf 30 min, die der anderen Signalweg-relevanten Proteine auf 24 h und die Effekte in Bezug auf den Zellzyklus, die Apoptose und die Autophagie auf 48 h nach der Bestrahlung mit 8 Gy.

Wie in Abbildung 4-26 gezeigt, resultierte eine alleinige Inkubation mit AZD6244 in beiden Zelllinien in einer dosisabhängigen Reduktion des ATP Gehalts zu ähnlichem Ausmaß, obgleich die Zellen einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund haben (vgl. Tabelle 3-1). So sind *KRAS* mutierte Zelllinien im Allgemeinen zwar sensibler gegenüber einer Inhibition des MAPK/Erk Signalweges (Davies u. a., 2007), allerdings

trifft dies nicht auf die Lungenkarzinomzelllinie A549 zu (Yang u. a., 2013), was die ähnliche Sensibilität der beiden Zelllinien gegenüber AZD6244 erklären kann. Wurden die Zellen mit steigenden NVP-BEZ235 Konzentrationen behandelt, so wurde in beiden Zelllinien eine Reduktion des ATP Levels beobachtet, obgleich die Wirkung von NVP-BEZ235 in den Lungenkarzinomzellen deutlich stärker war. Wie in Tabelle 3-1 dargestellt, gibt es in A549 Zellen keine offensichtlichen genetischen Merkmale, wie z.B. Mutationen des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, die diese starke Inhibition durch NVP-BEZ235 erklären könnte (Yang u. a., 2013). Es ist daher wahrscheinlich, dass die unterschiedliche Entität der beiden Zelllinien der ausschlaggebende Faktor für die unterschiedliche Sensitivität gegenüber NVP-BEZ235 ist. Bei einer Kombination von AZD6244 und NVP-BEZ235 wurde im Allgemeinen in beiden Zelllinien die gleiche Wirkung wie nach alleiniger Behandlung mit NVP-BEZ235 gemessen, was dafür spricht, dass zum einen NVP-BEZ235 (in den getesteten Konzentrationen) der effektivere Inhibitor ist und zum anderen die Wirkung von NVP-BEZ235 nicht durch AZD6244 beeinflusst wird. Da die PE bei den durchgeführten Koloniebildungstests weder durch AZD6244 noch durch NVP-BEZ235 signifikant beeinflusst wurde, kann gefolgert werden, dass beide Substanzen in den getesteten Konzentrationen von 500 nM für AZD6244 und 50 nM für NVP-BEZ235, zumindest bei einer Inkubationsdauer von 24 h, eher zytostatisch als zytotoxisch wirken, da bei einer zytotoxischen Wirkung die PE sinken würde.

Wie in Abbildung 4-27, Tabelle 4-5 und bereits in anderen Studien belegt (Chung u. a., 2009, 2013; Shannon u. a., 2009), hatte eine Inhibition des MAPK/Erk Signalweges eine radiosensibilisierende Wirkung, obgleich die Wirkung von AZD6244 lediglich von moderater Natur war. Dies lässt sich möglicherweise durch die allosterische Inhibition von MEK erklären (Akinleye u. a., 2013), da hierdurch eine Überphosphorylierung von MEK1/2 induziert wurde (vgl. Abbildung 4-28). Weiterhin konnte auch nach Inkubation mit AZD6244 p-ERK gemessen werden (vgl. Abbildung 4-28), was dafür spricht, dass die Aktivität von MEK nicht vollständig inhibiert wurde, was ebenfalls die radiosensibilisierende Wirkung schwächen könnte.

Auch für den dualen PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 wurde in den beiden anderen in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsteilen eine stärkere Radiosensibilisierung in verschiedenen Zelllinien gemessen (vgl. Kapitel 4.1.2 und 4.2.2) und ist ebenso in der Literatur beschrieben (Fokas u. a., 2012b; Potiron u. a., 2013; Zhu u. a., 2013). Dies ist

wahrscheinlich durch die relativ niedrige NVP-BEZ235 Konzentration bedingt, welche in diesem Versuchsteil lediglich 50 nM betrug (vgl. 100 nM in den beiden anderen Versuchsteilen). Es wurden für diesen Versuchsteil bewusst relativ niedrige Konzentrationen für AZD6244 und NVP-BEZ235 gewählt, da durch zu hohe Einzelkonzentrationen der Inhibitoren eine mögliche synergetische Wirkung der Kombination beider Inhibitoren maskiert werden könnte.

Die Tatsache, dass in beiden untersuchten Zelllinien sowohl für eine Behandlung mit NVP-BEZ235 als auch für eine Behandlung mit beiden Inhibitoren ähnliche I_{10} Werte gemessen wurde, belegt, dass keine synergistischen oder additiven Effekte durch die simultane Inkubation mit beiden Inhibitoren in Bezug auf die Radiosensibilität auftreten. Da allerdings Williams et al. eine synergistische radiosensibilisierende Wirkung nach Kombination eines MEK und eines Akt Inhibitors in Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen haben (Williams u. a., 2012), sollte in weiteren Experimenten getestet werden, ob die Inkubation des dualen PI3K/mTOR Inhibitors NVP-BEZ235 mit anderen Inhibitoren der MAPK/Erk Signalkaskade zu einer synergistischen Radiosensibilisierung führt. Ebenso könnten die Versuche mit anderen Zelllinien und/oder anderen Konzentrationen der beiden hier getesteten Inhibitoren wiederholt werden.

Als mögliche Ursache für die beobachtete Radiosensibilisierung wurde die Inhibition der onkogenen MAPK/Erk und PI3K/Akt/mTOR Signalkaskaden (vgl. Abbildung 4-28, Abbildung 4-29 und Abbildung 5-5) untersucht, da bereits mehrere Forschungsgruppen zeigten, dass diese die zelluläre Strahlensensitivität modulieren können (Ding u. a., 2013; Munshi & Ramesh, 2013; Schuurbijs u. a., 2009). Wie erwartet und im Einklang mit publizierten Daten für verschiedene Tumorentitäten (Davies u. a., 2007; Huynh u. a., 2007; Yeh u. a., 2007), inhibierte eine Behandlung mit AZD6244 den MAPK/Erk Signalweg, validiert durch eine verringerte Expression von p-Erk, obgleich die Phosphorylierung von Erk nicht vollständig unterbunden wurde (vgl. Abbildung 4-28). Die Inhibition der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade durch NVP-BEZ235 wurde durch verminderte Phosphorylierung von Akt, S6 und 4E-BP1 belegt (vgl. Abbildung 4-29) und ist ebenfalls in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten für verschiedene Tumorentitäten (Kong u. a., 2010; Liu u. a., 2009b; Maira u. a., 2008; Manara u. a., 2010; Serra u. a., 2008). Erwähnenswert ist, dass eine längere Inkubation mit NVP-BEZ235 zu einer Reduktion von Raf-1 führte (vgl. Abbildung 4-28). Dies impliziert eine Verknüpfung der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade, dem eigentlichen Ziel von

NVP-BEZ235, mit dem MAPK/Erk Signalweg, wie sie bereits auch mehrfach in der Literatur beschrieben wurde (Aksamitiene u. a., 2012; Grant, 2008; Mendoza u. a., 2011).

Um die Antwort der beiden getesteten Zelllinien auf eine Behandlung mit einem oder beiden der Inhibitoren sowie mit Bestrahlung genauer zu untersuchen, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Eine Bestrahlung mit 8 Gy resultierte in beiden untersuchten Zelllinien in Änderungen der Zellzyklusverteilung, wobei zelllinienspezifische Unterschiede auftraten. So wurde in den bestrahlten SNB19 Zellen hauptsächlich ein G2/M-Arrest gemessen, wohingegen in den A549 Zellen vor allem ein erhöhter Anteil an Zellen in der G1-Phase detektiert wurde (vgl. Abbildung 4-30 und Abbildung 4-31). Eine mögliche Ursache hierfür ist der unterschiedliche genetische Mutationsstatus des *TP53* Gens (Internetseite: „IARC TP53 Database“). So verursacht das wildtypische und somit funktionale p53 Tumorsuppressorprotein in den A549 Zellen einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase, wohingegen diese Blockade am G1/S-Phase Kontrollpunkt in den *TP53* mutierten SNB19 Zellen nicht auftritt, weshalb diese nach Bestrahlung vermehrt in der G2/M-Phase akkumulieren. Die Western blot Ergebnisse untermauern die durchflusszytometrisch erhaltenen Daten (vgl. Abbildung 4-32). So wurde in *TP53* mutierten SNB19 Zellen auch nach Bestrahlung p-Rb detektiert, was einen inaktiven G1/S Kontrollpunkt validiert, wohingegen in der *TP53* wildtypischen A549 Zelllinie nach Bestrahlung eine deutliche Reduktion der Rb Phosphorylierung detektiert wurde, was für einen Blockade des G1/S Kontrollpunkts spricht (Kastan & Bartek, 2004; Massagué, 2004; Vermeulen u. a., 2003).

Die Tatsache, dass eine Behandlung mit AZD6244 in beiden untersuchten Zelllinien eine Erhöhung des Anteils an Zellen in der G1-Phase in gleichem Maße in unbestrahlten als auch in bestrahlten Zellen bewirkte (vgl. Abbildung 4-31), lässt darauf schließen, dass es keine additiven oder synergistischen Effekte zwischen dem MEK-Inhibitor und der Bestrahlung in Bezug auf den Zellzyklus gab. Analog zu den bereits in den anderen Versuchsteilen gezeigten Daten (vgl. Kapitel 4.1.6 und 4.2.5.1) wurde nach Behandlung mit NVP-BEZ235 auch in den SNB19 und in den A549 Zellen eine erhöhte Fraktion an G1-Phase Zellen in unbestrahlten und ein erhöhter Anteil an G2/M-Phase Zellen in bestrahlten Zellen beobachtet (vgl. Abbildung 4-31). Da diese Zellzyklusveränderungen in den mit NVP-BEZ235 behandelten Zellen auch 48 h nach Bestrahlung messbar waren, deutet dies auf einen stabilen Zellzyklusarrest hin.

Eine Kombination beider Inhibitoren hatte in unbestrahlten A549 Zellen keine weiteren Effekte auf den Zellzyklus, als die Inkubation mit NVP-BEZ235 alleine (vgl. Abbildung 4-31). Dies lässt sich durch den starken Effekt von NVP-BEZ235 erklären, welcher eine synergistische Wirkung vollständig maskieren könnte. Die Hypothese, dass eine Kombination von AZD6244 und NVP-BEZ235 auch in der Lungenkarzinomzelllinie A549 synergistisch als Zytostatikum wirkt, sollte daher durch weitere Experimente mit verringerten NVP-BEZ235 Konzentrationen untersucht werden. In SNB19 Zellen hingegen korrelierte die Inhibition beider onkogener Signalwege mit einer deutlich erhöhten Proportion an SNB19 Zellen in der G1-Phase (vgl. Abbildung 4-31) und einer deutlichen Reduktion von p-Rb (vgl. Abbildung 4-32). Dies lässt auf eine additive oder synergistische antiproliferative Wirkung von AZD6244 und NVP-BEZ235 in der Glioblastomzelllinie schließen, wie sie bereits für AZD6244 und NVP-BEZ235 in anderen Tumorentitäten nachgewiesen wurde (Grazia u. a., 2014; Migliardi u. a., 2012; Qu u. a., 2014). Die hier vorliegenden Ergebnisse sind allerdings die ersten, welche eine synergistische zytostatische Wirkung beider Inhibitoren in Glioblastomzellen validieren.

Wie bereits in den untersuchten Glioblastomzelllinien DK-MG, GaMG, U87-MG und U373 (vgl. Kapitel 4.1.5) als auch in den beiden untersuchten Brustkarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 (vgl. Kapitel 4.2.5.2) hatte auch in SNB19 und A549 Zellen eine Behandlung mit NVP-BEZ235 zur Folge, dass 30 min nach einer Bestrahlung mit 8 Gy weniger H2AX phosphoryliert wurde (vgl. Abbildung 4-34) als in den entsprechenden Kontrollen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, wie bereits in den beiden anderen Projekten dieser Arbeit erwähnt, die Inhibition der DNA-PK, ATM und ATR Kinasen als Nebenwirkung der Behandlung mit NVP-BEZ235 (Mukherjee u. a., 2012; Shortt u. a., 2013; Toledo u. a., 2011). Im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Experimenten für die Glioblastom- und die Brustkrebszelllinien wurden sowohl in bestrahlten SNB19 als auch in bestrahlten A549 Zellen allerdings 48 h nach IR keine Unterschiede in der γ H2AX Expression nach einer Behandlung mit einem oder beiden Inhibitoren gemessen (vgl. Abbildung 4-34 A und B). Dies lässt darauf schließen, dass die Reparatur der strahleninduzierten DNS-Schäden weder durch AZD6244, noch durch NVP-BEZ235, noch durch die Kombination beider Inhibitoren beeinflusst wurde. Der Unterschied in der Wirkung von NVP-BEZ235 im Vergleich zu den anderen Versuchsteilen ist wahrscheinlich durch die Tatsache bedingt, dass mit 50 nM eine deutlich niedrigere Konzentration des dualen PI3K/mTOR Inhibitors eingesetzt wurde, obgleich eine

zelllinienspezifische Reaktion ebenfalls möglich ist und in weiteren Experimenten untersucht werden sollte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die durch NVP-BEZ235 induzierte Radiosensibilisierung von SNB19 Glioblastom- und A549 Lungenkarzinomzellen durch Zugabe des MEK-Inhibitors Selumetinib nicht erhöht wurde. Da allerdings mittlerweile über 36 verschiedene Inhibitoren der MAPK/Erk und über 92 Inhibitoren der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade kommerziell verfügbar sind (Internetseite: „MAPK Inhibitors“, Internetseite: „PI3K/Akt/mTOR Inhibitors“), sollte der hier dargestellte Versuchsaufbau der synergistischen Radiosensibilisierung durch kombinierte Inhibition der MAPK/Erk und PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade mit anderen Substanzen wiederholt werden, um das radiosensibilisierende Potential der Inhibition beider Signalwege voll auszuschöpfen. Obwohl keine synergistischen Effekte in Bezug auf die Strahlensensitivität gemessen wurden, sind die Ergebnisse in Bezug auf eine synergetische zytostatische Wirkung sehr vielversprechend, da nach kombinierter Zugabe beider Inhibitoren sowohl der MAPK/Erk als auch der PI3K/Akt/mTOR Signalweg inhibiert wurde (vgl. Abbildung 4-28 und Abbildung 4-29). Insbesondere die Daten für die SNB19 Zellen weisen auf ein therapeutisch relevantes Potential der Kombination von AZD6244 und NVP-BEZ235 als Zytostatika bei der Behandlung von Glioblastoma hin, welches durch weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche untersucht werden sollte.

6 SYNOPSIS

6.1 ZUSAMMENFASSUNG

Eine wichtige Standardtherapie in der modernen Behandlung von Krebserkrankungen ist die Strahlentherapie, in welcher Tumorzellen mittels ionisierender Strahlung geschädigt und abgetötet werden. Dabei soll die Schädigung des umgebenden Normalgewebes möglichst gering gehalten und trotzdem eine maximale Schädigung des Tumorgewebes erreicht werden. Deshalb sind neue Strategien zur Steigerung der Radiosensitivität des Tumorgewebes sehr wichtig, die es erlauben, bei gleicher Dosis eine verstärkte Strahlenantwort im Tumorgewebe zu erreichen. Hier kommen zunehmend sog. Radiosensibilisatoren zum Einsatz, die unter anderem onkogene Signalwege in den Tumorzellen inhibieren. Der PI3K/Akt/mTOR Signalweg stellt hierbei einen wichtigen Ansatzpunkt dar, da er in vielen Tumorentitäten dereguliert vorliegt und diese Signalkaskade bekanntermaßen einen Einfluss auf die zelluläre Strahlensensitivität hat. Obwohl es für diesen Signalweg schon eine Reihe von Inhibitoren gibt, für die bereits neben einer antiproliferativen Wirkung auch ein radiosensibilisierender Effekt nachgewiesen wurde (z.B. Wortmannin und Rapamycin), machten eine geringe Spezifität, starke Nebenwirkungen und negative Rückkopplungsmechanismen im Signalweg, die die Wirkung des Inhibitors kompensieren, die Entwicklung neuer Inhibitoren notwendig. Das Imidazoquinolinderivat NVP-BEZ235 inhibiert den PI3K/Akt/mTOR Signalweg an mehreren Stellen gleichzeitig, indem es kompetitiv zu ATP das katalytische Zentrum von PI3K und mTOR blockiert. Für diesen kleinmolekularen, dualen Inhibitor gibt es bereits erste vielversprechende Forschungsergebnisse hinsichtlich einer radiosensibilisierenden Wirkung, allerdings sind die zugrunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt. Deshalb war das Ziel der vorliegenden Dissertation, in drei Teilprojekten mehrere Aspekte der NVP-BEZ235-induzierten Radiosensibilisierung aufzuklären: a) Einfluss des Behandlungsschemas für NVP-BEZ235 in vier Glioblastomzelllinien mit unterschiedlichem *PTEN* und *TP53* Mutationsstatus, b) Einfluss der Sauerstoffversorgung (Hypoxie, Normoxie, reoxygeniert nach Bestrahlung) auf die strahlensensibilisierende Wirkung von NVP-BEZ235 in zwei Mammakarzinomzelllinien, c) gleichzeitige Inhibierung des MAPK Signalwegs durch AZD6244 und der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade durch NVP-BEZ235 in zwei Zelllinien mit unterschiedlichem Mutationsstatus aus verschiedenen Tumorentitäten, um synergistische Effekte zu untersuchen. Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurde im Rahmen

der Dissertation eine Auswahl an humanen Tumorzelllinien mit unterschiedlich deregulierten Signalwegen bearbeitet. Dabei wurde die Expression von Schlüsselproteinen der MAPK/Erk und der PI3K/Akt/mTOR Signalwege analysiert und mit zellbiologischen Daten verschiedener phänotypischer Endpunkte nach Inhibitor Behandlung und Bestrahlung integriert (Proliferationsrate, klonogenes Überleben, Zellzyklusaberrationen, DNS-Schäden und -Reparatur, Zelltod und Autophagie).

Im Teilprojekt zum Behandlungsschema der NVP-BEZ235 Inhibierung und Bestrahlung konnte in vier Glioblastomzelllinien mit Behandlungsschema I (NVP-BEZ235 Behandlung 24 Stunden vor Bestrahlung) kein radiosensibilisierender Effekt hinsichtlich klonogenem Überleben nachgewiesen werden, wohingegen Behandlungsschema II (NVP-BEZ235 Behandlung 1 h vor und im Anschluss an die Bestrahlung) unabhängig vom Mutationsstatus in allen vier Zelllinien eine starke Radiosensibilisierung bewirkte. Auf molekularer Ebene war zwischen beiden Behandlungsschemata für das anti-apoptotische Protein Akt ein großer Unterschied zu beobachten, welches bei Behandlung nach Schema I zum Zeitpunkt der Bestrahlung überaktiviert, nach Behandlung mit Schema II hingegen inhibiert war. Weiterhin resultierte Behandlungsschema I in einem erhöhten Anteil der Zellen in der radioresistenteren G1-Phase des Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Behandlungsschema II führte hingegen nach Bestrahlung zu einer verminderten Expression des Reparaturproteins Rad51 und damit zu verminderter DNS-Schadensreparatur und schließlich zu einem stabilen Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus sowie zu verstärkter Apoptose (erhöhte Spaltung von PARP, erhöhter Anteil hypodiploider Zellen). Somit zeigen diese Ergebnisse, dass unabhängig vom *PTEN* und *TP53* Mutationsstatus eine Radiosensibilisierung nur durch das Behandlungsschema II erreicht werden konnte. Ferner deuten die Ergebnisse der Proteinexpression darauf hin, dass durch NVP-BEZ235 ein negativer Rückkopplungsmechanismus ausgelöst wird, wodurch die PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade 24h nach Zugabe des Inhibitors aktiviert und synergistische Effekte mit ionisierender Bestrahlung aufgehoben wurden.

Im Teilprojekt zur Abhängigkeit der NVP-BEZ235 Inhibition vom Sauerstoffgehalt wurden in den beiden Brustkrebszelllinien MCF-7 (ER-positiv) und TN MDA-MB-231 (*TP53* mutiert) normoxische, hypoxische und nach Bestrahlung reoxygenierte Kulturbedingungen im Hinblick auf die Koloniebildungsfähigkeit nach NVP-BEZ235 Behandlung und Bestrahlung untersucht. Die beobachtete Radiosensibilisierung war unter

allen getesteten Bedingungen auf gleichem Niveau. In beiden Zelllinien bewirkte NVP-BEZ235 eine Inhibition des anti-apoptotischen HIF-1 α Proteins, eine stabile Inaktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalweges und eine Aktivierung der Autophagie. Nach Bestrahlung waren zudem erhöhte residuale DNS-Schäden und ein stabiler Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus unter allen Oxygenierungsbedingungen in beiden Zelllinien zu beobachten. Eine Apoptose Induktion (Spaltung von PARP, hypodiploide Zellen) trat nur in der *TP53* wildtypischen MCF-7 Zelllinie nach NVP-BEZ235 Behandlung auf. Somit konnte in beiden Zelllinien in allen pathophysiologisch relevanten Oxygenierungszuständen eine sauerstoffunabhängige Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235 gezeigt werden.

Der bisher nicht erforschte Aspekt zur synergistischen Wirkung des MEK Inhibitors AZD6244 und des dualen PI3K/Akt/mTOR Inhibitors NVP-BEZ235 nach Bestrahlung wurde an der Glioblastomzelllinie SNB19 und der Lungenkarzinomzelllinie A549 anhand der Koloniebildungsfähigkeit der behandelten Zellen untersucht. Eine Behandlung mit dem MEK Inhibitor bewirkte lediglich eine moderate Radiosensibilisierung, wohingegen der duale PI3K/Akt/mTOR Inhibitor beide Zelllinien in stärkerem Maße sensibilisierte. Eine Kombination beider Inhibitoren resultierte bei keiner Zelllinie in einer Verstärkung der durch NVP-BEZ235 induzierten Radiosensibilisierung. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Synergie im Bezug auf die Radiosensibilisierung können die gegensätzlichen Effekte der beiden Inhibitoren auf den Zellzyklus sein. Auf Proteinebene führte eine simultane Behandlung mit beiden Substanzen zur Inhibition beider Signalwege. Darüber hinaus war in SNB19 Zellen eine verstärkte Dephosphorylierung von Rb und ein erhöhter Anteil an G1-Phase Zellen bei kombinierter Gabe der Inhibitoren zu beobachten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit die radiosensibilisierende Wirkung von NVP-BEZ235 in Abhängigkeit vom Behandlungsschema gezeigt werden. Ferner wurde nachgewiesen, dass die Radiosensibilisierung unabhängig von der Sauerstoffversorgung sowie von den *PTEN* und *TP53* Mutationsstatus der Tumorzellen ist. Die kombinierte Inhibition der MAPK und PI3K/Akt/mTOR Signalwege resultierte zwar in einem verstärkten zytostatischen, aber nicht in einem verstärkten radiosensibilisierenden Effekt. Da allerdings eine große Anzahl verschiedener Inhibitoren der MAPK/Erk und der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade verfügbar sind, sollte die kombinatorische Inhibition dieser Signalwege systematisch weiter verfolgt werden. Die vorliegende Arbeit liefert

auch weitere grundlegende Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen der Radiosensibilisierung durch NVP-BEZ235, die auch auf Verknüpfungen und Wechselwirkungen mit anderen als den bisher bekannten Proteinen hindeuten, die für jeden Inhibitor aufgeklärt werden müssen, um eine effektive radiosensibilisierende Wirkung vorherzusagen zu können.

6.2 SUMMARY

One important treatment option in modern cancer treatment is the radiotherapy, in which tumor cells are killed using the effects of ionizing radiation. A major clinical challenge is the minimization of toxicity to normal tissue with an optimized efficacy in tumor tissue at the same time. In order to meet this requirement, novel strategies are necessary to increase the radiosensitivity of tumor tissue aiming at an enhanced radiation response in tumor cells at unchanged doses. For this purpose radiosensitizers are increasingly used, which often also inhibit oncogenic pathways in tumor cells. The PI3K/Akt/mTOR signaling cascade represents a key target since it is deregulated in many tumor types and since it is known that this pathway influences the cellular radiosensitivity. Even though a number of inhibitors with proven anti-proliferative and radiosensitizing properties are already available for the PI3K/Akt/mTOR pathway (e.g. Wortmannin and Rapamycin), some substantial drawbacks such as low specificity, strong side effects and negative feedback loops within the pathway causing failure of pathway inhibition, necessitate the development of novel inhibitors. NVP-BEZ235 is an imidazoquinoline derivate, which acts as a dual inhibitor of the PI3K/Akt/mTOR pathway by inhibiting the catalytic domain of PI3K and mTOR in an ATP competitive manner. There are already promising results published about a radiosensitizing effect of this small molecule inhibitor, however, the underlying molecular mechanisms are still not sufficiently clarified. For this reason, the aim of this doctoral thesis was to clarify several aspects of NVP-BEZ235-induced radiosensitization: a) impact of the treatment scheme of NVP-BEZ235 on four glioblastoma cell lines with different *PTEN* and *TP53* mutational status, b) impact of oxygen supply (hypoxia, normoxia, reoxygenation after irradiation) on the radiosensitizing effect of NVP-BEZ235 in two breast cancer cell lines, c) simultaneous inhibition of the MAPK/Erk pathway with AZD6244 and the PI3K/Akt/mTOR pathway with NVP-BEZ235 in two cell lines differing in their mutational background and their origin in order to investigate synergistic effects on radiosensitization. In order to meet these aims, a selection of human tumor cell lines

with differentially deregulated pathways was used in this thesis. The expression of key proteins of the PI3K/mTOR and MAPK/Erk pathways were analyzed and integrated with phenotypic data (proliferation rate, clonogenic survival, cell cycle alterations, DNA damage and repair, cell death, autophagy) after inhibitor treatment and irradiation of cells. For this purpose, proliferation and colony forming assays as well as flow cytometry and Western blot analyses have been performed.

The subproject investigating the treatment schemes of NVP-BEZ235 inhibition in combination with irradiation demonstrated in four glioblastoma cell lines that treatment scheme I (NVP-BEZ235 treatment 24 h before irradiation) could not generate a radiosensitizing effect considering clonogenic survival. However, treatment scheme II (NVP-BEZ235 treatment 1 h before and after irradiation) resulted in a strong radiosensitization in each cell line independently of the mutation status. At protein level, a remarkable difference between the two treatment schemes was observed for the expression of the anti-apoptotic protein Akt, which was overexpressed at the time of irradiation under scheme I, whilst it was inhibited under treatment of scheme II. Scheme I also resulted in an elevated proportion of cells in the more resistant G1-phase of the cell cycle at the time of irradiation. On the other hand, scheme II caused a reduced expression of the repair protein Rad51 and a diminished DNA repair after irradiation. Also, a stable arrest in the G2/M-phase of the cell cycle and increased apoptosis (increased cleavage of PARP and elevated proportions of hypodiploid cells) were noticed under scheme II conditions. Thus, these findings demonstrate a radiosensitization only under conditions of treatment scheme II and that this radiosensitization was independent of *PTEN* and *TP53* mutations. Moreover, the data on protein expression indicate a negative feedback loop that was induced by NVP-BEZ235 resulting in an activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway 24 h after inhibitor treatment and leading to abrogation of the synergistic effects with irradiation.

The impact of the oxygen supply on NVP-BEZ235 inhibition was studied within the second subproject, using the breast cancer cell lines MCF-7 (ER-positive) and TN MDA-MB-231 (*TP53* mutated) under normoxia, hypoxia and reoxygenation after irradiation with respect to colony formation after NVP-BEZ235 treatment and irradiation. A radiosensitization was observed for each condition at the same level. NVP-BEZ235 caused in each cell line an inhibition of the anti-apoptotic HIF-1 α protein, a stable inactivation of the PI3K/Akt/mTOR pathway and an activation of autophagy. An increase of

residual DNA damage and a stable arrest in the G2/M-phase of the cell cycle were also noticed for all oxygen conditions after irradiation in both cell lines. An induction of apoptosis (cleavage of PARP, hypodiploid cells) was only seen after NVP-BEZ235 treatment in the wildtype *TP53* MCF-7 cell line. Thus, a radiosensitization independent of the oxygen supply became apparent for all oxygen conditions tested.

The aspect of the synergistic effect after irradiation of the MEK inhibitor AZD6244 and of the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 was examined for the first time within the third subproject. For this purpose, the colony formation ability was analyzed for the glioblastoma cell line SNB19 and for the lung carcinoma cell line A549. The MEK inhibitor AZD6244 only caused a moderate radiosensitization whereas the dual PI3K/Akt/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 resulted in a stronger radiosensitization compared to AZD6244. A combinatorial treatment with both inhibitors did not show a gain of the radiosensitizing effect of NVP-BEZ235 in any cell line. One possible explanation for the missing synergy in terms of radiosensitization could be the adverse effects on the cell cycle observed after combined inhibition. At the protein level the simultaneous treatment with both inhibitors caused an inhibition of both pathways. An increased dephosphorylation of Rb and an elevated proportion of G1-phase cells were observed in SNB19 cells after combinatorial treatment.

Within the scope of this doctoral thesis a radiosensitizing effect of NVP-BEZ235 was clearly demonstrated depending on the treatment scheme. It was shown that the radiosensitization was independent of the oxygen supply and the *PTEN* and *TP53* mutational status of the tumor cells. The simultaneous inhibition of the MAPK/Erk and PI3K/Akt/mTOR pathways caused an increased cytostatic effect on tumor cells, but did not result in an elevated radiosensitization. However, a large number of different inhibitors of the MAPK/Erk and the PI3K/Akt/mTOR signaling cascades are available so far and therefore the specific examination of a combinatorial inhibition of these pathways should be continued. This doctoral thesis also provides basic research findings of the molecular mechanisms of radiosensitization induced by NVP-BEZ235 pointing to links and interactions with so far unknown proteins. These protein and network interactions should be clarified for each inhibitor in order to predict a specific effect on radiosensitization.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4E-BP1	Translation initiation factor 4E binding protein
a. u.	Arbitrary units, relative Einheiten
AKT	Proteinkinase B, Proteinkinase im PI3K/AKT/mTOR Signalweg
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein
AZD6244	6-(4-bromo-2-chloroanilino)-7-fluoro-N-(2-hydroxyethoxy)-3-methylbenzimidazole-5-carboxamide, Selumetinib
BRCA1	Breast Cancer 1, Brustkrebsgen 1
BRCA2	Breast Cancer 2, Brustkrebsgen 2
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CA9	Carbonic anhydrase 9
Caspase	Cysteinyl-Aspartate-spezifische Proteasen
CDC2	Cell division cycle protein 2 = CDK1
CDK1	Cyclin dependent kinase1, cyclinabhängige zellzyklusregulierende Kinase
CDK4	Cyclin dependent kinase4, cyclinabhängige zellzyklusregulierende Kinase
CGM	Complete growth medium, Zellkulturmedium inkl. Zusätze
D ₁₀	Bestrahlungsdosis, bei der 10 % der Zellen überleben
Da	Dalton, Einheit für Proteinmasse
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNS-Fluoreszenzfarbstoff
DDR	DNA damage response, Antwort auf DNS-Schäden
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA dependent protein kinase
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Double strand break
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor

ER	Estrogen receptor, Östrogenrezeptor
Erk	Extracellular regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Fetal calf serum, fötales Kalberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diazetat
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2, Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HR	Homologe Rekombination
I ₁₀	Growth inhibition factor, berechnet sich aus D ₁₀ Kontrolle/D ₁₀ Inhibitor
IR	Irradiation, Bestrahlung
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen activated ERK kinase
MEM	Modified Eagle Medium
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
n. d.	Nicht detektierbar
NHEJ	Non homologous end joining
NVP-BEZ235	2-Methyl-2-{4-[3-methyl-2-oxo-8-(quinolin-3-yl)-2,3-dihydro-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl]phenyl}propanenitrile, Dactolisib
OER	Oxygen enhancement ratio, Sauerstoffeffekt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly ADP ribose polymerase, DNS-Reparaturprotein
PBS	Phosphate buffer saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Plattiereffizienz
PgR	Progesterone receptor, Progesteronrezeptor
PI	Propidiumiodid, DNS-Fluoreszenzfarbstoff
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₁	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat

PTEN	Phosphatase and Tensin homolog, Tumorsuppressorprotein im PI3K/AKT/mTOR Signalweg
RAF-1	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNase	Ribonuklease
Rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SE	Standard error, Standardfehler
SF2	Surviving fraction at 2 Gy, Zellanteil der eine Bestrahlung mit 2 Gy überlebt
TN	Triple negative, Zellen die keine Expression von ER und PgR, sowie keine Überexpression von HER2 zeigen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
γ H2AX	Histonvariante H2AX an Serin 139 phosphoryliert, Marker für DNS-Doppelstrangbrüche

8 ABSCHLUSSARBEITEN

Rico Brendke: „Einfluss des neuartigen dualen mTOR- und PI3K-Inhibitors NVP-BEZ235 auf die Strahlenempfindlichkeit humaner Glioblastomzelllinien“ betreut von Prof. Dr. Djuzenova, August 2011

Emre Cörek: „Modulation der Strahlenempfindlichkeit humaner Mammakarzinom-Zelllinien mittels des neuartigen dualen PI3K- und mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235. Einfluss von Hypoxie“ betreut von Prof. Dr. Djuzenova, Juli 2012

Dorothea Graus (geb. Englisch): „Modulation der Strahlenempfindlichkeit humaner Glioblastomzelllinien unterschiedlichen PTEN-Status mittels des neuartigen dualen mTOR- und PI3K-Inhibitors NVP-BEZ235“ betreut von PD Dr. Sukhorukov, November 2011

Weiterhin wurden Daten von Paul Lutyj verwendet, welche im Rahmen seiner medizinischen Doktorarbeit, betreut von Prof. Dr. Djuzenova, entstanden sind. Diese ist zum Zeitpunkt der Einreichung dieser Dissertation noch nicht fertiggestellt, weshalb kein finaler Titel und Abgabedatum der Arbeit von Paul Lutyj angegeben werden können.

9 LITERATURVERZEICHNIS

Akinleye, Akintunde; Furqan, Muhammad; Mukhi, Nikhil; Ravello, Pavan; Liu, Delong: „MEK and the inhibitors: from bench to bedside“ erschienen in *Journal of Hematology & Oncology* Bd. 6 (2013), S. 27

Aksamitiene, Edita; Kiyatkin, Anatoly; Kholodenko, Boris N.: „Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance“ erschienen in *Biochemical Society Transactions* Bd. 40 (2012), Nr. 1, S. 139–146

Allen, Lee F.; Sebolt-Leopold, Judith; Meyer, Mark B.: „CI-1040 (PD184352), a targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK)“ erschienen in *Seminars in Oncology* Bd. 30 (2003), Nr. 5, S. 105–116

Apel, Anja; Herr, Ingrid; Schwarz, Heinz; Rodemann, H. Peter; Mayer, Andreas: „Blocked Autophagy Sensitizes Resistant Carcinoma Cells to Radiation Therapy“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 68 (2008), Nr. 5, S. 1485–1494

Azad, Arun; Jackson, Susan; Cullinane, Carleen; Natoli, Anthony; Neilsen, Paul M; Callen, David F; Maira, Sauveur-Michel; Hackl, Wolfgang; McArthur, Grant A; Solomon, Benjamin: „Inhibition of DNA-dependent protein kinase induces accelerated senescence in irradiated human cancer cells“ erschienen in *Molecular Cancer Research* Bd. 9 (2011), Nr. 12, S. 1696–1707

Azzam, Edouard I.; Jay-Gerin, Jean-Paul; Pain, Debkumar: „Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury“ erschienen in *Cancer Letters* Bd. 327 (2012), Nr. 1-2, S. 48–60

Bartholomeusz, Chandra; Gonzalez-Angulo, Ana Maria: „Targeting the PI3K signaling pathway in cancer therapy“ erschienen in *Expert Opinion on Therapeutic Targets* Bd. 16 (2012), Nr. 1, S. 121–130

Barth, Sandra; Glick, Danielle; Macleod, Kay F.: „Autophagy: assays and artifacts“ erschienen in *The Journal of Pathology* Bd. 221 (2010), Nr. 2, S. 117–124

Battelli, Chiara; Cho, Daniel C.: „mTOR inhibitors in renal cell carcinoma“ erschienen in *Therapy* Bd. 8 (2011), Nr. 4, S. 359–367

Bindra, Ranjit S.; Crosby, Meredith E.; Glazer, Peter M.: „Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells“ erschienen in *Cancer Metastasis Reviews* Bd. 26 (2007), Nr. 2, S. 249–260

Bjornsti, Mary-Ann; Houghton, Peter J.: „The TOR pathway: a target for cancer therapy“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 4 (2004), Nr. 5, S. 335–348

Bouwman, Peter; Jonkers, Jos: „The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 12 (2012), Nr. 9, S. 587–598

Bristow, Robert G.; Hill, Richard P.: „Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 8 (2008), Nr. 3, S. 180–192

Britten, Carolyn D.: „PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types“ erschienen in *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* Bd. 71 (2013), Nr. 6, S. 1395–1409

Bucci, M. Kara; Bevan, Alison; Roach, Mack: „Advances in radiation therapy: conventional to 3D, to IMRT, to 4D, and beyond“ erschienen in *CA: A Cancer Journal for Clinicians* Bd. 55 (2005), Nr. 2, S. 117–134

Cam, Hakan; Houghton, Peter J.: „Regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) by hypoxia: causes and consequences“ erschienen in *Targeted Oncology* Bd. 6 (2011), Nr. 2, S. 95–102

Campbell, Ian G.; Russell, Sarah E.; Choong, David Y. H.; Montgomery, Karen G.; Ciavarella, Marianne L.; Hooi, Christine S. F.; Cristiano, Briony E.; Pearson, Richard B.; Phillips, Wayne A.: „Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 64 (2004), Nr. 21, S. 7678–7681

Castaneda, Carlos A.; Cortes-Funes, Hernán; Gomez, Henry L.; Ciruelos, Eva M.: „The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer“ erschienen in *Cancer and Metastasis Reviews* Bd. 29 (2010), Nr. 4, S. 751–759

Castellano, Esther; Downward, Julian: „RAS Interaction with PI3K More Than Just Another Effector Pathway“ erschienen in *Genes & Cancer* Bd. 2 (2011), Nr. 3, S. 261–274

Castoria, Gabriella; Migliaccio, Antimo; Giovannelli, Pia; Auricchio, Ferdinando: „Cell proliferation regulated by estradiol receptor: Therapeutic implications“ erschienen in *Steroids* Bd. 75 (2010), Nr. 8-9, S. 524–527

Caunt, Christopher J.; McArdle, Craig A.: „ERK phosphorylation and nuclear accumulation: insights from single-cell imaging“ erschienen in *Biochemical Society Transactions* Bd. 40 (2012), Nr. 1, S. 224–229

Chaitanya, Ganta Vijay; Steven, Alexander J.; Babu, Phanithi Prakash: „PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration“ erschienen in *Cell Communication and Signaling* Bd. 8 (2010), S. 31

Chakravarti, Arnab; Dicker, Adam; Mehta, Minesh: „The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data“ erschienen in *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* Bd. 58 (2004), Nr. 3, S. 927–931

Chang, F.; Steelman, L. S.; Lee, J. T.; Shelton, J. G.; Navolanic, P. M.; Blalock, W. L.; Franklin, R. A.; McCubrey, J. A.: „Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention“ erschienen in *Leukemia* Bd. 17 (2003), Nr. 7, S. 1263–1293

Chaudary, Naz; Hill, Richard P.: „Hypoxia and metastasis in breast cancer“ erschienen in *Breast Disease* Bd. 26 (2006), S. 55–64

Chautard, Emmanuel; Loubeau, Gaëlle; Tchirkov, Andreï; Chassagne, Jacques; Vermot-Desroches, Claudine; Morel, Laurent; Verrelle, Pierre: „Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma“ erschienen in *Neuro-Oncology* Bd. 12 (2010), Nr. 5, S. 434–443

Chen, Bojiang; Zhang, Wen; Gao, Jun; Chen, Hong; Jiang, Li; Liu, Dan; Cao, Yidan; Zhao, Shuang; Qiu, Zhixin; Zeng, Jing; Zhang, Shangfu; Li, Weimin: „Downregulation of ribosomal protein S6 inhibits the growth of non-small cell lung cancer by inducing cell cycle arrest, rather than apoptosis“ erschienen in *Cancer Letters* Bd. 354 (2014), Nr. 2, S. 378–389

Chen, Honghong; Ma, Zhefu; Vanderwaal, Robert P.; Feng, Zhihui; Gonzalez-Suarez, Ignacio; Wang, Shenming; Zhang, Jiuqin; Roti Roti, Joseph L.; Gonzalo, Susana; Zhang, Junran: „The mTOR Inhibitor Rapamycin Suppresses DNA Double-Strand Break Repair“ erschienen in *Radiation Research* (2010)

Chiarini, Francesca; Grimaldi, Cecilia; Ricci, Francesca; Tazzari, Pier Luigi; Evangelisti, Camilla; Ognibene, Andrea; Battistelli, Michela; Falcieri, Elisabetta; Melchionda, Fraia; Pession, Andrea; Pagliaro, Pasqualepaolo; McCubrey, James A.; Martelli, Alberto M.: „Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 70 (2010), Nr. 20, S. 8097–8107

Chin, Lynda: „The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 3 (2003), Nr. 8, S. 559–570

Cho, Daniel C.; Cohen, Matthew B.; Panka, David J.; Collins, Michael; Ghebremichael, Musie; Atkins, Michael B.; Signoretti, Sabina; Mier, James W.: „The efficacy of the novel dual PI3-kinase/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 compared with rapamycin in renal cell carcinoma“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 16 (2010), Nr. 14, S. 3628–3638

Chung, Eun Joo; Brown, Aaron P.; Asano, Hiroaki; Mandler, Mariana; Burgan, William E.; Carter, Donna; Camphausen, Kevin; Citrin, Deborah: „In vitro and in vivo radiosensitization with AZD6244 (ARRY-142886), an inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinase“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 15 (2009), Nr. 9, S. 3050–3057

Chung, Eun Joo; Urick, Mary Ellen; Kurshan, Naamit; Shield, William 3rd; Asano, Hiroaki; Smith, Paul D.; Scroggins, Bradley S.; Burkeen, Jeffrey; Citrin, Deborah E.: „MEK1/2 inhibition enhances the radiosensitivity of cancer cells by downregulating survival and growth signals mediated by EGFR ligands“ erschienen in *International Journal of Oncology* Bd. 42 (2013), Nr. 6, S. 2028–2036

Chun, Patrick Y.; Feng, Felix Y.; Scheurer, Ashley M.; Davis, Mary A.; Lawrence, Theodore S.; Nyati, Mukesh K.: „Synergistic effects of gemcitabine and gefitinib in the treatment of head and neck carcinoma“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 66 (2006), Nr. 2, S. 981–988

Cooper, Geoffrey M.: „The Cell: A Molecular Approach“. 3. Aufl., Verlag: *Sinauer Associates Inc., U.S.*, Sunderland, MA, USA, 2000

Cossarizza, Andrea; Ferraresi, Roberta; Troiano, Leonarda; Roat, Erika; Gibellini, Lara; Bertoncelli, Linda; Nasi, Milena; Pinti, Marcello: „Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry“ erschienen in *Nature Protocols* Bd. 4 (2009), Nr. 12, S. 1790–1797

Courtney, Kevin D.; Corcoran, Ryan B.; Engelman, Jeffrey A.: „The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer“ erschienen in *Journal of Clinical Oncology* Bd. 28 (2010), Nr. 6, S. 1075–1083

Croce, Carlo M.: „Oncogenes and Cancer“ erschienen in *New England Journal of Medicine* Bd. 358 (2008), Nr. 5, S. 502–511

Cully, Megan; You, Han; Levine, Arnold J.; Mak, Tak W.: „Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 6 (2006), Nr. 3, S. 184–192

Davies, Barry R.; Logie, Armelle; McKay, Jennifer S.; Martin, Paul; Steele, Samantha; Jenkins, Richard; Cockerill, Mark; Cartlidge, Sue; Smith, Paul D.: „AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models“ erschienen in *Molecular Cancer Therapeutics* Bd. 6 (2007), Nr. 8, S. 2209–2219

Dhillon, A. S.; Hagan, S.; Rath, O.; Kolch, W.: „MAP kinase signalling pathways in cancer“ erschienen in *Oncogene* Bd. 26 (2007), Nr. 22, S. 3279–3290

Dillon, R. L.; White, D. E.; Muller, W. J.: „The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer“ erschienen in *Oncogene* Bd. 26 (2007), Nr. 9, S. 1338–1345

Ding, Miao; Zhang, Erlong; He, Rong; Wang, Xingyong: „Newly developed strategies for improving sensitivity to radiation by targeting signal pathways in cancer therapy“ erschienen in *Cancer Science* Bd. 104 (2013), Nr. 11, S. 1401–1410

Downward, Julian: „Targeting RAS and PI3K in lung cancer“ erschienen in *Nature Medicine* Bd. 14 (2008), Nr. 12, S. 1315–1316

Druker, B. J.; Talpaz, M.; Resta, D. J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J. M.; Lydon, N. B.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; Sawyers, C. L.: „Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia“ erschienen in *The New England Journal of Medicine* Bd. 344 (2001), Nr. 14, S. 1031–1037

Druker, Brian J.; Guilhot, François; O'Brien, Stephen G.; Gathmann, Insa; Kantarjian, Hagop; Gattermann, Norbert; Deininger, Michael W. N.; Silver, Richard T.; Goldman, John M.; Stone, Richard M.; Cervantes, Francisco; Hochhaus, Andreas; Powell, Bayard L.; Gabrilove, Janice L.; Rousselot, Philippe; Reiffers, Josy; Cornelissen, Jan J.; Hughes, Timothy; Agis, Hermine; Fischer, Thomas;

- Verhoef, Gregor; Shepherd, John; Saglio, Giuseppe; Gratwohl, Alois; Nielsen, Johan L.; Radich, Jerald P.; Simonsson, Bengt; Taylor, Kerry; Baccarani, Michele; So, Charlene; Letvak, Laurie; Larson, Richard A.: „Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia“ erschienen in *The New England Journal of Medicine* Bd. 355 (2006), Nr. 23, S. 2408–2417
- Dumont, Francis; Altmeyer, Anais; Bischoff, Pierre: „Radiosensitising agents for the radiotherapy of cancer: novel molecularly targeted approaches“ erschienen in *Expert Opinion on Therapeutic Patents* Bd. 19 (2009), Nr. 6, S. 775–799
- Dumont, Francis; Bischoff, Pierre: „Disrupting the mTOR signaling network as a potential strategy for the enhancement of cancer radiotherapy“ erschienen in *Current Cancer Drug Targets* Bd. 12 (2012), Nr. 8, S. 899–924
- Edinger, Aimee L.; Thompson, Craig B.: „Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy“ erschienen in *Current Opinion in Cell Biology* Bd. 16 (2004), Nr. 6, S. 663–669
- E, Jifu; Xing, Junjie; Gong, Haifeng; He, Jian; Zhang, Wei: „Combine MEK inhibition with PI3K/mTOR inhibition exert inhibitory tumor growth effect on KRAS and PIK3CA mutation CRC xenografts due to reduced expression of VEGF and matrix metalloproteinase-9“ erschienen in *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* (2014)
- Engelman, Jeffrey A.: „Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 9 (2009), Nr. 8, S. 550–562
- Eriksson, David; Stigbrand, Torgny: „Radiation-induced cell death mechanisms“ erschienen in *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* Bd. 31 (2010), Nr. 4, S. 363–372
- Esteve, Juan M.; Knecht, Erwin: „Mechanisms of autophagy and apoptosis: Recent developments in breast cancer cells“ erschienen in *World Journal of Biological Chemistry* Bd. 2 (2011), Nr. 10, S. 232–238
- Fan, Qi-Wen; Knight, Zachary A.; Goldenberg, David D.; Yu, Wei; Mostov, Keith E.; Stokoe, David; Shokat, Kevan M.; Weiss, William A.: „A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma“ erschienen in *Cancer Cell* Bd. 9 (2006), Nr. 5, S. 341–349
- Fingar, Diane C.; Richardson, Celeste J.; Tee, Andrew R.; Cheatham, Lynn; Tsou, Christina; Blenis, John: „mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E“ erschienen in *Molecular and Cellular Biology* Bd. 24 (2004), Nr. 1, S. 200–216
- Fokas, Emmanouil; Im, Jae Hong; Hill, Sally; Yameen, Sabira; Stratford, Michael; Beech, John; Hackl, Wolfgang; Maira, Sauveur-Michel; Bernhard, Eric J.; McKenna, W. Gillies; Muschel, Ruth J.: „Dual inhibition of the PI3K/mTOR pathway increases tumor radiosensitivity by normalizing tumor vasculature“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 72 (2012a), Nr. 1, S. 239–248
- Fokas, Emmanouil; Yoshimura, Michio; Prevo, Remko; Higgins, Geoff; Hackl, Wolfgang; Maira, Sauveur-Michel; Bernhard, Eric J.; McKenna, W. Gillies; Muschel, Ruth J.: „NVP-BEZ235 and NVP-BGT226, dual phosphatidylinositol 3-kinase/Mammalian target of rapamycin inhibitors, enhance tumor and endothelial cell radiosensitivity“ erschienen in *Radiation Oncology* Bd. 7 (2012b), Nr. 1, S. 48
- Formigli, L.; Papucci, L.; Tani, A.; Schiavone, N.; Tempestini, A.; Orlandini, G.E.; Capaccioli, S.; Zecchi Orlandini, S.: „Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis“ erschienen in *Journal of Cellular Physiology* Bd. 182 (2000), Nr. 1, S. 41–49
- Foster, David A; Yellen, Paige; Xu, Limei; Saqcena, Mahesh: „Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s)“ erschienen in *Genes & Cancer* Bd. 1 (2010), Nr. 11, S. 1124–1131

Franken, Nicolaas A. P.; Rodermond, Hans M.; Stap, Jan; Haveman, Jaap; van Bree, Chris: „Clonogenic assay of cells in vitro“ erschienen in *Nature Protocols* Bd. 1 (2006), Nr. 5, S. 2315–2319

Fritsche-Guenther, Raphaela; Witzel, Franziska; Sieber, Anja; Herr, Ricarda; Schmidt, Nadine; Braun, Sandra; Brummer, Tilman; Sers, Christine; Blüthgen, Nils: „Strong negative feedback from Erk to Raf confers robustness to MAPK signalling“ erschienen in *Molecular Systems Biology* Bd. 7 (2011), S. 489

Fuhrman, Christa B.; Kilgore, Josh; LaCoursiere, Yvette D.; Lee, Christopher M.; Milash, Brett A.; Soisson, Andrew P.; Zempolich, Karen A.: „Radiosensitization of cervical cancer cells via double-strand DNA break repair inhibition“ erschienen in *Gynecologic Oncology* Bd. 110 (2008), Nr. 1, S. 93–98

Furnari, Frank B.; Lin, Hong; Huang, H.-J. Su; Cavenee, Webster K.: „Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain“ erschienen in *Proceedings of the National Academy of Sciences* Bd. 94 (1997), Nr. 23, S. 12479–12484

Gadgeel, Shirish M.; Wozniak, Antoinette: „Preclinical Rationale for PI3K/Akt/mTOR Pathway Inhibitors as Therapy for Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer“ erschienen in *Clinical Lung Cancer* Bd. 14 (2013), Nr. 4, S. 322–332

Garnett, Mathew J.; Marais, Richard: „Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene“ erschienen in *Cancer Cell* Bd. 6 (2004), Nr. 4, S. 313–319

Gasco, Milena; Shami, Shukri; Crook, Tim: „The p53 pathway in breast cancer“ erschienen in *Breast Cancer Research* Bd. 4 (2002), Nr. 2, S. 70–76

Ghobrial, Irene M.; Witzig, Thomas E.; Adjei, Alex A.: „Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy“ erschienen in *CA: A Cancer Journal for Clinicians* Bd. 55 (2005), Nr. 3, S. 178–194

Grant, Steven: „Cotargeting survival signaling pathways in cancer“ erschienen in *The Journal of Clinical Investigation* Bd. 118 (2008), Nr. 9, S. 3003–3006

Grazia, G.; Vegetti, C.; Benigni, F.; Penna, I.; Perotti, V.; Tassi, E.; Bersani, I.; Nicolini, G.; Canevari, S.; Carlo-Stella, C.; Gianni, A. M.; Mortarini, R.; Anichini, A.: „Synergistic anti-tumor activity and inhibition of angiogenesis by cotargeting of oncogenic and death receptor pathways in human melanoma“ erschienen in *Cell Death & Disease* Bd. 5 (2014), S. e1434

Guenther, Monika Katharina; Graab, Ulrike; Fulda, Simone: „Synthetic lethal interaction between PI3K/Akt/mTOR and Ras/MEK/ERK pathway inhibition in rhabdomyosarcoma“ erschienen in *Cancer Letters* Bd. 337 (2013), Nr. 2, S. 200–209

Gulati, Nicholas; Karsy, Michael; Albert, Ladislau; Murali, Raj; Jhanwar-Uniyal, Meena: „Involvement of mTORC1 and mTORC2 in regulation of glioblastoma multiforme growth and motility“ erschienen in *International Journal of Oncology* Bd. 35 (2009), Nr. 4, S. 731–740

Gupta, Anjali K.; Bakanauskas, Vincent J.; Cerniglia, George J.; Cheng, Yi; Bernhard, Eric J.; Muschel, Ruth J.; McKenna, W. Gillies: „The Ras Radiation Resistance Pathway“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 61 (2001), Nr. 10, S. 4278–4282

Gupta, Anjali K.; Cerniglia, George J.; Mick, Rosemarie; Ahmed, Mona S.; Bakanauskas, Vincent J.; Muschel, Ruth J.; McKenna, W. Gillies: „Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002“ erschienen in *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* Bd. 56 (2003), Nr. 3, S. 846–853

Hakem, Razqallah: „DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly“ erschienen in *The EMBO journal* Bd. 27 (2008), Nr. 4, S. 589–605

Harrington, Laura S.; Findlay, Greg M.; Lamb, Richard F.: „Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane“ erschienen in *Trends in Biochemical Sciences* Bd. 30 (2005), Nr. 1, S. 35–42

Hartlerode, Andrea J.; Scully, Ralph: „Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells“ erschienen in *The Biochemical Journal* Bd. 423 (2009), Nr. 2, S. 157–168

Heinrich, Michael C.; Corless, Christopher L.; Demetri, George D.; Blanke, Charles D.; von Mehren, Margaret; Joensuu, Heikki; McGreevey, Laura S.; Chen, Chang-Jie; Van den Abbeele, Annick D.; Druker, Brian J.; Kiese, Beate; Eisenberg, Burton; Roberts, Peter J.; Singer, Samuel; Fletcher, Christopher D. M.; Silberman, Sandra; Dimitrijevic, Sasa; Fletcher, Jonathan A.: „Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor“ erschienen in *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* Bd. 21 (2003), Nr. 23, S. 4342–4349

Helleday, Thomas; Petermann, Eva; Lundin, Cecilia; Hodgson, Ben; Sharma, Ricky A.: „DNA repair pathways as targets for cancer therapy“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 8 (2008), Nr. 3, S. 193–204

Hernandez-Aya, Leonel F.; Gonzalez-Angulo, Ana M.: „Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer“ erschienen in *The Oncologist* Bd. 16 (2011), Nr. 4, S. 404–414

Herzog, Christian; Yang, Cheng; Holmes, Alexandria; Kaushal, Gur P.: „zVAD-fmk prevents cisplatin-induced cleavage of autophagy proteins but impairs autophagic flux and worsens renal function“ erschienen in *American Journal of Physiology. Renal Physiology* Bd. 303 (2012), Nr. 8, S. F1239–1250

Hippert, Melanie M.; O’Toole, Patrick S.; Thorburn, Andrew: „Autophagy in cancer: good, bad, or both?“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 66 (2006), Nr. 19, S. 9349–9351

Holmes, David: „PI3K pathway inhibitors approach junction“ erschienen in *Nature Reviews Drug Discovery* Bd. 10 (2011), Nr. 8, S. 563–564

Hosoya, Noriko; Miyagawa, Kiyoshi: „Targeting DNA damage response in cancer therapy“ erschienen in *Cancer Science* Bd. 105 (2014), Nr. 4, S. 370–388

Huynh, Hung; Soo, Khee Chee; Chow, Pierce K. H.; Tran, Evelyn: „Targeted inhibition of the extracellular signal-regulated kinase kinase pathway with AZD6244 (ARRY-142886) in the treatment of hepatocellular carcinoma“ erschienen in *Molecular Cancer Therapeutics* Bd. 6 (2007), Nr. 1, S. 138–146

Iizuka, M.; Ando, K.; Aruga, T.; Furusawa, Y.; Itsukaichi, H.; Fukutsu, K.; Nagasawa, H.; Moriya, H.: „Effects of reoxygenation on repair of potentially lethal radiation damage in cultured MG-63 osteosarcoma cells“ erschienen in *Radiation Research* Bd. 147 (1997), Nr. 2, S. 179–184

Jahangiri, Arman; Weiss, William A.: „It Takes Two to Tango: Dual Inhibition of PI3K and MAPK in Rhabdomyosarcoma“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 19 (2013), Nr. 21, S. 5811–5813

Jamal, Muhammad; Rath, Barbara H.; Williams, Eli S.; Camphausen, Kevin; Tofilon, Philip J.: „Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 16 (2010), Nr. 24, S. 6049–6059

Julien, Louis-Andre; Carriere, Audrey; Moreau, Julie; Roux, Philippe P.: „mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling“ erschienen in *Molecular and Cellular Biology* Bd. 30 (2010), Nr. 4, S. 908–921

Kao, Gary D.; Jiang, Zibin; Fernandes, Anne Marie; Gupta, Anjali K.; Maity, Amit: „Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation“ erschienen in *The Journal of Biological Chemistry* Bd. 282 (2007), Nr. 29, S. 21206–21212

Karar, Jayashree; Cerniglia, George J.; Lindsten, Tullia; Koumenis, Constantinos; Maity, Amit: „Dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 suppresses hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α expression by blocking protein translation and increases cell death under hypoxia“ erschienen in *Cancer Biology & Therapy* Bd. 13 (2012), Nr. 11

- Kastan, Michael B.; Bartek, Jiri: „Cell-cycle checkpoints and cancer“ erschienen in *Nature* Bd. 432 (2004), Nr. 7015, S. 316–323
- Kinner, Andrea; Wu, Wenqi; Staudt, Christian; Iliakis, George: „Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin“ erschienen in *Nucleic Acids Research* Bd. 36 (2008), Nr. 17, S. 5678–5694
- Kleibeuker, Esther A.; Griffioen, Arjan W.; Verheul, Henk M.; Slotman, Ben J.; Thijssen, Victor L.: „Combining angiogenesis inhibition and radiotherapy: a double-edged sword“ erschienen in *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* Bd. 15 (2012), Nr. 3, S. 173–182
- Knaup, Karl X.; Jozefowski, Katrin; Schmidt, Regina; Bernhardt, Wanja M.; Weidemann, Alexander; Juergensen, Jan Steffen; Warnecke, Christina; Eckardt, Kai-Uwe; Wiesener, Michael S.: „Mutual regulation of hypoxia-inducible factor and mammalian target of rapamycin as a function of oxygen availability“ erschienen in *Molecular Cancer Research* Bd. 7 (2009), Nr. 1, S. 88–98
- Knight, Zachary A.; Lin, Henry; Shokat, Kevan M.: „Targeting the cancer kinome through polypharmacology“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 10 (2010), Nr. 2, S. 130–137
- Koide, Hiroyuki; Asai, Tomohiro; Furuya, Keiichi; Tsuzuku, Takuma; Kato, Hiroki; Dewa, Takehisa; Nango, Mamoru; Maeda, Noriyuki; Oku, Naoto: „Inhibition of Akt (ser473) phosphorylation and rapamycin-resistant cell growth by knockdown of mammalian target of rapamycin with small interfering RNA in vascular endothelial growth factor receptor-1-targeting vector“ erschienen in *Biological & Pharmaceutical Bulletin* Bd. 34 (2011), Nr. 5, S. 602–608
- Kong, Dexin; Dan, Shingo; Yamazaki, Kanami; Yamori, Takao: „Inhibition profiles of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors against PI3K superfamily and human cancer cell line panel JFCR39“ erschienen in *European Journal of Cancer* Bd. 46 (2010), Nr. 6, S. 1111–1121
- Kong, Dexin; Yamori, Takao: „Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy“ erschienen in *Cancer Science* Bd. 99 (2008), Nr. 9, S. 1734–1740
- Konstantinidou, Georgia; Bey, Erik A.; Rabellino, Andrea; Schuster, Katja; Maira, Sauveur-Michel; Gazdar, Adi F.; Amici, Augusto; Boothman, David A.; Scaglioni, Pier Paolo: „Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin blockade is an effective radiosensitizing strategy for the treatment of non-small cell lung cancer harboring K-RAS mutations“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 69 (2009), Nr. 19, S. 7644–7652
- Krakstad, Camilla; Chekenya, Martha: „Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics“ erschienen in *Molecular Cancer* Bd. 9 (2010), Nr. 1, S. 135
- Kuger, Sebastian; Cörek, Emre; Polat, Bülent; Kämmerer, Ulrike; Flentje, Michael; Djuzenova, Cholpon S.: „Novel PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Radiosensitizes Breast Cancer Cell Lines under Normoxic and Hypoxic Conditions“ erschienen in *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* Bd. 8 (2014), S. 39–49
- Kuger, Sebastian; Graus, Dorothea; Brendtke, Rico; Günther, Nadine; Katzer, Astrid; Lutyj, Paul; Polat, Bülent; Chatterjee, Manik; Sukhorukov, Vladimir L.; Flentje, Michael; Djuzenova, Cholpon S.: „Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule“ erschienen in *Translational Oncology* Bd. 6 (2013), Nr. 2, S. 169–179
- Kumareswaran, Ramya; Ludkovski, Olga; Meng, Alice; Sykes, Jenna; Pintilie, Melania; Bristow, Robert G.: „Chronic hypoxia compromises repair of DNA double-strand breaks to drive genetic instability“ erschienen in *Journal of Cell Science* Bd. 125 (2012), Nr. Pt 1, S. 189–199
- Kurtz, Jean-Emmanuel; Ray-Coquard, Isabelle: „PI3 kinase inhibitors in the clinic: an update“ erschienen in *Anticancer Research* Bd. 32 (2012), Nr. 7, S. 2463–2470

- Lapenna, Silvia; Giordano, Antonio: „Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer“ erschienen in *Nature Reviews Drug Discovery* Bd. 8 (2009), Nr. 7, S. 547–566
- Lauber, Kirsten; Ernst, Anne; Orth, Michael; Herrmann, Martin; Belka, Claus: „Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy“ erschienen in *Molecular and Cellular Oncology* Bd. 2 (2012), S. 116
- Lee, Christopher M.; Fuhrman, Christa B.; Planelles, Vicente; Peltier, Morgan R.; Gaffney, David K.; Soisson, Andrew P.; Dodson, Mark K.; Tolley, H. Dennis; Green, Christopher L.; Zempolich, Karen A.: „Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 12 (2006), Nr. 1, S. 250–256
- Leung, Euphemia; Kim, Ji Eun; Rewcastle, Gordon W.; Finlay, Graeme J.; Baguley, Bruce C.: „Comparison of the effects of the PI3K/mTOR inhibitors NVP-BEZ235 and GSK2126458 on tamoxifen-resistant breast cancer cells“ erschienen in *Cancer Biology & Therapy* Bd. 11 (2011), Nr. 11, S. 938–946
- Levine, A. J.: „The tumor suppressor genes“ erschienen in *Annual Review of Biochemistry* Bd. 62 (1993), S. 623–651
- Liu, Qingsong; Thoreen, Carson; Wang, Jinhua; Sabatini, David; Gray, Nathanael S.: „mTOR Mediated Anti-Cancer Drug Discovery“ erschienen in *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* Bd. 6 (2009a), Nr. 2, S. 47–55
- Liu, Ta-Jen; Koul, Dimpy; LaFortune, Tiffany; Tiao, Ningyi; Shen, Rui Jun; Maira, Sauveur-Michel; Garcia-Echeverria, Carlos; Yung, W. K. Alfred: „NVP-BEZ235, a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas“ erschienen in *Molecular Cancer Therapeutics* Bd. 8 (2009b), Nr. 8, S. 2204–2210
- Di Lonardo, Anna; Nasi, Sergio; Pulciani, Simonetta: „Cancer: we should not forget the past“ erschienen in *Journal of Cancer* Bd. 6 (2015), Nr. 1, S. 29–39
- Lopez-Contreras, Andres Joaquin; Fernandez-Capetillo, Oscar: „Signalling DNA Damage“, Verlag: *INTECH Open Access Publisher*, 2012 — ISBN 9789535107378
- Maira, Sauveur-Michel; Stauffer, Frédéric; Brueggen, Josef; Furet, Pascal; Schnell, Christian; Fritsch, Christine; Brachmann, Saskia; Chène, Patrick; De Pover, Alain; Schoemaker, Kevin; Fabbro, Doriano; Gabriel, Daniela; Simonen, Marjo; Murphy, Leon; Finan, Peter; Sellers, William; García-Echeverría, Carlos: „Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity“ erschienen in *Molecular Cancer Therapeutics* Bd. 7 (2008), Nr. 7, S. 1851–1863
- Manara, Maria C; Nicoletti, Giordano; Zambelli, Diana; Ventura, Selena; Guerzoni, Clara; Landuzzi, Lorena; Lollini, Pier-Luigi; Maira, Saveur-Michel; García-Echeverría, Carlos; Mercuri, Mario; Picci, Piero; Scotlandi, Katia: „NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 16 (2010), Nr. 2, S. 530–540
- Manning, Brendan D.: „Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis“ erschienen in *The Journal of Cell Biology* Bd. 167 (2004), Nr. 3, S. 399–403
- Manning, Brendan D.; Cantley, Lewis C.: „AKT/PKB signaling: navigating downstream“ erschienen in *Cell* Bd. 129 (2007), Nr. 7, S. 1261–1274
- Markman, Ben; Dienstmann, Rodrigo; Tabernero, Josep: „Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs“ erschienen in *Oncotarget* Bd. 1 (2010), Nr. 7, S. 530–543
- Markman, Ben; Tao, Jessica J.; Scaltriti, Maurizio: „PI3K pathway inhibitors: better not left alone“ erschienen in *Current Pharmaceutical Design* Bd. 19 (2013), Nr. 5, S. 895–906
- Marone, Romina; Erhart, Dominik; Mertz, Ann C.; Bohnacker, Thomas; Schnell, Christian; Cmiljanovic, Vladimir; Stauffer, Frédéric; Garcia-Echeverria, Carlos; Giese, Bernd; Maira, Sauveur-Michel; Wymann,

- Matthias P.: „Targeting melanoma with dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors“ erschienen in *Molecular Cancer Research* Bd. 7 (2009), Nr. 4, S. 601–613
- Martelli, A. M.; Evangelisti, C.; Chappell, W.; Abrams, S. L.; Bäsecke, J.; Stivala, F.; Donia, M.; Fagone, P.; Nicoletti, F.; Libra, M.; Ruvolo, V.; Ruvolo, P.; Kempf, C. R.; Steelman, L. S.; McCubrey, J. A.: „Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway“ erschienen in *Leukemia* Bd. 25 (2011), Nr. 7, S. 1064–1079
- Massagué, Joan: „G1 cell-cycle control and cancer“ erschienen in *Nature* Bd. 432 (2004), Nr. 7015, S. 298–306
- Masuda, Mitsuhiro; Shimomura, Manami; Kobayashi, Ken; Kojima, Shuji; Nakatsura, Tetsuya: „Growth inhibition by NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, in hepatocellular carcinoma cell lines“ erschienen in *Oncology Reports* (2011)
- Mattmann, Margrith E.; Stoops, Sydney L.; Lindsley, Craig W.: „Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape“ erschienen in *Expert Opinion on Therapeutic Patents* Bd. 21 (2011), Nr. 9, S. 1309–1338
- Meijer, Tineke W. H.; Kaanders, Johannes H. A. M.; Span, Paul N.; Bussink, Johan: „Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 18 (2012), Nr. 20, S. 5585–5594
- Mendoza, Michelle C.; Er, E. Emrah; Blenis, John: „The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation“ erschienen in *Trends in Biochemical Sciences* Bd. 36 (2011), Nr. 6, S. 320–328
- Migliardi, Giorgia; Sassi, Francesco; Torti, Davide; Galimi, Francesco; Zanella, Eugenia R.; Buscarino, Michela; Ribero, Dario; Muratore, Andrea; Massucco, Paolo; Pisacane, Alberto; Risio, Mauro; Capussotti, Lorenzo; Marsoni, Silvia; Di Nicolantonio, Federica; Bardelli, Alberto; Comoglio, Paolo M.; Trusolino, Livio; Bertotti, Andrea: „Inhibition of MEK and PI3K/mTOR suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in patient-derived xenografts of RAS-mutant colorectal carcinomas“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 18 (2012), Nr. 9, S. 2515–2525
- Mizushima, Noboru; Yoshimori, Tamotsu: „How to interpret LC3 immunoblotting“ erschienen in *Autophagy* Bd. 3 (2007), Nr. 6, S. 542–545
- Mukherjee, Bipasha; Tomimatsu, Nozomi; Amancherla, Kaushik; Camacho, Cristel V.; Pichamoorthy, Nandini; Burma, Sandeep: „The Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Is a Potent Inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-Mediated DNA Damage Responses“ erschienen in *Neoplasia* Bd. 14 (2012), Nr. 1, S. 34–43
- Munro, T. R.: „The Relative Radiosensitivity of the Nucleus and Cytoplasm of Chinese Hamster Fibroblasts“ erschienen in *Radiation Research* Bd. 42 (1970), Nr. 3, S. 451–470
- Munshi, Anupama; Ramesh, Rajagopal: „Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response“ erschienen in *Genes & Cancer* Bd. 4 (2013), Nr. 9-10, S. 401–408
- Muslimovic, Aida; Ismail, Ismail Hassan; Gao, Yue; Hammarsten, Ola: „An optimized method for measurement of gamma-H2AX in blood mononuclear and cultured cells“ erschienen in *Nature Protocols* Bd. 3 (2008), Nr. 7, S. 1187–1193
- Nakashio, A.; Fujita, N.; Rokudai, S.; Sato, S.; Tsuruo, T.: „Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 60 (2000), Nr. 18, S. 5303–5309
- Nyati, Mukesh K.; Morgan, Meredith A.; Feng, Felix Y.; Lawrence, Theodore S.: „Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 6 (2006), Nr. 11, S. 876–885

- Paez, Juan; Sellers, William R.: „PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling“ erschienen in *Cancer Treatment and Research* Bd. 115 (2003), S. 145–167
- Pajonk, Frank; Vlashi, Erina; McBride, William H.: „Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited“ erschienen in *Stem Cells* Bd. 28 (2010), Nr. 4, S. 639–648
- Pawlik, Timothy M; Keyomarsi, Khandan: „Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy“ erschienen in *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* Bd. 59 (2004), Nr. 4, S. 928–942
- Pérez-Losada, Jesús; Sánchez-Martín, Manuel; Pérez-Caro, María; Pérez-Mancera, Pedro A.; Sánchez-García, Isidro: „The radioresistance biological function of the SCF/kit signaling pathway is mediated by the zinc-finger transcription factor Slug“ erschienen in *Oncogene* Bd. 22 (2003), Nr. 27, S. 4205–4211
- Peter, Marcus E.: „Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis“ erschienen in *Nature* Bd. 471 (2011), Nr. 7338, S. 310–312
- Phin, Sopheap; Moore, Mathew W.; Cotter, Philip D.: „Genomic Rearrangements of PTEN in Prostate Cancer“ erschienen in *Frontiers in Oncology* Bd. 3 (2013), S. 240
- Pigott, K. H.; Hill, S. A.; Chaplin, D. J.; Saunders, M. I.: „Microregional fluctuations in perfusion within human tumours detected using laser Doppler flowmetry“ erschienen in *Radiotherapy and Oncology* Bd. 40 (1996), Nr. 1, S. 45–50
- Podhorecka, Monika; Skladanowski, Andrzej; Bozko, Przemyslaw: „H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy“ erschienen in *Journal of Nucleic Acids* Bd. 2010 (2010), S. e920161
- Potiron, Vincent A.; Abderrhamani, Rym; Giang, Eric; Chiavassa, Sophie; Di Tomaso, Emmanuelle; Maira, Sauveur-Michel; Paris, François; Supiot, Stéphane: „Radiosensitization of prostate cancer cells by the dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 under normoxic and hypoxic conditions“ erschienen in *Radiotherapy and Oncology* Bd. 106 (2013), Nr. 1, S. 138–146
- Prevo, Remko; Deutsch, Eric; Sampson, Oliver; Diplexcito, Julie; Cengel, Keith; Harper, Jane; O'Neill, Peter; McKenna, W. Gillies; Patel, Sonal; Bernhard, Eric J.: „Class I PI3 kinase inhibition by the pyridinylfuranopyrimidine inhibitor PI-103 enhances tumor radiosensitivity“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 68 (2008), Nr. 14, S. 5915–5923
- Qu, Yiqing; Wu, Xiuxiu; Yin, Yunhong; Yang, Yan; Ma, Dedong; Li, Hao: „Antitumor activity of selective MEK1/2 inhibitor AZD6244 in combination with PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 in gefitinib-resistant NSCLC xenograft models“ erschienen in *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* Bd. 33 (2014), S. 52
- Renshaw, Jane; Taylor, Kathryn R.; Bishop, Ryan; Valenti, Melanie; Brandon, Alexis De Haven; Gowan, Sharon; Eccles, Suzanne A.; Ruddle, Ruth R.; Johnson, Louise D.; Raynaud, Florence I.; Selfe, Joanna L.; Thway, Khin; Pietsch, Torsten; Pearson, Andrew D.; Shipley, Janet: „Dual Blockade of the PI3K/AKT/mTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) Pathways Synergistically Inhibits Rhabdomyosarcoma Cell Growth In Vitro and In Vivo“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 19 (2013), Nr. 21, S. 5940–5951
- Rexer, Brent N.; Ghosh, Ritwik; Arteaga, Carlos L.: „Inhibition of PI3K and MEK: it is all about combinations and biomarkers“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 15 (2009), Nr. 14, S. 4518–4520
- Rieder, Conly L.; Maiato, Helder: „Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint“ erschienen in *Developmental Cell* Bd. 7 (2004), Nr. 5, S. 637–651
- Rinehart, John; Adjei, Alex A.; LoRusso, Patricia M.; Waterhouse, David; Hecht, J. Randolph; Natale, Ronald B.; Hamid, Oday; Varterasian, Mary; Asbury, Peggy; Kaldjian, Eric P.; Gulyas, Stephen; Mitchell, David Y.; Herrera, Roman; Sebolt-Leopold, Judith S.; Meyer, Mark B.: „Multicenter Phase II Study

of the Oral MEK Inhibitor, CI-1040, in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung, Breast, Colon, and Pancreatic Cancer“ erschienen in *Journal of Clinical Oncology* Bd. 22 (2004), Nr. 22, S. 4456–4462

Riss, Terry L.; Moravec, Richard A.; Niles, Andrew L.; Benink, Helene A.; Worzella, Tracy J.; Minor, Lisa: „Assay Guidance Manual - Cell Viability Assay“, Verlag: *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*, Bethesda, MD, USA, 2004

Roberts, Patrick J.; Usary, Jerry E.; Darr, David B.; Dillon, Patrick M.; Pfefferle, Adam D.; Whittle, Martin C.; Duncan, James S.; Johnson, Soren M.; Combest, Austin J.; Jin, Jian; Zamboni, William C.; Johnson, Gary L.; Perou, Charles M.; Sharpless, Norman E.: „Combined PI3K/mTOR and MEK inhibition provides broad antitumor activity in faithful murine cancer models“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 18 (2012), Nr. 19, S. 5290–5303

Rodrik-Outmezguine, Vanessa S.; Chandarlapaty, Sarat; Pagano, Nen C.; Poulikakos, Poulikos I.; Scaltriti, Maurizio; Moskatel, Elizabeth; Baselga, José; Guichard, Sylvie; Rosen, Neal: „mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling“ erschienen in *Cancer Discovery* Bd. 1 (2011), Nr. 3, S. 248–259

Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M.: „DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139“ erschienen in *The Journal of Biological Chemistry* Bd. 273 (1998), Nr. 10, S. 5858–5868

Röntgen, Wilhelm Conrad: „Ueber eine neue Art von Strahlen“. 2. Aufl., Verlag: *Stahel*, Würzburg, 1896

Roper, Jatin; Richardson, Michael P.; Wang, Wei Vivian; Richard, Larissa Georgeon; Chen, Wei; Coffee, Erin M.; Sinnamon, Mark J.; Lee, Lydia; Chen, Peng-Chieh; Bronson, Roderick T.; Martin, Eric S.; Hung, Kenneth E.: „The Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Induces Tumor Regression in a Genetically Engineered Mouse Model of PIK3CA Wild-Type Colorectal Cancer“ erschienen in *PLoS One* Bd. 6 (2011), Nr. 9, S. e25132

Roy, Srirupa; Debnath, Jayanta: „Autophagy and Tumorigenesis“ erschienen in *Seminars in Immunopathology* Bd. 32 (2010), Nr. 4, S. 383–396

Ruan, Lin; Wang, Guo-Liang; Yi, Hong; Chen, Yan; Tang, Can-E.; Zhang, Peng-Fei; Li, Mao-Yu; Li, Cui; Peng, Fang; Li, Jian-Ling; Chen, Zhu-Chu; Xiao, Zhi-Qiang: „Raf kinase inhibitor protein correlates with sensitivity of nasopharyngeal carcinoma to radiotherapy“ erschienen in *Journal of Cellular Biochemistry* Bd. 110 (2010), Nr. 4, S. 975–981

Ruvinsky, Igor; Meyuhas, Oded: „Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size“ erschienen in *Trends in Biochemical Sciences* Bd. 31 (2006), Nr. 6, S. 342–348

Sak, A.; Stueben, G.; Groneberg, M.; Böcker, W.; Stuschke, M.: „Targeting of Rad51-dependent homologous recombination: implications for the radiation sensitivity of human lung cancer cell lines“ erschienen in *British Journal of Cancer* Bd. 92 (2005), Nr. 6, S. 1089–1097

Sambade, Maria J.; Camp, J. Terese; Kimple, Randall J.; Sartor, Carolyn I.; Shields, Janiel M.: „Mechanism of lapatinib-mediated radiosensitization of breast cancer cells is primarily by inhibition of the Raf > MEK > ERK mitogen-activated protein kinase cascade and radiosensitization of lapatinib-resistant cells restored by direct inhibition of MEK“ erschienen in *Radiotherapy and Oncology* Bd. 93 (2009), Nr. 3, S. 639–644

Samuel, Temesgen; Weber, H Oliver; Funk, Jens Oliver: „Linking DNA damage to cell cycle checkpoints“ erschienen in *Cell Cycle* Bd. 1 (2002), Nr. 3, S. 162–168

Sansal, Isabelle; Sellers, William R.: „The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway“ erschienen in *Journal of Clinical Oncology* Bd. 22 (2004), Nr. 14, S. 2954–2963

Sansare, K.; Khanna, V.; Katjodkar, F.: „Early victims of X-rays: a tribute and current perception“ erschienen in *Dentomaxillofacial Radiology* Bd. 40 (2011), Nr. 2, S. 123–125

Santiskulvong, Chintda; Konecny, Gottfried E; Fekete, Mirela; Chen, Kuang-Yui Michael; Karam, Amer; Mulholland, David; Eng, Carol; Wu, Hong; Song, Min; Dorigo, Oliver: „Dual targeting of phosphoinositide 3-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach in human ovarian carcinoma“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 17 (2011), Nr. 8, S. 2373–2384

Schaeue, Dörthe; McBride, William H.: „Counteracting tumor radioresistance by targeting DNA repair“ erschienen in *Molecular Cancer Therapeutics* Bd. 4 (2005), Nr. 10, S. 1548–1550

Schulze, Waltraud X.; Deng, Lei; Mann, Matthias: „Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family“ erschienen in *Molecular Systems Biology* Bd. 1 (2005), S. 2005.0008

Schuurbiers, Olga C. J.; Kaanders, Johannes H. A. M.; van der Heijden, Henricus F. M.; Dekhuijzen, Richard P. N.; Oyen, Wim J. G.; Bussink, Johan: „The PI3-K/AKT-pathway and radiation resistance mechanisms in non-small cell lung cancer“ erschienen in *Journal of Thoracic Oncology* Bd. 4 (2009), Nr. 6, S. 761–767

Sebolt-Leopold, Judith S.; Dudley, David T.; Herrera, Roman; Becelaere, Keri Van; Wiland, Amy; Gowan, Richard C.; Teclé, Haile; Barrett, Stephen D.; Bridges, Alexander; Przybranowski, Sally; Leopold, W. R.; Saltiel, Alan R.: „Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo“ erschienen in *Nature Medicine* Bd. 5 (1999), Nr. 7, S. 810–816

Sebolt-Leopold, Judith S.; Herrera, Roman: „Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 4 (2004), Nr. 12, S. 937–947

Senra, Joana M.; Telfer, Brian A.; Cherry, Kim E.; McCrudden, Cian M.; Hirst, David G.; O'Connor, Mark J.; Wedge, Stephen R.; Stratford, Ian J.: „Inhibition of PARP-1 by olaparib (AZD2281) increases the radiosensitivity of a lung tumor xenograft“ erschienen in *Molecular Cancer Therapeutics* Bd. 10 (2011), Nr. 10, S. 1949–1958

Serra, Violeta; Markman, Ben; Scaltriti, Maurizio; Eichhorn, Pieter J. A.; Valero, Vanesa; Guzman, Marta; Botero, Maria Luisa; Llonch, Elisabeth; Atzori, Francesco; Di Cosimo, Serena; Maira, Sauveur-Michel; Garcia-Echeverria, Carlos; Parra, Josep Lluis; Arribas, Joaquin; Baselga, José: „NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 68 (2008), Nr. 19, S. 8022–8030

Shannon, Aoife M.; Telfer, Brian A.; Smith, Paul D.; Babur, Muhammed; Logie, Armelle; Wilkinson, Robert W.; Debray, Camille; Stratford, Ian J.; Williams, Kaye J.; Wedge, Stephen R.: „The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) enhances the radiation responsiveness of lung and colorectal tumor xenografts“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 15 (2009), Nr. 21, S. 6619–6629

Shiloh, Yosef: „ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 3 (2003), Nr. 3, S. 155–168

Shiloh, Yosef; Ziv, Yael: „The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more“ erschienen in *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Bd. 14 (2013), Nr. 4, S. 197–210

Shimura, Tsutomu; Kakuda, Satoshi; Ochiai, Yasushi; Kuwahara, Yoshikazu; Takai, Yoshihiro; Fukumoto, Manabu: „Targeting the AKT/GSK3 β /Cyclin D1/Cdk4 Survival Signaling Pathway for Eradication of Tumor Radioresistance Acquired by Fractionated Radiotherapy“ erschienen in *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* Bd. 80 (2011), Nr. 2, S. 540–548

Shortt, Jake; Martin, Benjamin P.; Newbold, Andrea; Hannan, Katherine M.; Devlin, Jennifer R.; Baker, Adele J.; Ralli, Rachael; Cullinane, Carleen; Schmitt, Clemens A.; Reimann, Maurice; Hall, Michael N.; Wall, Meaghan; Hannan, Ross D.; Pearson, Richard B.; McArthur, Grant A.; Johnstone, Ricky W.: „Combined inhibition of PI3K-related DNA damage response kinases and mTORC1 induces apoptosis in MYC-driven B-cell lymphomas“ erschienen in *Blood* Bd. 121 (2013), Nr. 15, S. 2964–2974

Skvortsova, Ira; Skvortsov, Sergej; Stasyk, Taras; Raju, Uma; Popper, Bela-Andre; Schiestl, Bernhard; von Guggenberg, Elisabeth; Neher, Andreas; Bonn, Guenther K.; Huber, Lukas A.; Lukas, Peter: „Intracellular signaling pathways regulating radioresistance of human prostate carcinoma cells“ erschienen in *Proteomics* Bd. 8 (2008), Nr. 21, S. 4521–4533

Stein, R. C.: „Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment“ erschienen in *Endocrine-Related Cancer* Bd. 8 (2001), Nr. 3, S. 237–248

Sturgill, Thomas W.; Hall, Michael N.: „Activating Mutations in TOR Are in Similar Structures As Oncogenic Mutations in PI3K α “ erschienen in *ACS Chemical Biology* Bd. 4 (2009), Nr. 12, S. 999–1015

Suk, Hyun; Hromas, Robert; Lee, Suk-Hee; Chen, C. (Hrsg.) „New Research Directions in DNA Repair - Emerging Features of DNA Double-Strand Break Repair in Humans“, Verlag: *InTech*, 2013 — ISBN 978-953-51-1114-6

Sulli, Gabriele; Di Micco, Raffaella; di Fagagna, Fabrizio d'Adda: „Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 12 (2012), Nr. 10, S. 709–720

Tanida, Isei; Ueno, Takashi; Kominami, Eiki: „LC3 and Autophagy“ erschienen in *Methods in Molecular Biology* Bd. 445 (2008), S. 77–88

Toledo, Luis I.; Murga, Matilde; Zur, Rafal; Soria, Rebeca; Rodriguez, Antonio; Martinez, Sonia; Oyarzabal, Julen; Pastor, Joaquin; Bischoff, James R.; Fernandez-Capetillo, Oscar: „A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations“ erschienen in *Nature Structural & Molecular Biology* Bd. 18 (2011), Nr. 6, S. 721–727

Trédan, Olivier; Galmarini, Carlos M.; Patel, Krupa; Tannock, Ian F.: „Drug resistance and the solid tumor microenvironment“ erschienen in *Journal of the National Cancer Institute* Bd. 99 (2007), Nr. 19, S. 1441–1454

Urano, Muneyasu; Li, Gloria C.; He, Fuqiu; Minami, Akiko; Burgman, Paul; Ling, C. Clifton: „The effect of DN (dominant-negative) Ku70 and reoxygenation on hypoxia cell-kill: evidence of hypoxia-induced potentially lethal damage“ erschienen in *International Journal of Radiation Biology* Bd. 88 (2012), Nr. 7, S. 515–522

Valentino, Joseph D.; Li, Jing; Zaytseva, Yekaterina Y.; Mustain, W. Conan; Elliott, Victoria A.; Kim, Ji Tae; Harris, Jennifer W.; Campbell, Katherine; Weiss, Heidi; Wang, Chi; Song, Jun; Anthony, Lowell; Townsend, Courtney M.; Evers, B. Mark: „Cotargeting the PI3K and RAS pathways for the treatment of neuroendocrine tumors“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 20 (2014), Nr. 5, S. 1212–1222

Vaupel, Peter: „Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology“ erschienen in *Seminars in Radiation Oncology, Tumor Physiology*. Bd. 14 (2004), Nr. 3, S. 198–206

Vaupel, Peter; Schlenger, Karlheinz; Knoop, Claudia; Höckel, Michael: „Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements“ erschienen in *Cancer Research* Bd. 51 (1991), Nr. 12, S. 3316–3322

Vermeulen, Katrien; Van Bockstaele, Dirk R.; Berneman, Zwi N.: „The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer“ erschienen in *Cell Proliferation* Bd. 36 (2003), Nr. 3, S. 131–149

Vivanco, Igor; Sawyers, Charles L.: „The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 2 (2002), Nr. 7, S. 489–501

Wang, Yi; Ohh, Michael: „Oxygen-mediated endocytosis in cancer“ erschienen in *Journal of Cellular and Molecular Medicine* Bd. 14 (2010), Nr. 3, S. 496–503

Wan, X.; Harkavy, B.; Shen, N.; Grohar, P.; Helman, L. J.: „Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism“ erschienen in *Oncogene* Bd. 26 (2006), Nr. 13, S. 1932–1940

Ward, Carol; Langdon, Simon P.; Mullen, Peter; Harris, Adrian L.; Harrison, David J.; Supuran, Claudiu T.; Kunkler, Ian H.: „New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer“ erschienen in *Cancer Treatment Reviews* Bd. 39 (2013), Nr. 2, S. 171–179

Watson, Adrienne L.; Anderson, Leah K.; Greeley, Andrew D.; Keng, Vincent W.; Rahrmann, Eric P.; Halfond, Amanda L.; Powell, Natasha M.; Collins, Margaret H.; Rizvi, Tilat; Moertel, Christopher L.; Ratner, Nancy; Largaespada, David A.: „Co-targeting the MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in two genetically engineered mouse models of schwann cell tumors reduces tumor grade and multiplicity“ erschienen in *Oncotarget* Bd. 5 (2014), Nr. 6, S. 1502–1514

Weaver, Beth A. A.; Cleveland, Don W.: „Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death“ erschienen in *Cancer Cell* Bd. 8 (2005), Nr. 1, S. 7–12

Weischedel, U.; Wieland, C.: „Combination treatment in radiotherapy“ erschienen in *Röntgen-Blätter* Bd. 42 (1989), Nr. 1, S. 39–46

Williams, Terence M; Flecha, Athena R.; Keller, Paul; Ram, Ashwin; Karnak, David; Galbán, Stefanie; Galbán, Craig J.; Ross, Brian D; Lawrence, Theodore S.; Rehemtulla, Alnawaz; Sebolt-Leopold, Judith: „Cotargeting MAPK and PI3K signaling with concurrent radiotherapy as a strategy for the treatment of pancreatic cancer“ erschienen in *Molecular Cancer Therapeutics* Bd. 11 (2012), Nr. 5, S. 1193–1202

Wilson, William R; Hay, Michael P.: „Targeting hypoxia in cancer therapy“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 11 (2011), Nr. 6, S. 393–410

Wu, Yadi; Zhou, Binhua P.: „Kinases meet at TSC“ erschienen in *Cell Research* Bd. 17 (2007), Nr. 12, S. 971–973

Yang, Wanjuan; Soares, Jorge; Greninger, Patricia; Edelman, Elena J.; Lightfoot, Howard; Forbes, Simon; Bindal, Nidhi; Beare, Dave; Smith, James A.; Thompson, I. Richard; Ramaswamy, Sridhar; Futreal, P. Andrew; Haber, Daniel A.; Stratton, Michael R.; Benes, Cyril; McDermott, Ultan; Garnett, Mathew J.: „Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells“ erschienen in *Nucleic Acids Research* Bd. 41 (2013), S. 955–961

Yang, Zhineng J.; Chee, Cheng E.; Huang, Shengbing; Sinicropo, Frank A.: „The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications“ erschienen in *Molecular Cancer Therapeutics* Bd. 10 (2011), Nr. 9, S. 1533–1541

Yeh, Tammie C.; Marsh, Vivienne; Bernat, Bryan A.; Ballard, Josh; Colwell, Heidi; Evans, Ron J.; Parry, Janet; Smith, Darin; Brandhuber, Barbara J.; Gross, Stefan; Marlow, Allison; Hurley, Brian; Lyssikatos, Joe; Lee, Patrice A.; Winkler, James D.; Koch, Kevin; Wallace, Eli: „Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor“ erschienen in *Clinical Cancer Research* Bd. 13 (2007), Nr. 5, S. 1576–1583

Zhang, Jianming; Yang, Priscilla L.; Gray, Nathanael S.: „Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors“ erschienen in *Nature Reviews Cancer* Bd. 9 (2009), Nr. 1, S. 28–39

Zhang, Tao; Cui, Guang-Bin; Zhang, Jian; Zhang, Feng; Zhou, Yong-An; Jiang, Tao; Li, Xiao-Fei: „Inhibition of PI3 kinases enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to ionizing radiation“ erschienen in *Oncology Reports* Bd. 24 (2010), Nr. 6, S. 1683–1689

Zhivotovsky, Boris; Kroemer, Guido: „Apoptosis and genomic instability“ erschienen in *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Bd. 5 (2004), Nr. 9, S. 752–762

Zhuang, Wenzhuo; Qin, Zhenghong; Liang, Zhongqin: „The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy“ erschienen in *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* Bd. 41 (2009), Nr. 5, S. 341–351

Zhu, Wenjie; Fu, Weijiang; Hu, Likuan: „NVP-BEZ235, Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor, Prominently Enhances Radiosensitivity of Prostate Cancer Cell Line PC-3“ erschienen in *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* (2013)

Internetseite: „An Introduction to Reactive Oxygen Species - Measurement of ROS in Cells“ URL: <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html> abgerufen am 2015-02-06

Internetseite: „COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer“ URL: <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/> abgerufen am 2015-01-25

Internetseite: „Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012“ URL: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> abgerufen am 2014-12-13

Internetseite: „IARC TP53 Database“ URL: <http://p53.iarc.fr/> abgerufen am 2014-11-29

Internetseite: „IGRhCellID - Integrated Genomic Resources of human Cell lines for Identification“ URL: <http://igrcid.ibms.sinica.edu.tw/cgi-bin/index.cgi> abgerufen am 2015-01-25

Internetseite: „Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum“ URL: <http://www.krebsinformationsdienst.de/> abgerufen am 2014-12-21

Internetseite: „MAPK Inhibitors“ URL: http://www.selleckchem.com/pharmacological_MAPK.html abgerufen am 2014-11-30

Internetseite: „PI3K/Akt/mTOR Inhibitors“ URL: http://www.selleckchem.com/pharmacological_PI3K_Akt_mTOR.html abgerufen am 2014-11-30

Internetseite: „Search of: BEZ235 - List Results - ClinicalTrials.gov“ URL: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=BEZ235&Search=Search> abgerufen am 2014-07-20

Internetseite: „Search of: Selumetinib - List Results - ClinicalTrials.gov“ URL: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=selumetinib&Search=Search> abgerufen am 2014-05-14

Internetseite: „Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis)“ URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> abgerufen am 2014-12-13

Internetseite: „Zentrum für Krebsregisterdaten“ URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe1_node.html abgerufen am 2014-12-13

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1 Zelluläre Antwort auf DNS-Schäden (Shiloh, 2003)	3
Abbildung 1-2 Reparaturmechanismen von DNS-Doppelstrangbrüchen (Lopez-Contreras & Fernandez-Capetillo, 2012).....	5
Abbildung 1-3 Checkpoints im Zellzyklus nach DNS-Schäden (Lapenna & Giordano, 2009)	6
Abbildung 1-4 Mechanismen des Zelltods nach Bestrahlung (Lauber u. a., 2012).....	8
Abbildung 1-5 Autophagiemechanismus (Herzog u. a., 2012)	9
Abbildung 1-6 Schematische Darstellung der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade (Holmes, 2011).....	12
Abbildung 1-7 Schematische Darstellung der MAPK/Erk Signalkaskade (Chin, 2003).....	15
Abbildung 1-8 Tumormikroumgebung in Abhängigkeit der Distanz zu Blutgefäßen (Trédan u. a., 2007)	17
Abbildung 1-9 Duale Inhibition onkogener Signalkaskaden (Rexer u. a., 2009)	20
Abbildung 1-10 Putatives Interaktionsnetzwerk der MAPK und der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskaden.....	21
Abbildung 3-1 Strukturformeln NVP-BEZ235 und AZD6244 (Maira u. a., 2008; Yeh u. a., 2007)	29
Abbildung 3-2 Behandlungsschemata der Versuchsteile	39
Abbildung 3-3 ROS Nachweis über H ₂ DCFDA (Internetseite: „An Introduction to Reactive Oxygen Species - Measurement of ROS in Cells“).....	45
Abbildung 4-1 ATP Assay in Glioblastomzelllinien.....	48
Abbildung 4-2 Koloniebildungsfähigkeit von Glioblastomzelllinien in Abhängigkeit des Behandlungsschemas mit NVP-BEZ235	49
Abbildung 4-3 Western blot relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in DK-MG und U87-MG Zellen 30 min nach Bestrahlung	51
Abbildung 4-4 Western blot relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in DK-MG und U87-MG Zellen 24 und 48 h nach Bestrahlung	53
Abbildung 4-5 Western blot relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in GaMG und U373 Zellen 30 min nach Bestrahlung.....	54
Abbildung 4-6 Western blot relevanter Proteine des PI3K/Akt/mTOR Signalweges in GaMG und U373 Zellen 24 und 48 h nach Bestrahlung	55
Abbildung 4-7 Repräsentative durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose in GaMG Zellen	57
Abbildung 4-8 Mittelwerte apoptotischer Glioblastomzellen.....	58
Abbildung 4-9 Western blot des DNS-Reparaturproteins PARP sowie seiner gespaltenen Form	59
Abbildung 4-10 Repräsentative Verteilung des Histons γ H2AX in Glioblastomzellen	61
Abbildung 4-11 Mittelwerte der Verteilung des Histons γ H2AX in Glioblastomzellen	62
Abbildung 4-12 Repräsentative Expression von Rad51 in Glioblastomzellen	63
Abbildung 4-13 Repräsentative Zellzyklusverteilung in DK-MG Zellen	65
Abbildung 4-14 MTS Test von Brustkrebszelllinien.....	71
Abbildung 4-15 Koloniebildungstests unter verschiedener Sauerstoffkonzentrationen kultivierter Brustkrebszellen.....	72
Abbildung 4-16 HIF-1 α Western blot in Brustkrebszellen.....	73
Abbildung 4-17 Koloniebildungstest mit NVP-BEZ235 behandelten Brustkrebszelllinien unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen	74

Abbildung 4-18 Mittelwerte der Koloniebildungstests mit Brustkrebszelllinien unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	75
Abbildung 4-19 PI3K/Akt/mTOR Signalweg in Brustkrebszelllinien 30 min nach Bestrahlung	76
Abbildung 4-20 PI3K/Akt/mTOR Signalweg in Brustkrebszelllinien 24 h nach Bestrahlung.....	77
Abbildung 4-21 PI3K/Akt/mTOR Signalweg in Brustkrebszelllinien 48 h nach Bestrahlung.....	77
Abbildung 4-22 Apoptose und Autophagie in Brustkrebszelllinien nach NVP-BEZ235 Behandlung und Bestrahlung	79
Abbildung 4-23 Zweidimensionale repräsentative Verteilungen des Zellzyklus und der Phosphorylierung von H2AX in Brustkrebszelllinien.....	83
Abbildung 4-24 Mittelwerte der Zellzyklusverteilung in Brustkrebszelllinien	84
Abbildung 4-25 ROS Gehalt und DNS-Schäden in Brustkrebszelllinien.....	86
Abbildung 4-26 ATP Gehalt in A549 und SNB19 Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit AZD6244 und/oder NVP-BEZ235.....	88
Abbildung 4-27 Koloniebildungsfähigkeit von SNB19 und A549 Zellen nach Inhibition der MAPK- und/oder der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade.....	90
Abbildung 4-28 Western blot Ergebnisse wichtiger Proteine der MAPK Signalkaskade in SNB19 und A549 Zellen.....	93
Abbildung 4-29 Western blot Ergebnisse wichtiger Proteine der PI3K/Akt/mTOR Signalkaskade in SNB19 und A549 Zellen.....	96
Abbildung 4-30 Repräsentative Zellzyklusverteilung in SNB19 und A549 Zellen	100
Abbildung 4-31 Mittelwerte der Verteilungen der Zellzyklusphasen nach Behandlung mit AZD6244 und/oder NVP-BEZ235.....	101
Abbildung 4-32 Western blot Ergebnisse zellzyklusrelevanter Proteine in SNB19 und A549 Zellen nach Behandlung mit AZD6244 und/oder NVP-BEZ235 und Bestrahlung.....	106
Abbildung 4-33 Repräsentative Verteilung des Histons γ H2AX in SNB19 und A549 Zellen.....	112
Abbildung 4-34 Mittlere Verteilung des Histons γ H2AX in SNB19 und A549 Zellen	116
Abbildung 4-35 Anteil hypodiploider Zellen in SNB19 und A549 Zellen nach Behandlung mit AZD6244 und NVP BEZ235 sowie Bestrahlung.....	117
Abbildung 4-36 Western blot relevanter Proteine der Apoptose und Autophagie in SNB19 und A549 Zellen nach Behandlung mit AZD6244 und NVP-BEZ235 sowie Bestrahlung	119
Abbildung 5-1 Zelluläre Antwort der Glioblastomzelllinien auf die beiden Behandlungsschemata.....	122
Abbildung 5-2 Signalkaskaden in den Glioblastomzelllinien nach NVP-BEZ235 Behandlung	123
Abbildung 5-3 Effekte von NVP-BEZ235 in MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	128
Abbildung 5-4 Schematische Darstellung der radiosensibilisierenden Effekte von NVP-BEZ235 in Brustkrebszellen	129
Abbildung 5-5 Effekte von AZD6244, NVP BEZ235 sowie einer Kombination beider Inhibitoren in SNB19 und A549 Zellen.....	135

11 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3-1 Zelllinien	27
Tabelle 3-2 Zellkulturmedien	28
Tabelle 3-3 Primärantikörper	29
Tabelle 3-4 Sekundärantikörper	31
Tabelle 3-5 10-fach PBS	31
Tabelle 3-6 RIPA Puffer	32
Tabelle 3-7 Kernextraktionspuffer	32
Tabelle 3-8 Proteaseinhibitoren	33
Tabelle 3-9 Materialien Western blot	34
Tabelle 3-10 Puffer Proteindetektion	35
Tabelle 3-11 Puffer und Reagenzien FACS	35
Tabelle 3-12 Laborgeräte	36
Tabelle 4-1 Mittelwerte der PE, SF ₂ , D ₁₀ und I ₁₀ in Glioblastomzelllinien	50
Tabelle 4-2 Zellzyklusphasenverteilung 30 min nach Bestrahlung in den untersuchten Glioblastomzelllinien	66
Tabelle 4-3 Zellzyklusphasenverteilung 24 h nach Bestrahlung in den untersuchten Glioblastomzelllinien	67
Tabelle 4-4 Zellzyklusphasenverteilung 48 h nach Bestrahlung in den untersuchten Glioblastomzelllinien	68
Tabelle 4-5 Mittelwerte der PE, SF ₂ , D ₁₀ und I ₁₀ in SNB19 und A549 Zellen	91
Tabelle 4-6 Effekte der Behandlung mit AZD6244, NVP-BEZ235 und Bestrahlung auf den Zellzyklus	102

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei alle bedanken, welche bei der Erstellung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Großer Dank geht an den Direktor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Würzburg Herrn Prof. Dr. Michael Flentje der dieses Dissertationsprojekt überhaupt erst ermöglicht hat.

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Tcholpon Djuzenova danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die vielen großen und kleinen Hilfestellungen, für die fachlichen Diskussionen sowie für die Publikation in Translational Oncology. Ihr Engagement, ihre Kompetenz und ihre Erfahrung haben in erheblichem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Vladimir Soukhoroukov möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit, sowie für die Unterstützung bei der Publikation unserer Ergebnisse bedanken.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Ulrike Kämmerer und Herrn Dr. Bülent Polat für die Hilfe bei der Publikation unserer Ergebnisse.

Bei den Damen und Herren Rico Brendtke, Emre Cörek, Ines Elsner, Dorothea Graus, Nadine Günther, Svetlana Hilz, Astrid Katzer und Paul Lutyj bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei den Versuchen und im Labor, sowie für in dieser Arbeit verwendete Daten. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Gisela Wohlleben und Frau Susanne Hartmann, sowie allen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Strahlenklinik für das angenehme Arbeitsklima, die aufmunternden Worte, sowie für die kleinen Tipps und Tricks die das Laborleben leichter machten.

Herrn Prof. Dr. Horst Zitzelsberger, meiner Familie und meinen Freunden danke ich ganz herzlich für die Korrektur- und Verbesserungsvorschläge, sowie für die Unterstützung und Ermunterungen in den letzten Monaten und Jahren. Ohne euch wäre diese Arbeit niemals entstanden.

Danke

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Sebastian Kuger
Geburtstag und –ort: 29. März 1984 in Aschaffenburg
Anschrift: Balanstr. 81, 81539 München
E-Mail Adresse: Sebastian.Kuger@gmail.com

Berufserfahrung

Seit 07/2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Helmholtz-Zentrum für Gesundheit und Umwelt München
02/2011-06/2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Würzburg
07/2004-03/2005 Zivildienst in der Gemeinde Laufach

Studium

10/2005-12/2010 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians Universität Würzburg (Abschluss: Diplom Biologe)
08/2008-05/2009 Akademisches Auslandsjahr an der „State University of Texas at Austin“

Würzburg, 8. Oktober 2015

Sebastian Kuger

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen

Kuger S., Flentje M. and Djuzenova C. S.; Simultaneous perturbation of the MAPK/Erk and the PI3K/mTOR pathways does not lead to increased radiosensitization. Accepted for publication in *Radiation Oncology* 2015

Kuger S., Cörek E., Polat B., Kämmerer U., Flentje M. and Djuzenova C. S.; Novel PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BE235 Radiosensitizes Breast Cancer Cell Lines under Normoxic and Hypoxic Conditions. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 2014 Mar 16;8 39-49

Kuger S., Graus D., Brendtke R., Günther N., Katzer A., Lutyj P., Polat B., Chatterjee M., Sukhorukov V. L., Flentje M. and Djuzenova C. S.; Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BE235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. *Translational Oncology* Apr 2013; 6(2): 169–179

Wohlleben G., Sherzad A., Güttler A., Vordermark D., Kuger S., Flentje M. and Polat B.; Influence of hypoxia and irradiation on osteopontin expression in head and neck cancer and glioblastoma cell lines. *Radiation Oncology* 2015 Aug 12;10:167

Hartmann S., Günther N., Biehl M., Katzer A., Kuger S., Worschech E., Sukhorukov V. L., Krohne G., Zimmermann H., Flentje M., Djuzenova C. S.; Hsp90 inhibition by NVP-AUY922 and NVP-BEP800 decreases migration and invasion of irradiated normoxic and hypoxic tumor cell lines. *Cancer Letters* 2013 May 1;331(2):200-10

Djuzenova C. S., Blassl C., Roloff K., Kuger S., Katzer A., Niewidok N., Günther N., Polat B., Sukhorukov V. L. and Flentje M.; Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 enhances radiation sensitivity of tumor cell lines under hypoxia. *Cancer Biology & Therapy* 2012 Apr;13(6):425-34

Poster und Vorträge

Kuger S. et al. The influence of FancA overexpression on radioresistance in oral keratinocytes and HNSCC cells. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO), 25.-28.06.2015 Hamburg, Deutschland; *Strahlentherapie und Onkologie* Juni 2015, Band 191, Ausgabe 1 Supplement Seite 90

Kuger S. et al. Drug irradiation schedule is decisive for radiosensitization by the novel dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO), 9.-12.05.2013 Berlin, Deutschland; *Strahlentherapie und Onkologie* Mai 2013, Band 189, Seite 67 (ausgezeichnet mit dem ELEKTA Posterpreis)

Kuger S. et al. Hsp90 inhibition with NVP-AUY922 protracts tumor growth and prolongs median survival of xenograft tumor bearing mice after radiation. 39. Jahrestagung der European Radiation Research Society (ERRS), 15-19.10.2012 Vietri sul Mare, Italien (ausgezeichnet mit dem ERRS Reisestipendium und dem DAAD Kongressreisestipendium)

Kuger S. et al. Novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 sensitizes human tumor xenografts to radiation. 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO), 7.-10.06.2012 Wiesbaden, Deutschland; *Strahlentherapie und Onkologie* Juni 2012 Band 188, Seite 117

EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Name, Vorname: Kuger, Sebastian
Straße: Balanstr. 81
PLZ und Ort: 81539 München
Tel.: 0176/84002525
E-Mail: Sebastian.Kuger@gmail.com

Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „**Radiosensibilisierung humaner Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten durch den dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP BEZ235 alleine oder in Kombination mit dem MEK-Inhibitor AZD6244: Einfluss des Behandlungsschemas und der Hypoxie**“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Radiosensibilisierung humaner Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten durch den dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP BEZ235 alleine oder in Kombination mit dem MEK-Inhibitor AZD6244: Einfluss des Behandlungsschemas und der Hypoxie**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 8. Oktober 2015

Sebastian Kuger