

**Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. M. Flentje**

**Modulation der Strahlensensibilität mittels alleiniger sowie kombinierter
PI3K/mTOR-Inhibierung im Glioblastommodell: die Rolle des *PTENs***

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der**

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Paul Lutyj

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2019



Referentin: Prof. Dr. Tcholpon Djuzenova
Korreferent: Prof. Dr. Helga Stopper
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2020

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung in die Strahlentherapie	4
1.2	Einführung in die Strahlenphysik	4
1.2.1	Wechselwirkung zwischen Photonenstrahlung und Materie	5
1.3	Einführung in die Strahlenbiologie	6
1.3.1	Direkte und indirekte Strahlenwirkung	6
1.3.2	DNS-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur	7
1.3.3	Zellzyklus	10
1.3.4	Apoptose	11
1.3.5	Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg	12
1.3.6	Kinaseinhibitoren	14
2	Material & Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Zelllinien	16
2.1.2	Geräte	16
2.1.3	Substanzen	17
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellkultur	22
2.2.2	Zellbehandlung	23
2.2.3	ATP-Assay	23
2.2.4	Koloniebildungstest	25
2.2.5	Durchflusszytometrie	27
2.2.6	Western Blot	28
3	Ergebnisse	34
3.1	Auswirkung der PI3K/mTOR-Inhibition auf die Zellproliferation	34
3.2	Auswirkungen der PI3K/mTOR-Inhibition auf das Zellüberleben nach Radiatio	37
3.3	Einfluss der PI3K/mTOR-Inhibition auf den DNS-Schaden	41
3.4	Analyse des Proteinexpressionsmusters nach PI3K/mTOR Inhibition und Bestrahlung	44
3.4.1	Expression von PI3Kp85 und PI3Kp110 α Proteinen	45
3.4.2	Expression vom PTEN Protein	45
3.4.3	Expression von mTOR und p-mTOR Proteinen	46
3.4.4	Expression von S6, p-S6 und p-4E-BP1 Proteinen	48
3.4.5	Expression von Bcl-xL und Caspase 3 Proteinen	51
3.5	Einfluss einer PI3K/mTOR-Inhibition sowie einer Bestrahlung auf den Zellzyklus	53
3.5.1	Zellzyklusverteilung 30 Minuten nach Bestrahlung	54
3.5.2	Zellzyklusverteilung 24 Stunden nach Bestrahlung	55
3.5.3	Zellzyklusverteilung 48 Stunden nach Bestrahlung	56
3.5.4	Zusammenfassung der Zellzyklusveränderungen nach einer PI3K/mTOR-Inhibition und Bestrahlung	59
3.6	Einfluss einer PI3K/mTOR-Inhibition sowie einer Bestrahlung auf die Induktion der Apoptose gemessen mittels Sub-G1-Fraktion	59
4	Diskussion	64
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis	74
6.1	Literaturverzeichnis	74
6.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	78

7	Abschlussarbeiten	79
8	Vollständige Publikationsliste	80
8.1	veröffentlichte Publikationen, die ein Peer-Review-Verfahren durchlaufen sind	80
8.2	wissenschaftliche Posterpräsentationen	80
8.3	weitere wissenschaftliche Arbeiten	80

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	Eukaryotische-Translationsinitiationsfaktor-4E-Bindungsprotein-1
AKT	Proteinkinase B
Apaf-1	Apoptotischer Proteaseaktivierungsfaktor 1
ATM	Ataxia-teleangiectatica-mutiert
ATP	Adenosintriphosphat, Adenosintriphosphat
Bcl	B-Zell-Lymphom 2
Bcl-xL	B-Zell-Lymphom-extra-large
BSA	Bovines Serumalbumin
Caspase 8	Cysteinyl-Aspartat-spezifische-Protease 8
CDK	Cyclin abhängige Kinase
D ₁₀	Strahlendosis in Gy, die die Anzahl der überlebenden Kolonien auf 10% reduziert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Europäischen Arzneimittel-Agentur
FADD	Fas assoziiertes Protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G2	Gap2
HR	Homologe Rekombination
I ₁₀	Wachstumsinhibitionsfaktor
MEM	Minimum Essential Medium
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
M-Phase	Mitose-Phase
mTOR	mammalian-target-of rapamycin
mut	Mutiert
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,1% TWEEN®20
PE	Plattierungseffizienz
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
p-mTOR	phospho-mTOR
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RIPA-Puffer	Radioimmunopräzipitationsanalysen-Puffer
RNase	Ribonuklease
RPA	Replikationsprotein A
S	Synthese
S6	ribosomales Protein S6
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	surviving fraction
SF ₂	Überlebensfraktion nach 2 Gy

SIR	Silent information regulator
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	Tumornekrosefaktor assoziiertes Protein
TSC1/2	Tuberöse-Sklerose-1/2-Komplex
TWEEN®20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
wt	Wildtyp
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
γH2AX	An Serin139 phosphoryliertes H2AX

1 Einleitung

Die ersten Überlieferungen onkologischer Krankheitsbilder stammen aus dem 5. Jhd. v. Chr., festgehalten durch den griechischen Geschichtsschreiber Herodot.¹ Er berichtete über die Brustkrankung der Perserkönigin Atossa, die auf eine Krebserkrankung schließen lässt. 400 v.Chr. beschrieb Hippokrates ein hartes, panzerartiges Brustgeschwür, das einem Tier ähnelt, welches sich in ein Gewebe eingräbt. Er benannte es „karkinos“^{2,3} und legte damit den Grundstein der volkstümlichen Bezeichnung Krebs. Bis ins 19. Jhd. behielten onkologische Krankheitsbilder aufgrund der damals im Vergleich zu heutigen Zeiten niedrigen Lebenserwartung einen eher geringen zivilisatorischen Stellenwert. Ab Ende des 19. Jhd. drängte die Verbreitung von Impfungen und Antibiotika sowie die sich stetig verbessernden hygienischen Bedingungen Infektionskrankheiten als Todesursache zurück, sodass onkologische Erkrankungen immer weiter in den Vordergrund rückten. Ein Ausdruck hierfür war das im Jahre 1906 durch Vincent Czerny gegründete erste deutsche Institut für experimentelle Krebsforschung in Heidelberg.⁴ 2013/14 betrug die Inzidenz onkologischer Erkrankungen in Deutschland 480000 Neuerkrankungen/Jahr.⁵ Onkologische Erkrankungen sind somit mit weiterhin steigender Tendenz nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland.⁶

Die Entstehung einer onkologischen Erkrankung beruht überwiegend auf einem multifaktoriellen Geschehen. Äußere Faktoren, spontane Veränderungen auf Zellebene sowie erblich bedingte Dispositionen können eine gesunde Zelle zu einer malignen neoplastischen Zelle werden lassen. Dabei werden eine Reihe von Veränderungen durchlaufen: Die Erhöhung der Proliferation und Angiogenese, die Reprogrammierung des Energiemetabolismus, das Umgehen der Wachstumshemmung, der Apoptose und der Zerstörung durch das Immunsystem sowie die Ausbildung von Fähigkeiten zur Invasion und Metastasierung.⁷ Eine wichtige Rolle in der Onkogenese spielen intra- und extrazelluläre Signalwege. Diese dienen der Zelle dazu, äußere Reize zu empfangen und diese Informationen auf intrazellulärer Ebene zu übermitteln und zu regulieren. In Krebszellen sind Signalwege häufig gestört. Insbesondere spielt der Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)/Proteinkinase B(AKT)/mammalian-target-of-rapamycin(mTOR)-Signalwegs, kurz PI3K-Signalweg, eine entscheidende Rolle in der Entstehung

und der Wachstumsregulation unterschiedlichster Tumore.^{8,9} Eine Überaktivierung dieses Signalwegs führt zu einer Resistenz gegenüber einer Chemo- oder Strahlentherapie, indem die Apoptose verhindert wird.^{10,11} Einen modernen onkologischen Therapieansatz bilden Signaltransduktionshemmer. Sie haben aufgrund der geringen Molekülgröße vielversprechende pharmakologische Eigenschaften. Sie können sich unabhängig von Transportmechanismen in Krebszellen verteilen und mit Zielproteinen überaktivierter Signalwege (Tyrosinkinasen) interagieren. Zu der ersten Generation von Tyrosinkinaseinhibitoren, die Zielproteine innerhalb der PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs hemmen, gehören LY294002 (PI3K-Inhibitor) und Rapamycin (mTOR-Inhibitor). LY294002 ist ein kompetitiver Adenosintriphosphat(ATP)-Inhibitor und hemmt PI3K reversibel. Unvorteilhafte Pharmakodynamik, Kreuzreaktivität und Toxizität lassen keine weitere klinische Verbreitung zu. Ein weiteres Beispiel hierfür ist der mTOR-Inhibitor Rapamycin. Rapamycin, auch als Sirolimus bekannt, erlangte von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) die Zulassung zur Verhinderung der Organabstoßung nach Nierentransplantation. Des Weiteren erlangte die strukturell verwandte Substanz Everolimus seine klinische Wirksamkeit unter Beweis und erlangte durch die EMA die Zulassung zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzell-, des fortgeschrittenen Mammakarzinoms und unterschiedlicher neuroendokriner Tumore.¹² Es handelte sich hierbei um Tumorentitäten, bei denen die mTOR-Inhibition eine zentrale Rolle einzunehmen scheint. Bei vielen anderen Tumorarten hingegen zeigt Rapamycin nur eine moderate antitumorale Wirksamkeit und wird den Erwartungen nicht gerecht.

Als Ursachen für die häufig moderate Wirkung konnte eine kompensatorische Hochregulation anderer stimulierender Signalwege durch die mTOR-Blockade, ein sogenannter „negativer Feedback-Loop“, gezeigt werden.^{13,14} Mit dem Ziel, die Wirksamkeit der mTOR-Inhibition zu steigern, entwickelte das Novartis Institut für biomedizinische Forschung den Dualkinaseinhibitor NVP-BEZ235, der die gleichzeitige Inhibition der Tyrosinkinasen PI3K und mTOR innerhalb des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs ermöglicht.

Ein weiterer Aspekt, der zu einer Hochregulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs führt, ist der mutierte Tumorsuppressor Phosphatase und Tensin Homolog

(PTEN). Ein mutiertes *PTEN* ist häufig in Glioblastomen anzutreffen und verursacht die Überaktivierung des Signalwegs.¹⁵ Dabei ist die Rolle des PTENs bei der Entstehung der Chemo- und Radioresistenz der Glioblastome unklar.

Es stellt sich somit die Frage, ob der neuartige Dual-PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 in der Lage ist, in-vitro eine strahlensensibilisierende Wirkung am Glioblastommodell hervorzurufen, und inwieweit die Wirkung der Substanz vom *PTEN*-Mutationsstatus beeinflusst wird. Hierfür wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wie wirkt sich NVP-BEZ235, Rapamycin und LY294002 auf die Zellproliferation aus?
2. Besteht ein Einfluss von PI3K/mTOR-Inhibitoren auf die klonogene Überlebensfähigkeit der untersuchten Glioblastomzelllinien nach Bestrahlung?
3. In welchem Ausmaß werden Desoxyribonukleinsäure(DNS)-Doppelstrangbrüche als kennzeichnende Einheit des Strahlenschadens in Anwesenheit der PI3K/mTOR-Inhibitoren induziert und abgebaut?
4. Gibt es nach Bestrahlung und/oder Verwendung der von NVP-BEZ235, Rapamycin und LY294002 Veränderungen des Proteinexpressionsmusters innerhalb des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs?
5. Wie wirkt sich NVP-BEZ235, Rapamycin und LY294002 alleine und in Kombination mit einer Bestrahlung auf den Zellzyklus aus?
6. Führt die PI3K/mTOR-Inhibition in Kombination mit Bestrahlung zur Induktion einer Apoptose?

Hierfür wurden zwei humane Glioblastomzelllinien mit unterschiedlichem *PTEN*-Status für 24 Stunden entweder mit LY294002 (PI3K-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) oder NVP-BEZ235 (dualer PI3K/mTOR-Inhibitor) behandelt und anschließend bestrahlt (8 Gy). 30 Minuten, 24 Stunden und 48 Stunden nach Bestrahlung wurde die Expression diverser Proteine des PI3K-Wegs (u.a. PI3K, mTOR, p-mTOR, p-S6) sowie Apoptosemarker (Bcl-xL und Caspase 3) mittels Western Blot analysiert. Zusätzlich wurde die klonogene Überlebensfähigkeit anhand eines Koloniebildungstests bestimmt. Außerdem wurde mittels Durchflusszytometrie die Induktion und Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüchen (γ H2AX) sowie die Zellzyklusverteilung untersucht.

1.1 Einführung in die Strahlentherapie

Beim Experimentieren mit Elektronenstrahlröhren entdeckte der Würzburger Universitätsprofessor Wilhelm Conrad Röntgen im November 1895 „eine neue Art von Strahlen“, die er als X-Strahlung bezeichnete (angloamerikanisch: X-Ray; im deutschsprachigen Raum: Röntgenstrahlung).¹⁶ Die fortan nach seinem Namen benannte Strahlung legte den Grundstein für eine Vielzahl von neuen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten. Nach initialer Skepsis entwickelte sich in kürzester Zeit eine wahre Euphorie. Schon 1896 erfolgten zeitgleich in mehreren westlichen Ländern die ersten onkologischen Therapien,^{17,18} die den Grundstein der heutigen Strahlentherapie bilden. Neben der biologischen Wirksamkeit der neuartigen Strahlung zeigten sich parallel die ersten Nebenwirkungen, z.B. berichtete der Ingenieur O. Leppin 1896 über die durch Röntgenstrahlung verursachte Hautreaktion an seiner Hand. Der technologische Fortschritt im folgenden Jahrhundert führte neben der verbesserten Wirksamkeit auch zur Reduktion der Nebenwirkungen. Beispiele hierfür sind die Entwicklung des ersten Kreisbeschleunigers um 1940 durch D.W. Kerst oder die Einführung der fraktionierten Strahlentherapie durch H. Coutard im Jahre 1930.¹⁶

Die heutige Strahlentherapie unterscheidet zwischen der Brachy- und der Teletherapie. Die Brachytherapie gibt mit Hilfe umschlossener Radionuklide Strahlung an das direkt umliegende Gewebe ab. Bei der Teletherapie wird Gewebe von außen bestrahlt. Es besteht kein direkter Kontakt zwischen Strahlenquelle und bestrahltem Gewebe. Hierfür finden hauptsächlich Linearbeschleuniger Verwendung. In der vorliegenden Arbeit wurde ein medizinischer Elektronen-Linearbeschleuniger der Firma Siemens genutzt. Elektronen werden durch ein hochfrequentes elektrisches Feld auf nahezu Lichtgeschwindigkeit beschleunigt, dann abgebremst. Dabei entsteht ultrahochenergetische Photonenstrahlung im Megaelektronenvoltbereich, die von außen über eine rotierbare Gantry auf das Zielvolumen im Körper appliziert wird.

1.2 Einführung in die Strahlenphysik

In der heutigen Radioonkologie kommen verschiedene Strahlenarten mit unterschiedlicher biologischer Wirksamkeit zum Einsatz. Man differenziert Strahlung nach der Ladung und der Ruhemasse der jeweils verwendeten Teilchen.

	Direkt ionisierende Strahlung (geladene Teilchen)	Indirekt ionisierende Strahlung (ungeladene Teilchen)
Korpuskularstrahlung (Teilchen mit Ruhemasse)	Protonen Deuteronen Alphateilchen Schwerionen	Neutronen
Photonenstrahlung (Teilchen ohne Ruhemasse)		Gamma- und Röntgenstrahlung

Tabelle 1: Einteilung ionisierender Strahlung

Dargestellt ist die Zugehörigkeit der unterschiedlichen Strahlenarten bezogen auf die Ruhemasse und die Ladung.

Quelle: Rolf Sauer (2010).¹⁶

Gamma- und Röntgenstrahlung gehören zur Gruppe der elektromagnetischen Photonenstrahlung. Photonen sind Quasi-Teilchen der elektromagnetischen Wechselwirkung ohne Ruhemasse und da auch keine Ladung vorliegt, gehört diese Strahlenart zur indirekt ionisierenden Strahlung. Im Gegensatz dazu besitzen Protonen, Deuteronen, Alphateilchen und Schwerionen sowohl eine definierte Ruhemasse als auch eine elektrische Ladung und werden somit als direkt ionisierende Korpuskularstrahlung bezeichnet. Neutronen besitzen eine Ruhemasse, jedoch keine Ladung, sodass Neutronenstrahlung zur indirekt ionisierenden Korpuskularstrahlung gehört. Die verschiedenen Strahlenarten besitzen unterschiedliche biologische Wirksamkeiten, die über den linearen Energietransfer definiert sind. Für die vorliegenden Experimente wurde Photonenstrahlung im Megaelektronenvoltbereich verwendet.

1.2.1 Wechselwirkung zwischen Photonenstrahlung und Materie

Die Wechselwirkung zwischen Photonenstrahlung und Materie basiert auf drei physikalischen Prinzipien, dem Photoeffekt, dem Comptoneffekt und der Paarbildung. Für den in der Strahlentherapie relevanten Energiebereich (4 bis 20 Megaelektronenvolt) überwiegt der Comptoneffekt. Dieser lässt sich wie folgt erklären: Beim Durchtritt durchs Gewebe stoßen Photonen auf freie oder schwach gebundene Hüllenelektronen, verlieren dabei Energie und werden in einem Winkel von null bis 180° gestreut (Comptonstreuung). Die getroffenen Elektronen (Compton-Elektronen) verlassen die Atome in einem Winkel von null bis 90° gestreut und sorgen dann für weitere Ionisationen.¹⁹

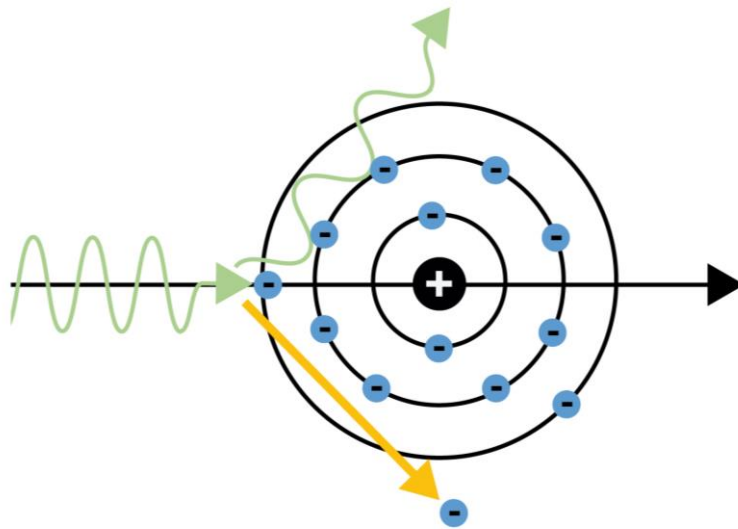


Abbildung 1: graphische Darstellung der Comptonstreuung

Das durchstrahlende Photon (schwarzer Pfeil) trifft auf ein Hüllenelektron. Unter Energieverlust entsteht in einem Winkel von null bis 180° die Comptonstreuung (grüner Pfeil). Das getroffene Compton-Elektron wird in einem Winkel von null bis 90° gestreut (gelber Pfeil).

Quelle: Eigene Darstellung.

1.3 Einführung in die Strahlenbiologie

1.3.1 Direkte und indirekte Strahlenwirkung

Die direkte Strahlenwirkung überwiegt bei Strahlenarten mit hohem linearem Energietransfer (Alpha-, Schwerionen- und Neutronenstrahlung) und entsteht durch direkte „Treffer“ der Teilchen beim Durchtritt durch das bestrahlte Gewebe. Die Energieabsorption und die damit verbundene Schädigung erfolgt somit direkt im Zielmolekül. Die indirekte Strahlenwirkung überwiegt bei Strahlenarten mit niedrigem linearem Energietransfer (Röntgen-, Gamma und Elektronenstrahlung). Der DNS-Schaden erfolgt hier indirekt durch die Radiolyse des umliegenden Wassers. H_2O -Moleküle zerfallen in Radikale (H^\cdot und OH^\cdot), die über fortlaufende Reaktionen vermehrt Wasserstoffperoxid (H_2O_2) generieren. Bei Vorliegen von molekularem Sauerstoff entstehen dann stark reaktive Peroxidradikale, die Lipide, Proteine und letztendlich Nukleinsäuren schädigen.²⁰ Nicht zuletzt wird hierdurch auch verdeutlicht, dass die indirekte Strahlenwirkung wesentlich durch chemische Einflussfaktoren, wie z.B. den Einsatz von Chemotherapeutika oder die Oxygenierung des Gewebes (Sauerstoffeffekt), beeinflusst wird.

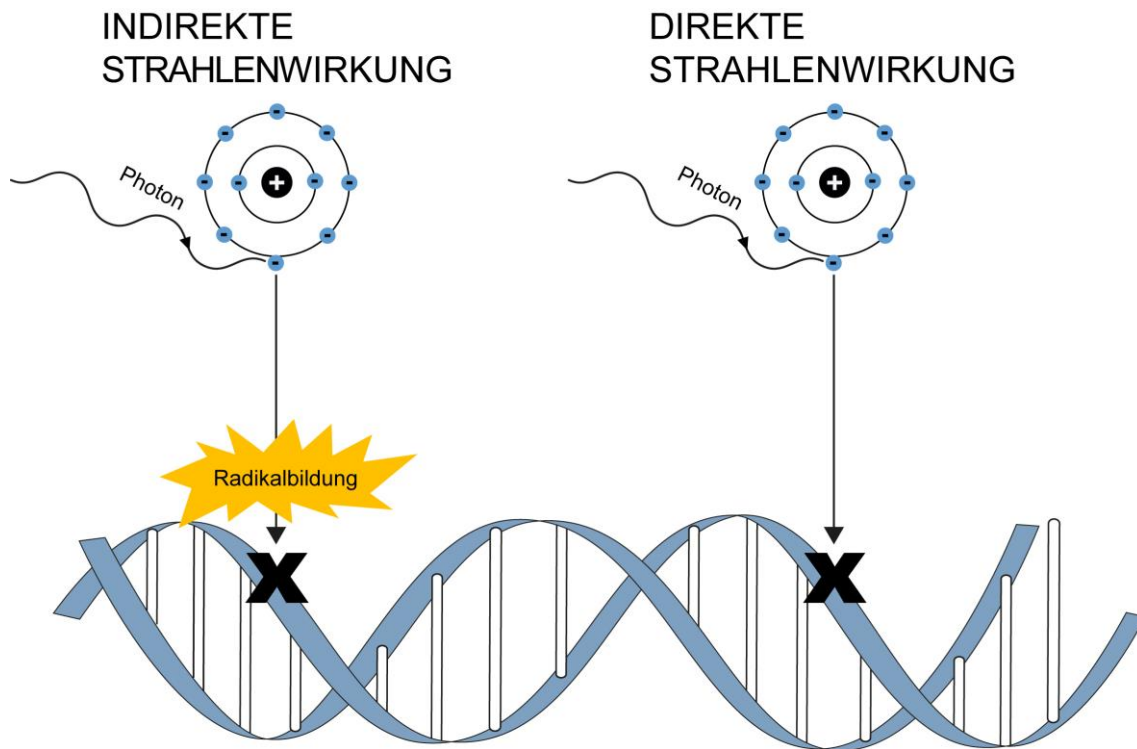


Abbildung 2: Graphische Darstellung der direkten und indirekten Strahlenwirkung

Schematisch dargestellt ist die durch Strahlung verursachte direkte und indirekte Schädigung der DNS. Initial wird hierbei ein Elektron (-) durch ein eintreffendes Photon aus der Elektronenhülle eines Atoms gestoßen. Der rechte Abschnitt der Graphik zeigt die Schädigung des Erbguts durch direkte Wechselwirkung eines losgelösten Elektrons mit dem DNS-Doppelstrang. Der linke Abschnitt der Graphik zeigt die Schädigung des Erbguts durch eine indirekte Wechselwirkung zwischen einem losgelösten Elektron und dem DNS-Strang über eine Radikalbildung.

Quelle: Eigene Darstellung.

1.3.2 DNS-Doppelstrangbrüche und deren Reparatur

Die maßgebliche Wirkung der Photonenstrahlung beruht auf einer diversen Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Die häufigsten Läsionen sind Einzelstrangbrüche, Basen- und Zuckerschäden. Sie können durch Reparaturmechanismen, wie die enzymatische Verknüpfung, die Basen-Exzisionsreparatur oder die Strang-Exzisionsreparatur, nahezu immer fehlerfrei behoben werden. Anders verhält es sich mit Doppelstrangbrüchen. Obwohl sie seltener als Einzelstrangbrüche (Verhältnis 1:20) auftreten,¹⁶ werden sie im Gegensatz zu den zuvor genannten Schadensarten als kritisch eingestuft. Bis in die 70er Jahre nahm man an, dass Doppelstrangbrüche irreparabel seien. Heutzutage wissen wir jedoch, dass der Großteil der Doppelstrangbrüche repariert wird. Dabei können Reparaturfehler zu Chromosomenmutationen und Funktionsverlust der Zelle führen.¹⁶

1.3.2.1 Nachweis von Doppelstrangbrüchen

H2AX gehört zu der Gruppe der Histone, basische Proteine, die einen Teil des eukaryotischen Chromatins bilden. Die DNS-Stränge winden sich kompakt um die Histone und bilden zusammen einen Teil des DNS-Verpackungsmechanismus. Bei Auftreten von Doppelstrangbrüchen phosphoryliert ATM das Protein H2AX an Serin 139, welches dann als γ H2AX bezeichnet wird. γ H2AX lässt sich, wie auch in den folgenden Experimenten geschehen, mittels Antikörper detektieren und dient somit als sensibler Nachweis von Doppelstrangbrüchen. Im Folgenden werden die für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen wichtigsten Reparaturmechanismen dargestellt.

1.3.2.2 Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)

Die Reparatur erfolgt überwiegend durch die zellzyklusunabhängige NHEJ. Die KU Proteine KU70 und KU80 erkennen hierbei freiliegende Doppelstrangbruchenden und heften sich an diese. Zudem bindet die Proteinkinase DNS-PKA an

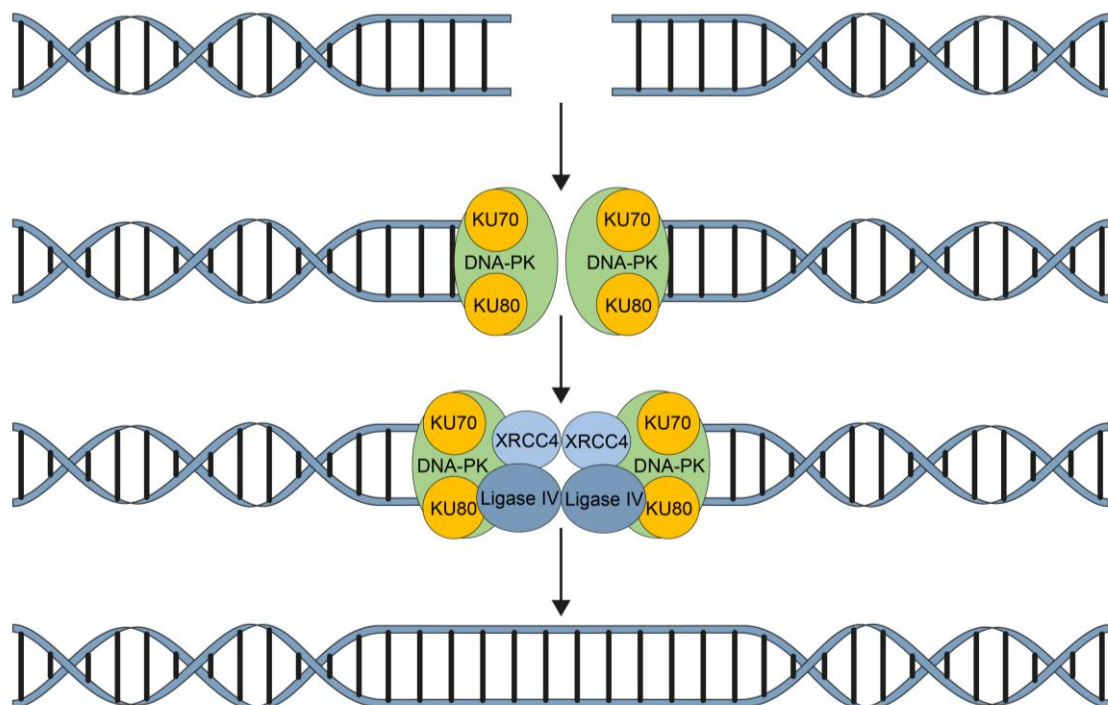


Abbildung 3: Graphische Darstellung der NHEJ

Dargestellt wird die Reparatur eines DNS-Doppelstrangbruchs über die NHEJ. KU Proteine KU70 und KU80 erkennen und binden freiliegende Doppelstrangbruchenden. Unter Einfluss der DNS-PKA und des XRCC4-Proteins erfolgt über die Ligase IV die Verbindung der beiden Strangenden.

Quelle: Eigene Darstellung.

den Doppelstrangbruch(DSB)-KU-Komplex. Sogenannte „Silent Information Regulator“(SIR)-Proteine umlagern die freien Bruchstellen, um den Abbau, die Vernetzung mit anderen Chromosomen, die Transkription oder die Replikation zu verhindern. Über die Ligase IV, deren Aktivität durch das „X-ray repair cross-complementing-4“(XRCC4)-Protein gesteigert wird, erfolgt abschließend die Verbindung der beiden Strangenden. Die Reparatur erfolgt idealerweise ohne eine Veränderung der Sequenz und somit ohne Restschaden. Anders verhält es sich beim Auftreten von „Bulky Lesions“ (mehrere hintereinanderliegende, geschädigte Basenpaare). Die DNS-Enden werden ohne erneute Synthese der fehlenden Sequenzen zusammengefügt. Es kommt zu einer Modifikation der Erbinformation. Ein Restschaden bleibt. Insgesamt wird bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen mit einem Restschaden von unter fünf Prozent gerechnet.^{16,19}

1.3.2.3 Homologe Rekombination (HR)

Einen weiteren Reparaturmechanismus bildet die Homologe Rekombination HR. Im Gegensatz zu NHEJ kann nahezu fehlerfrei repariert werden. Nach Eintritt eines Doppelstrangbruchs wird die Phosphatidylinositol-3-Kinase Ataxia-teleangiectatica-mutiert (ATM) rekrutiert. ATM phosphoryliert das Histon H2AX und weitere Reparaturproteine.²¹ In der Zwischenzeit beschneiden Nukleasen die entstandenen Strangenden, sodass ein 3'-Einzelstrang-Überhang entsteht. Zum Schutz und zur Stabilisierung dieses Überhangs bindet anschließend das Replikationsprotein A (RPA). Eine weitere Aufgabe von ATM ist die Stimulation von Rad51, einem zentralen Protein innerhalb der homologen Rekombination.²¹ Rad51 verdrängt RPA vom Einzelstrang, fördert dann die Vernetzung mit dem homologen Doppelstrang über eine sogenannte Holliday-Struktur,^{21,22} sodass dann die Erbinformation fehlerfrei repliziert werden kann.

Bei der Homologen Rekombination erfolgt der Transfer eines DNS-Strangs aus einem homologen Schwesternchromatid. Somit ist ein homologer Chromosomensatz die Voraussetzung hierfür. Dieser liegt erst ab der S-Phase vor. Die Homologe Rekombination ist somit im Gegensatz zu NHEJ zellzyklusphasenabhängig und ihre höchste Aktivität ist in der späten Synthese(S)- und „Gap2“(G2)-Phase zu finden. Aufgrund der Bedeutung des Zellzyklus auf die Doppelstrangreparatur erfolgt die Vertiefung dieser Thematik im folgenden Abschnitt.

1.3.3 Zellzyklus

Die Proliferation einer eukaryotischen Zelle besteht aus Zellwachstum und Zellteilung. Die Zellteilung erfolgt in der Mitose-Phase (M-Phase). Während der M-Phase wird die Erbinformation halbiert und zwei Tochterzellen entstehen. Zwischen zwei M-Phasen befinden sich teilungsaktive Zellen in der Interphase und verdoppeln ihren Chromosomensatz. Die Interphase wird in die S-Phase und die vor- und nachgeschaltete G-Phasen unterteilt. Die G1-Phase dient der Überprüfung der Unversehrtheit der Erbinformation. Bei bestandener Prüfung beginnt die S-Phase, in der die DNS dupliziert wird. Die einwandfreie DNS-Verdopplung wird dann innerhalb der G2-Phase überprüft. Nach bestandener Prüfung beginnt die Mitose und schließlich die Zellteilung. Teilungsinaktive Zellen befinden sich in einem ruhenden G0-Status. Zellen sind in den verschiedenen Zellzyklusphasen sowie innerhalb der Kontrollpunkte unterschiedlich strahlensensibel, sodass messbare Veränderungen des Zellzyklus auf strahlensensibilisierende Effekte schließen lassen. Folgend sind die Phasen nach absteigender Strahlensensibilität genannt:

1. G2 Kontrollpunkt/Mitosephase
2. G1 Kontrollpunkt
3. Frühe Synthesephase
4. Späte Synthesephase²³

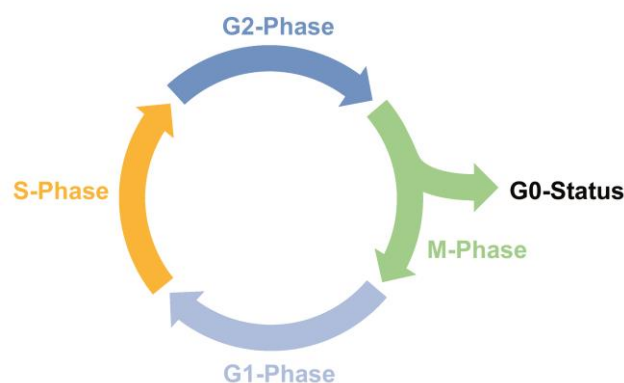


Abbildung 4: Zellzyklusphasen

Nach erfolgter Kernteilung innerhalb der M-Phase (grüner Pfeil) treten teilungsinaktive Zellen in den G0-Status ein. Teilungsaktive Zellen treten in die G1-Phase (hellblauer Pfeil) ein. Hier wird die Unversehrtheit des Erbguts kontrolliert. Nach bestandener Prüfung erfolgt die Verdopplung der Erbinformation innerhalb der S-Phase (gelber Pfeil). Nach bestandener Kontrolle der einwandfreien DNS-Verdopplung innerhalb der G2-Phase (dunkelblauer Pfeil) beginnt die M-Phase. Kern- und Zellteilung erfolgen.

Quelle: Eigene Darstellung.

Ein geregelter Ablauf des Zellzyklus wird durch die verschiedenen Konzentrationen der Cycline A, B, D und E bestimmt. Die Cycline binden dabei an unterschiedliche katalytische Cyclin-abhängige-Kinasen. Der Übergang aus der G1- in die S-Phase bildet den entscheidenden Schritt für den Beginn der Zellzyklusprogression. In der frühen G1-Phase binden zunächst D-Cycline an die Cyclin-abhängige-Kinase (CDK) 4 und 6 in der späteren G1-Phase dann E-Cycline an CDK 2.^{24,25} Das Hauptsubstrat des Cyclin/CDK-Komplexes bildet der Tumorsuppressor pRb, dessen weitere Aktivität zum Eintritt in die S-Phase benötigt wird. Zwei Molekülklassen, die Ink4-Familie (p16, p15, p17, p18) und die Cip/Kip-Familie (p21, p27, p57), können die Kinaseaktivität der CDKs inhibieren und sorgen für einen Arrest der Zellen in der G1-Phase.^{24,26} Hierbei bildet der G1-Arrest eine wichtige Antwort auf einen DNS-Schaden. Durch den Arrest werden die Zellen daran gehindert sich mit einer fehlerhaften DNS zu duplizieren. Erst nach erfolgter Reparatur der DNS kann der G1-Kontrollpunkt überschritten werden. Einer der wichtigsten Regulatoren des G1-Kontrollpunkts ist das Tumorsuppressorprotein p53. Bei einer Vielzahl von Tumoren ist das dazugehörige Tumorsuppressorgen *TP53* mutiert, was zu einem Ausbleiben der G1-Kontrolle führt, sodass diese Zellen nach DNS-Schädigung vermehrt G2/M-Arreste aufweisen. Eine weitere wichtige Reaktion auf einen DNS-Schaden bildet die Apoptose. Sie hindert Zellen mit ausgeprägtem und nicht reparierfähigem Schaden sich zu duplizieren, und wird im folgenden Absatz beschrieben.

1.3.4 Apoptose

Die Apoptose stellt einen biochemischen Prozess dar, der zu einem kontrollierten Zelltod führt. Auf dem Weg zum Zelltod kommt es zu mehreren zellulären Veränderungen, wie der Zellschrumpfung, der Verdichtung des Chromatins und der Fragmentierung der DNS.²⁷ Die Apoptose ist ein streng regulierter Prozess. Der Abbau der Zellbestandteile erfolgt in membranumschlossenen Apoptosekörperchen durch Phagozytose. Anders verhält es sich mit dem traumatischen Zelltod, der Nekrose. Zellinhalt entleert sich unkontrolliert in den Extrazellularraum, woraufhin ein Entzündungsprozess entsteht.²⁸ Zu den am meisten erforschten Aktivierungsmechanismen der Apoptose gehören der extrinsische (Typ I) und der intrinsische Weg (Typ II).

1.3.4.1 Typ I Apoptose

Der extrinsische Aktivierungsweg erfolgt durch Liganden, wie den Tumor-Nekrose-Faktor. Sie werden von T-Zellen exprimiert und binden an Effektorrezeptoren der äußeren Zellmembran. Diese Andockstellen gehören zu der Familie der Tumornekrosefaktor(TNF)-Rezeptoren. Nach erfolgreicher Aktivierung bindet das TNF-assoziierte Protein (TRADD) an den Rezeptor-Liganden-Komplex. Anschließend bindet das Fas-assoziierte Protein (FADD). Die Cysteiny-Aspartat-spezifische-Protease 8 (Caspase 8) setzt eine Caspasenkaskade in Gang, die weitere Caspasen und DNAsen aktiviert. Es kommt zum Abbau des Zellinhaltes.

1.3.4.2 Typ II Apoptose

Mitunter kommt es nach Zellschäden zur übermäßigen Akkumulierung des Tumorsuppressors p53. Bax und Bad, proapoptotische Mitglieder der B-Zell-Lymphom(Bcl-2)-Familie, werden vermehrt exprimiert, was im mitochondrialen Inter-membranraum zur Freisetzung von Cytochrom C führt. Cytochrom C und zusätzliche Faktoren sorgen für die weitere Permeabilisierung der mitochondrialen Membran. Cytochrom C bindet mit dem apoptotischen Proteaseaktivierungsfaktor 1 (Apaf-1). Im Anschluss erfolgt über die Caspase 9 die Aktivierung der Caspasenkaskade.

Als Gegenspieler zu Bax und Bad fungieren das B-Zell-Lymphom-extra-large (Bcl-xL) sowie Bcl-2, antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie. Sie stabilisieren die mitochondriale Membran und verhindern die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Die Apoptose wird verhindert.²⁹ Krebszellen sind durch eine geringe Expression von proapoptotischen und die Überexprimierung von antiapoptotischen Faktoren in der Lage die Apoptose zu umgehen. Somit bildet die Störung dieser Homöostase ein weiteres Charakteristikum innerhalb der Tumorentstehung.

1.3.5 Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Zellen verfügen über diverse extra- und intrazelluläre Signalwege, um äußere Reize zu empfangen und um Informationen auf intrazellulärer Ebene zu übermitteln. Auf intrazellulärer Ebene werden Signale anhand molekularer Prozesse, meist Proteinphosphorylierung hintereinandergeschalteter Kinasen, übermittelt.

Innerhalb dieser sogenannten Signalkaskaden können Signale abgeschwächt oder verstärkt werden. Am Ende der Signalübertragung steht die Signalantwort in Form einer zellulären Reaktion, wie z.B. der Veränderung der Genexpression, des Wachstums sowie des Stoffwechsels. Somit sind Zellen in der Lage, sich an ihre Umwelt anzupassen.

Tumorzellen weisen vermehrt überaktivierte Signalwege auf. Tyrosinkinaseinhibitoren, eine Gruppe der Signaltransduktionshemmer, können die Aktivität spezifischer Proteine innerhalb intrazellulärer Signalwege inhibieren und bilden somit einen modernen onkologischen Therapieansatz. In der vorliegenden Arbeit wurde der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/AKT/Mammalian Target of Rapamycin(mTOR)-Signalweg untersucht.

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Regulation von Zellzyklus, Zellwachstum, Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung, Stoffwechsel und Genexpression.^{8,30,31} In vielen Tumorarten ist dieser Signalweg überaktiviert¹⁵ und bildet damit ein vielversprechendes Ziel für neue onkologische Therapieansätze. Im folgenden Abschnitt werden die Abläufe innerhalb des Signalweg genauer erläutert.

Extrazelluläre Signale aktivieren Rezeptorkinasen, wie z.B. den Insulin- oder Insulin-like-growth-factor(IGF)-Rezeptor.³² In weiteren Schritten erfolgt dann die Aktivierung von PI3K. Als Startpunkt des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs sorgt das aktivierte PI3K für die Phosphorylierung des zellmembranständigen Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2)⁹ zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3). Die steigende PIP3-Konzentration sorgt für die Aktivierung von AKT, auch als Proteinkinase B bekannt. Der Tumorsuppressor *PTEN* wirkt als Gegenspieler zu PI3K, indem er PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert. Durch geringere PIP3-Konzentrationen wird konsekutiv die Aktivierung von AKT blockiert.

AKT nimmt eine zentrale Rolle innerhalb des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs ein. Als potentiell Onkogen nimmt es Einfluss auf die Regulation der Transkription, des Zellmetabolismus, des Zellzyklus, der Autophagie und der Proteinbiosynthese.³³ Die Regulation der Proteinbiosynthese erfolgt über die Serin-Threonin-Kinase mTOR.⁸ mTOR liegt in Form zweier unterschiedlicher Proteinkomplexe vor, dem Mammalian Target of Rapamycin Komplex 1 (mTORC1) und dem Mammalian Target of Rapamycin Komplex 2 (mTORC2). Das aktivierte mTORC1

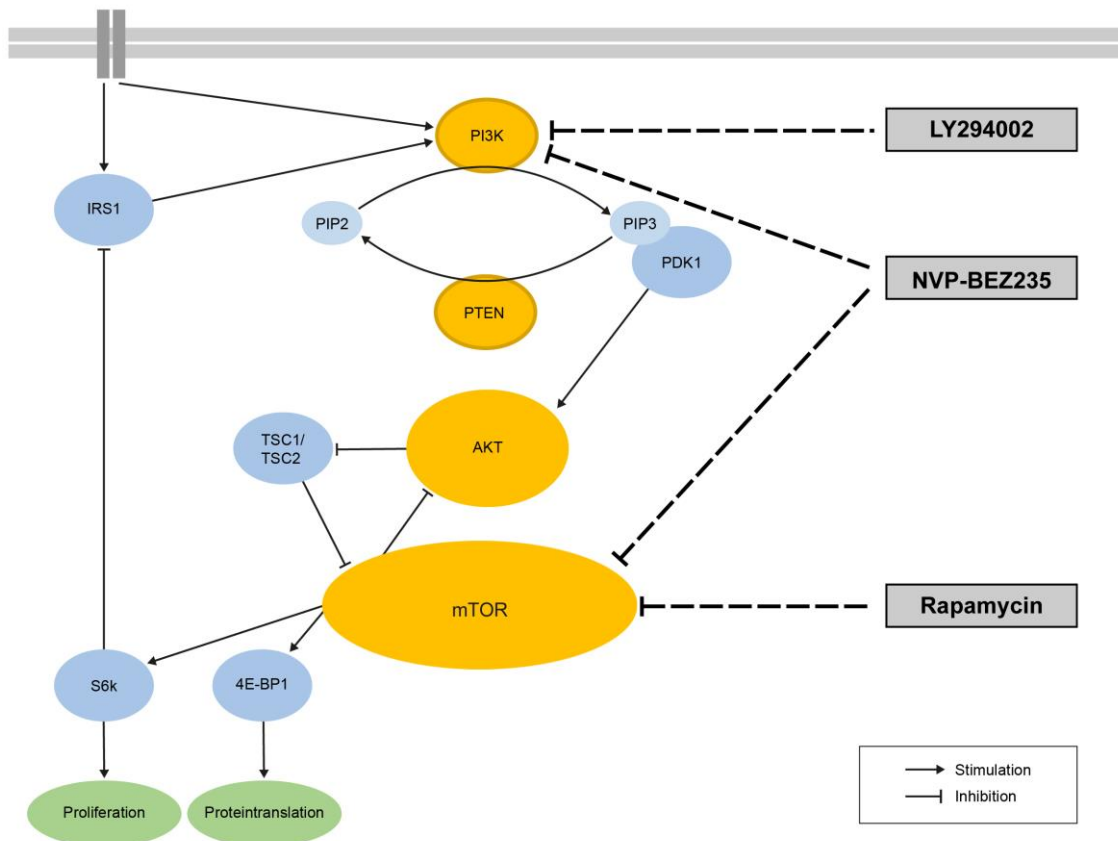


Abbildung 5: PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Dargestellt werden Proteinkinasen (blau/gelb) innerhalb des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, deren Wechselwirkung sowie der Wirkmechanismus der Tyrosinkinaseinhibitoren NVP-BEZ235, Rapamycin und LY294002 (grau) innerhalb des Signalwegs. Die zentralen Proteinkinasen (gelb) bilden AKT, mTOR, PI3K und deren Gegenspieler PTEN. Zelluläre Aufgaben, die durch die Signalwege beeinflusst werden, sind in grün abgebildet.

Quelle: Eigene Darstellung.

phosphoryliert das ribosomale Protein S6 (S6) und das Eukaryotische-Translationsinitiationsfaktor-4E-Bindungsprotein-1 (4E-BP1), dies führt wiederum zur Stimulation der Proliferation und der Proteintranslation.^{13,33}

1.3.6 Kinaseinhibitoren

Proteinkinasen sind Enzyme, die Proteine durch Phosphorylierung aktivieren oder deaktivieren. Dabei wird eine Phosphatgruppe an Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste von Proteinen angehängt. Kinaseinhibitoren können die Enzymfunktion einer oder mehrerer Proteinkinasen ausschalten. Für die vorliegende Arbeit wurden drei Kinaseinhibitoren verwendet, die in den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

eingreifen. Eine kurze Beschreibung der drei Testsubstanzen erfolgt im folgenden Abschnitt.

Rapamycin ist ein mTOR-Inhibitor mit Makrolidstruktur und wurde nach der ursprünglichen Bezeichnung der Osterinseln (Rapa nui) benannt. Von dort stammen Bodenproben mit dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus*, aus dem Rapamycin zum ersten Mal 1972 isoliert wurde. Bisherige präklinische Ergebnisse stellten bei Krebszelllinien mit überaktiviertem PI3K/AKT-Signalweg die antitumorale Wirksamkeit durch alleinige mTOR-Inhibition unter Beweis.³³⁻³⁵ In klinischen Versuchen zeigte sich jedoch häufig nur eine moderate antitumorale Wirksamkeit. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine negative Rückkopplungsschleife. Durch Inhibition von mTOR entfällt indirekt die Inhibition der Insulin-Rezeptor-Substrats-1(IRS1)-Expression, was konsekutiv zu der Aktivierung von AKT über PI3K führt.^{13,14}

LY294002, ein Derivat des Flavonoids Quercetin, gehört zur ersten Generation der PI3K-Inhibitoren. LY294002 ist ein kompetitiver Adenosintriphosphat(ATP)-Inhibitor und hemmt PI3K reversibel. Unvorteilhafte Pharmakodynamik, Kreuzreaktivität und Toxizität lassen keine weitere klinische Verbreitung zu, sodass LY294002 gegenwärtig vornehmlich als Testsubstanz in Laborversuchen seine Anwendung findet.

Der Dualkinase-Inhibitor NVP-BEZ235 hemmt gleichzeitig die Aktivität der Kinasen PI3K und mTOR.¹⁵ Durch die zusätzliche Inhibition von PI3K, einem zentralen Bestandteil der zuvor beschriebenen negativen Rückkopplungsschleife, soll eine stärkere antiproliferative Wirkung erreicht werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

In den nachstehenden Unterpunkten werden die für die Versuche notwendigen Materialien tabellarisch gelistet. Dabei werden neben der Bezeichnung mitunter weitere Spezifikationen, die Funktion, der Hersteller oder der Vertreiber genannt.

2.1.1 Zelllinien

Zelllinien	Mutationen	Hersteller/Vertreiber
GaMG	<i>p53</i>	ATCC (Manassas, USA)
U373-MG	<i>p53, PTEN</i>	ATCC (Manassas, USA)

2.1.2 Geräte

Gerätetyp	Modellbezeichnung	Hersteller/Vertreiber
Autoklav	Typ 23	MELAG Medizintechnik (Berlin)
Durchflusszytometer	FACSCalibur®	Becton Dickinson (Heidelberg)
Elektrophorese-Kammer	Xcell SureLock	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Entwicklermaschine	Optimax Typ TR	MS Laborgeräte (Heidelberg)
Inkubator	Incubator NU-5500	NuAire (Plymouth, USA)
Laborgasbrenner	Fuego SCS basic	WLD-TEC (Arenshausen)
Linearbeschleuniger	Primus	Siemens (München)
Membran-Vakuumpumpe	N022AN, 18	KNF Neuberger (Freiburg)
Mikroskop	CKX31	Olympus (Tokio, Japan)
Pipettierhelfer	Accu-jet® pro	Brand (Wertheim)
Rollmischer	RM5	Hartenstein (Würzburg)
Sicherheitswerkbank	NU-440 Klasse 2	NuAire (Plymouth, USA)
Spektrophotometer	Ultrospect 2000	Scintec Instruments (Manassas, USA)

Universalzentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Universalzentrifuge	5415	Eppendorf (Hamburg)
Vibrationsschüttler	Vibro L40	Jahnke und Kunkel (Staufen)
Wasserbad	Modell 3047	Köttermann (Uetze)
Zählkammer	Neubauer einfach	Hecht Assistent (Sondheim)

2.1.3 Substanzen

2.1.3.1 Tyrosinkinaseinhibitoren

Tyrosinkinaseinhibitor	Funktion	Hersteller/Vertreiber
NVP-BEZ235	PI3K-, mTOR-Inhibitor	Novartis (Basel, Schweiz)
Rapamycin	mTOR-Inhibitor	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
LY294002	PI3K-Inhibitor	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.3.2 Zellkultur

Substanz	Funktion	Katalognummer/Vertreiber
DMSO	Lösungsmittel	D8418, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DMEM	Medium	E15-080, PAA (Pasching, Österreich)
L-Glutamine (1%)	Mediumzusatz	M11-004, PAA (Pasching, Österreich)
MEM	Medium	E15-888, PAA (Pasching, Österreich)
Fetales Kälberserum (10%)	Mediumzusatz	A9418, Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)
Penicillin (100 U/ml)	Mediumzusatz	P11-010, PAA (Pasching, Österreich)

Streptomycin (100 µg/ml)	Mediumzusatz	P11-010, PAA (Pasching, Österreich)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gepufferte Salzlösung	H15-002, PAA (Pasching, Österreich)
Trypsin-EDTA	Zelldissoziation	IL11004, PAA (Pasching, Österreich)

2.1.3.3 ATP-Assay

Substanz	Funktion	Hersteller/Vertreiber
CellTiter-Glo® Buffer	Puffer	Promega (Mannheim)
CellTiter-Glo® Substrate	Substratlösung	Promega (Mannheim)
CellTiter-Glo® Reagent	Reagenzlösung	Promega (Mannheim)

2.1.3.4 Durchflusszytometrie

Substanz	Funktion	Katalognummer/Vertreiber
FITC gekoppelter Anti- γ H2AX-Mausantikörper	DSB-Detektion	16-202A, Millipore (Billerica, USA)
BSA	Block 9	A9418, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Herring sperm DNS	Block 9	74782, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mouse serum	Block 9	M5905, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumfluorid	Block 9	S7220, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriummetavanadat	Block 9	72060, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Triton-X 100	Block 9	T8787, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
EDTA	Block 9	E6758, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumazid	Block 9	S8032, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

PBS	Block 9	selbst angesetzt
RNase	RNS-Abbau	R-5250, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Saponin	DNS-Färbung	47036, Fluka BioChemika (St. Louis, USA)
Propidiumjodid	DNS-Farbstoff	P-4170, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.3.5 Kolonietest

Substanz	Funktion	Katalognummer/Vertreiber
Kristallviolett	Koloniefärbung	C3886, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	Fixierung	A0688, Applichem (Darmstadt)
Essigsäure	Fixierung	A0820, Applichem (Darmstadt)

2.1.3.6 Western Blot

2.1.3.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Substanz	Funktion	Hersteller/Vertreiber
Reagent A	alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung	Bio-Rad (München)
Reagent B	gelöstes Folin-Reagenz	Bio-Rad (München)
Reagent S	Proteindenaturierung	Bio-Rad (München)

2.1.3.6.2 Gelelektrophorese

Substanz	Funktion	Katalognummer/Vertreiber
RIPA Puffer:	Zellyse,	eigene Herstellung
- 50 mM Tris-HCl	Proteinsolubilisierung	
- 0,25% Na-Deoxycholate		
- 1% NP-40		
- 1 mM EDTA		

- 150 mM NaCl

Proteaseinhibitor:	Vermeidung der Protein-	eigene Herstellung
- 1 µg/ml Aprotitin	degradierung	
- 1 µg/ml Leupeptin		
- 1 µg/ml Pepstatin A		
- 1 mM PMSF		

Phosphataseinhibitor:	Vermeidung der Protein-	eigene Herstellung
- 1 mM NaF	degradierung	
- 1 mM Na ₃ VO ₄		

Sample Buffer	Probenpuffer	NP0007, Invitrogen (Darmstadt)
Sample Reducing Agent	Reduktion	NP0009 Invitrogen (Darmstadt)
NuPAGE® Antioxidant	Antioxidanz	NP0005 Invitrogen (Darmstadt)
NuPAGE® Tris-Acetat Puffer	Puffer	LA0041, Invitrogen (Darmstadt)
NuPAGE® MOPS Puffer	Puffer	NP000102, Invitrogen (Darmstadt)
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel	Proteinauftrennung	NP0321, Invitrogen (Darmstadt)
NuPAGE® 4-12% Tris-Acetat Gel	Proteinauftrennung	EA03752, Invitrogen (Darmstadt)

2.1.3.6.3 Blotten

Substanz	Funktion	Hersteller/Vertreiber
NuPAGE® Transferbuffer	Puffer	NP00061, Invitrogen (Darmstadt)
NuPAGE® Antioxidant	Antioxidanz	NP0005, Invitrogen (Darmstadt)
Methanol	Steigerung der Membranbindung	A0688, Applichem (Darmstadt)
Nitrozellulosemembran	Proteinträger	LC2000, Invitrogen

(Darmstadt)

PonceauS

Reversible Proteinfärbung Sigma-Aldrich

2.1.3.6.4 Proteindetektion

Substanz	Funktion	Katalognummer/Vertreiber
Tween®20	Tensid	P7949, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Milchpulver	Blockierung	T145.2, Carl Roth (Karlsruhe)
30% H ₂ O ₂	Entwickler	H1009, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Cumarinsäure in DMSO - 1,1 g/l Cumarinsäure	Entwickler	C9008-1G, Sigma-Aldrich
Luminol: - 15,76 g/l Tris HCl in H ₂ O - 250 mg/l Luminol in H ₂ O	Entwickler	88438, Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.3.6.5 Primärantikörper

Zielprotein	MW	Herkunft	Katalognummer/Vertreiber
PTEN	54 kDa	Kaninchen	9552, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
PI3 Kinase p85	85 kDa	Kaninchen	4292, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
PI3 Kinase p110α	110 kDa	Kaninchen	4249, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
mTOR	289 kDa	Kaninchen	2972, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
p-mTOR	289 kDa	Kaninchen	5536, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
S6	32 kDa	Maus	2317, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)

p-S6	32 kDa	Kaninchen	2215, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
AKT	60 kDa	Kaninchen	9272, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
p-AKT	60 kDa	Maus	4051, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
Bcl-xL	30 kDa	Kaninchen	2762, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
Caspase 3	35 kDa	Maus	9668, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
S6-Kinase	70 kDa	Kaninchen	9202, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
p-p70 S6 Kinase	70 kDa	Maus	9206, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
β -Aktin	42 kDa	Maus	A-5316, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
p-4E-BP1	15-20 kDa	Kaninchen	2855, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)

2.1.3.6.6 Sekundärantikörper

Name	Herkunft	Katalognummer/Vertreiber
Anti-Maus-IgG/HRP-Konjugat	Ziege	P-0447, Dako (Hamburg)
Anti-Kaninchen-IgG/HRP-Konjugat	Ziege	P-0448, Dako (Hamburg)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Inkubation der Zelllinien erfolgte in Standardkulturflaschen mit Hilfe eines Inkubators bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5%. Als Standardmedium wurde für GaMG Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und für U373-MG Minimum Essential Medium (MEM) mit jeweils 10% FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet. Damit sich die Zellen in einem stetig exponentiellen Wachstum befinden, wurden die Zellen vor Erreichen einer kon-

fluierenden Zellschicht im Verhältnis von 1:2 bis 1:5 auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Das sogenannte „Splitting“ begann mit der Entfernung des vorhandenen Mediums. Anschließend wurden die adhärennten Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und für drei Minuten mit 1 bis 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Die Trypsinreaktion war dann durch Zugabe des frischen Standardmediums abstoppar. Die entstandene Zellsuspension wurde dann auf neue, mit Medium befüllte Kulturflaschen verteilt.

2.2.2 Zellbehandlung

Die Behandlung der Zellen erfolgte mit drei verschiedenen Testsubstanzen für 24 Stunden und einer anschließenden Bestrahlung. Hierfür wurde das Medium aus der Kulturflasche entfernt und der verbleibende Zellmonolayer mit PBS gewaschen. Mittels eines Trypsin-EDTA-Gemischs wurden die Zellen abgelöst und in Medium resuspendiert. Über eine Neubauer-Zählkammer erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Eine anschließende Zentrifugierung bei 1200 rpm für fünf Minuten diente der Trennung der Zellen vom Medium. Nach Entfernung des Überstands erfolgte die Resuspendierung der Pellets in einer nach gewünschter Zellzahl definierten Menge an Standardmedium. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in eine mit 9 ml Standardmedium befüllte Petrischale pipettiert und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen dann für 24 Stunden mit den jeweiligen Testsubstanzen behandelt. Hierfür wurden 10 µl von entweder 100 µM NVP-BEZ in DMSO oder 20 µM Rapamycin in DMSO oder 10 mM LY294002 in DMSO in die 10 ml Medium beinhaltende Petrischalen pipettiert, sodass sich eine Endkonzentration von 100 nM für NVP-BEZ235, 20 nM für Rapamycin und 10 µM für LY294002 ergab. Als Kontrolle diente 10 µl reines DMSO. Nach 24 Stunden wurden die Substanzen durch einen Mediumwechsel entfernt und direkt im Anschluss mit einem Primus Linearbeschleuniger der Firma Siemens mit 8 Gy bestrahlt.

2.2.3 ATP-Assay

Der ATP-Assay ist eine Methode zur Beurteilung der Viabilität von Zellen, repräsentiert durch den ATP-Gehalt der Zellen. Der Test wird zur Darstellung der Chemosensibilität von Zelllinien gegenüber verschiedenen Agenzien verwendet.

Eine Sensibilität spiegelt sich in einer verminderten Viabilität wider. Die ATP-Konzentration wird durch eine Luziferase-Reaktion photometrisch bestimmbar. Daraus lässt sich die minimale Konzentration der zugegebenen Substanz bestimmen, unter der sich bereits eine zytostatische Wirkung zeigt. Diese Konzentration wird dann für die weiteren angewandten Tests genutzt.

Im folgenden Abschnitt wird der Ablauf des ATP-Tests ausführlich beschrieben: Für die Versuche wurde eine Titrierplatte mit 96 Kavitäten (englisch: well) genutzt (Abbildung 6). Jede Kavität wurde mit 100 µl einer Medium-Zellsuspension, je nach Zelllinie 1000 bis 4000 Zellen beinhaltend, befüllt. Nach einer Anwachsphase von 24 Stunden erfolgte die Zugabe von 100 µl verschiedener Testsubstanz-Verdünnungen (verdünnt in Medium) gefolgt von einer erneuten Inkubation. Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

- NVP-BEZ235: 10, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 1000 nM.
- LY294002: 1, 2, 5, 10, 20, 40, 100 µM.
- Rapamycin: 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 nM.

Als Kontrolle dienten vier Wells befüllt mit reinem Medium und vier Wells befüllt mit Zellen in Medium. Weitere vier Wells erhielten zusätzlich das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO), das als Trägersubstanz der Tyrosinkinaseinhibitoren in allen Versuchen Verwendung fand.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
C		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
D		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
E		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
F		A	A									
G		A	A									
H												

Abbildung 6: Pipettierschema 96-Well-Platte

A: reines Medium ohne Zellen, B: Zellsuspension, C: Zellsuspension und DMSO, D bis K: Zellsuspension und aufsteigende Konzentrationen der untersuchten Substanz, graue Felder: PBS.

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes erfolgte nach 24 bzw. 48 Stunden gemäß der Herstellerangabe „Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay“ von Pro-mega. Hierzu wurden die Zellen mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Pro Well wurden 100 µl Cell Titer Reagent und 100 µl Medium hinzugefügt. Für das Lysieren wurden die Zellen für zwei Minuten gerüttelt und anschließend zehn Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Nach Herstellerangaben wurde Luziferase hinzugefügt, zehn Minuten später erfolgten die photometrischen Messungen. Unterstützt wurden die Experimente von Frau A. Katzer.

2.2.4 Koloniebildungstest

Koloniebildungstests dienen der Feststellung der klonogenen Überlebensrate von Zellen nach Bestrahlung, wodurch man auf die Radiosensitivität von Zelllinien und radiosensibilisierende Wirkung von Testsubstanzen schließen kann. Zunächst wurden 5×10^5 Glioblastomzellen pro Petrischale ausgesät. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben. Im Anschluss bestrahlte man die Zellen mit unterschiedlichen Dosen (0, 2, 3, 5, 7 oder 8 Gy). Nach der Bestrahlung wurde pro Bedingung je nach bestrahlter Dosis (vgl. Tabelle 2) zwischen 10^3 und 10^4 Zellen in jeweils vier mit 15 ml Medium befüllte Petrischalen übertragen und für 12 bis 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Zwischendurch wurde das Wachstum der Zellkolonien mikroskopisch überprüft. Nach Erreichen einer Koloniegröße von ca. 50 Zellen konnte der Test abgestoppt

Dosis in Gy	Ausgesäte Zellen/Petrischale	
	GaMG	U373
0	1000	1000
2	1000	1000
3	2500	2500
5	5000	5000
7	10000	10000
8	10000	10000

Tabelle 2: Pipettierschema für die Zellaussaat der Koloniebildungstest

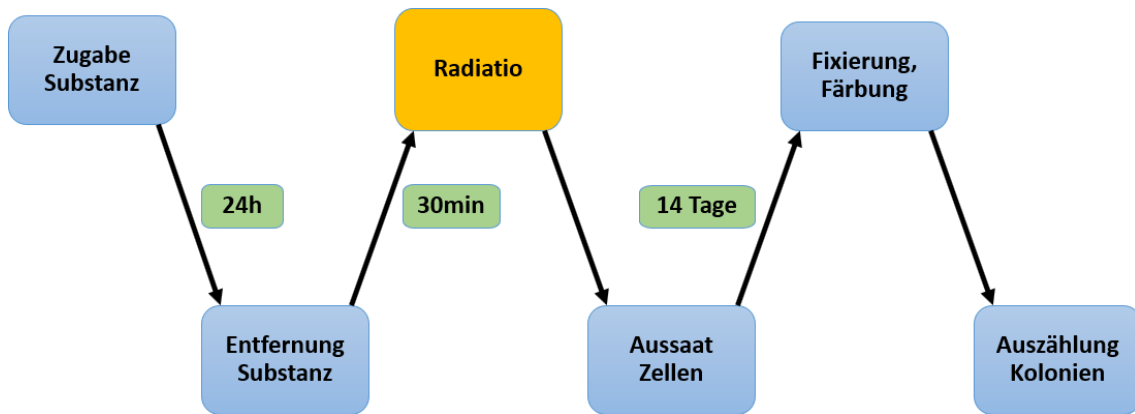


Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Koloniebildungstests

Schematisch dargestellt ist der Ablauf von der Substanzzugabe bis hin zur Auszählung der Kolonien. Die Zeitangaben vor und nach Bestrahlung sind grün abgebildet.

Quelle: Eigene Darstellung.

werden. Hierfür wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einem kalten Fixativ bestehend aus Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1, für 20 Minuten behandelt und anschließend mit 0,6% Kristallviolettlösung über Nacht gefärbt. Am Folgetag wurde die Kristallviolettlösung entfernt, die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und die Petrischalen getrocknet. Hinterher wurden die gefärbten Kolonien (4 Petrischalen pro Bedingung) ausgezählt und dann die Mittelwerte und der Standardfehler berechnet. Die Werte sind auf die Kontrollprobe (0 Gy, DMSO) normiert, sodass die jeweilige Überlebensfraktion (SF), also die Anzahl der koloniebildungsfähigen Zellen, die die jeweilige Behandlung überlebt, berechnet werden kann.

Anhand des Programms Origin® 9.4 erfolgte dann die graphische Darstellung der Daten, indem man die SF logarithmisch (Ordinate) und die Bestrahlungsdosis linear (Abszisse) gegeneinander auftrug. Im nächsten Schritt wurden Überlebenskurven mit Hilfe des linearquadratischen Modells erstellt.

$$\ln SF = -\alpha D - \beta D^2$$

Formel 1: Linearquadratisches Modell

SF= Überlebensfraktion; α = lineare gewebespezifische Konstante; β = quadratische gewebespezifische Konstante; D= Bestrahlungsdosis in Gy.

Abschließend wurden mit Hilfe des Programms Origin® 9.4 folgende Parameter ausgewertet:

1. Die Plattierungseffizienz (PE) zeigt die Anzahl der ausgebildeten Kolonien aus der Anzahl der ausgesäten Zellen.
2. Die Überlebensfraktion (SF_2) zeigt die Überlebensrate bei einer Dosis von 2 Gy.
3. Die Strahlendosis in Gy, die die Anzahl der überlebenden Kolonien auf 10% reduziert (D_{10}).

Unterstützt wurden die Experimente von Frau A. Katzer und Frau S. Hilz.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie fand die quantitative Analyse der Zellzyklusphasen und der DNS-Schädigung beider untersuchten Glioblastomzelllinien statt. Das Verfahren ermöglicht die Messung einer großen Anzahl einzelner fluoreszenzmarkierter Zellen in kurzer Zeit.

In unseren Versuchen erfolgte die Markierung der Doppelstrangbrüche (DNS-Schädigung) mit γ H2AX und des DNS-Gehalts (Zellzyklus) mit PI, anschließend wurden jeweils 20000 Zellen pro Bedingung gemessen.

2.2.5.1 Behandlung der Zellen

Pro Bedingung wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen, wie in Absatz 2.2.2 beschrieben, vorbereitet und behandelt. 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen mittels eines Trypsin-EDTA-Gemisch abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde dann mit dem vorher abpipettierten Medium gestoppt, um mögliche gelöste apoptotische Zellen innerhalb des Mediums einzuschließen. Die Proben wurden bei 4°C mit 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde dann zweimal mit jeweils 4 ml gekühlten PBS gewaschen und erneut bei 4°C mit 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Fixierung erfolgte mit 4 ml eines -20°C kaltem 70%igem Ethanol, das zur Vermeidung einer Verklumpung unter Vortexen tröpfchenweise hinzugefügt wurde. Daraufhin waren die Zellen bei 4°C lagerfähig.

Für die anschließende Bearbeitung wurden die Zellen mit einer gepufferten Lösung (PBS) mehrmals gewaschen und somit rehydriert. Die Proben wurden mit einem Gemisch aus Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-Anti- γ H2AX-Antikörper und

Block9-Lösung auf einen Rüttler im Dunkeln bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Hierbei markierten die fluoreszenzgekoppelten Antikörper das γ H2AX, einen indirekten Marker der DNS-Doppelstrangbrüche. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit einem Propidiumjodid(PI)-Ribonuklease(RNase)-Gemisch auf einem Rüttler im Dunkeln bei Raumtemperatur für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach Interkalation von PI zwischen Basenpaaren der DNS und RNS bildet sich ein Fluoreszenzsignal aus. Eine ungewollte Markierung der RNS durch PI wurde durch den Einsatz von RNase verhindert,³⁶ sodass letztendlich der zellzyklusabhängige DNS-Gehalt der untersuchten Zellen markiert wurde.

2.2.5.2 Durchflusszytometrische Messungen

Die Messungen wurden mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur® an jeweils 20000 Zellen pro Bedingung durchgeführt. Zellen wurden dabei hintereinander durch eine Präzisionsmessküvette geführt und mit einem 488 nm Argonionenlaser einzeln angeregt. Die ähnlichen Absorptionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (FITC 495 nm, PI 493 nm) und unterschiedliche Emissionsmaxima (FITC 519 nm, PI 636 nm)³⁶ ermöglichten hierbei die gleichzeitige Messung und zweidimensionale Darstellung der Fluoreszenzsignale von γ H2AX (grün) und PI-DNS (rot). Die Analyse und Darstellung der Zellzyklus-Daten erfolgten linear. Für die Anfitung dieser Daten wurde das Programm ModFit LT® genutzt. Die Analyse und Darstellung der Sub-G1-Fraktions-Daten erfolgten logarithmisch. Der Geomean dieser Daten wurde mit dem Programm WIN MDI® 2.9 berechnet. Unterstützt wurden die Versuche von Herrn S. Kuger und Frau D. English.

2.2.6 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur semiquantitativen Proteinanalyse. Expressionsmuster diverser Zielproteine innerhalb von Zellen können unter verschiedenen Bedingungen dargestellt und untersucht werden.

Zellproben wurden zunächst lysiert, deren Proteine extrahiert. Anschließend wurde die Konzentration der Proteine bestimmt. Das Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) fügte man den zuvor berechneten Proteinmengen hinzu und versah diese somit mit negativer Ladung. Dann erfolgte die Befüllung der Taschen eines

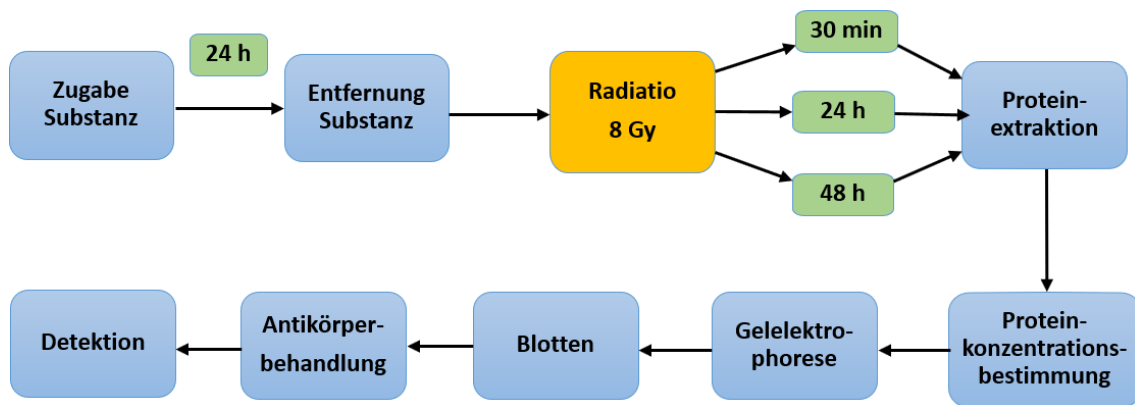


Abbildung 8: Schematischer Ablauf des Western Blots

Schematisch dargestellt ist der Ablauf von der Substanzzugabe bis hin zur Detektion. Die Zeitanlagen vor und nach Bestrahlung sind grün abgebildet.

Quelle: Eigene Darstellung.

Polyacrylamidgels. Durch eine longitudinal angelegte Spannung wurden die Proteine zur Anode wandernd durch das Gel gezogen und der Größe der Gelporen nach separiert. Anschließend übertrug man durch eine senkrecht zum Gel stehende Spannung die separierten Proteine auf eine angelegte Nitrozellulosemembran (Blotting). Zielproteine innerhalb der Proteinbande konnten mit Hilfe von spezifischen Enzym-gekoppelten-Antikörper-Komplexen gebunden werden. Die Visualisierung der Zielproteine erfolgte dann durch eine an den Enzym-gekoppelten-Antikörper-Komplexen ablaufenden Chemolumineszenz-Reaktion. Der Ablauf dieser Experimente wird in Abbildung 8 zusammengefasst. In den darauffolgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte des Experiments ausführlich beschrieben.

2.2.6.1 Behandlung der Zellen

Pro Bedingung wurden 10^6 Zellen für 24 Stunden mit den einzelnen Testsubstanzen behandelt. Die Arbeitskonzentrationen betragen 100 nM für NVP-BEZ235, 10 μ M für LY294002 und 20 nM für Rapamycin. Die Proben wurden im Anschluss mit 8 Gy bestrahlt und für 30 Minuten, 24 und 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Kulturmedium entfernt und die adhären Zellen mit Trypsin-EDTA von der Petrischale gelöst. Um auch mögliche freischwimmende apoptotische Zellen zu erfassen, wurde die Trypsinreaktion mit dem jeweils zuvor entfernten Medium angehalten. Die Zellsuspension wurde dann bei 4°C für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert.

2.2.6.1 Erstellung der Zellysate und Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Lysierung und Denaturierung wurden die Zellpellets mit 100 µl Radio-Immunopräzipitations-Assay-Puffer (RIPA-Puffer) resuspendiert, für 30 Minuten bei 4°C gelagert und anschließend bei gleicher Temperatur mit 12000 rpm für 12 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C für die folgenden Untersuchungen gelagert.

Um im nächsten Schritt eine gleichmäßige Beladung der Polyacrylamidgele mit identischen Proteinmengen zu ermöglichen, erfolgte zunächst die Proteinkonzentrationsbestimmung der vorliegenden Proben nach Herstellerangaben mittels „Dc Protein Assay Kit“ der Firma BioRad.

2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mittels Gelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der Proteine nach Molekülmasse. Hierfür wurden die nachfolgend tabellarisch aufgelisteten SDS-Gele der Firma Invitrogen verwendet. Zur Beladung der Gele wurden abhängig von den darzustellenden Zielmolekülen 20 µg oder 40 µg Proteine der einzelnen Bedingungen mit RIPA-Puffer auf 15 µl suspendiert. Dazu wurden jeweils 2 µl Probenreduktionspuffer und 5 µl Probenpuffer hinzugefügt. Die Proteinlösungen wurden dann in einem Heizblock bei einer Temperatur von 70°C für 10 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurden jeweils zwei SDS-Gele in eine Gelelektrophoresekammer eingelegt und die innere Kammer zwischen den Gelen mit einem Gemisch aus Pufferlösung und Antioxidanz befüllt. Die Beladung der Gele erfolgte wie in Tabelle 4 dargestellt.

Gel	Polyacrylamidgehalt	Trennbereich in kDa	Trennbereich	Verwendeter Puffer
Bis-Tris	4-12%	1,5 bis 300	klein- und mittelgroße Proteine	3-(N-Morpholino)-Pro-pansulfonsäure (MOPS)-Puffer
Tris-Acetat	3-8%	40 bis 500	mittel- bis große Proteine	Tris-Acetat-Puffer

Tabelle 3: Verwendete Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgele

GaMG						U373-MG						30min nach RT
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kontrollsubstanz	Kontrollsubstanz	Kontrolle 0 Gy	Substanz 0 Gy	Kontrolle 8 Gy	Substanz 8 Gy	Kontrollsubstanz	Kontrolle 0 Gy	Substanz 0 Gy	Kontrolle 8 Gy	Substanz 8 Gy	Kontrollsubstanz	

GaMG						U373-MG						24h nach RT
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kontrollsubstanz	Kontrolle 0 Gy	Substanz 0 Gy	Kontrolle 8 Gy	Substanz 8 Gy	Kontrollsubstanz	Kontrollsubstanz	Kontrolle 0 Gy	Substanz 0 Gy	Kontrolle 8 Gy	Substanz 8 Gy	Kontrollsubstanz	

GaMG						U373-MG						48h nach RT
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kontrollsubstanz	Kontrolle 0 Gy	Substanz 0 Gy	Kontrolle 8 Gy	Substanz 8 Gy	Kontrollsubstanz	Kontrolle 0 Gy	Substanz 0 Gy	Kontrolle 8 Gy	Substanz 8 Gy	Kontrollsubstanz	Kontrollsubstanz	

Tabelle 4: Schema der Gelbeladung

Pro Gel wurden 8 Banden mit unterschiedlichen Proteinproben und 4 Banden mit farblich markierten Proteingrößenstandards (Marker) beladen. Die Proteinproben wurden 30 Minuten, 24 sowie 48 Stunden nach Bestrahlung (RT) untersucht. Um Verwechslungen zu vermeiden, wurden unterschiedliche Beladungsmuster angewandt.

Anschließend wurde die äußere Kammer mit der Pufferlösung befüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150 V (Tris-Acetat-Gele) und 200 V (Bis-Tris-Gele) durchgeführt, dabei zeigte sich anhand farbiger Markerbanden der Fortschritt der Proteinmigration entlang des Gels.

2.2.6.3 Blotten

Beim sogenannten Blotting erfolgt die Übertragung aufgetrennter Proteine innerhalb eines SDS-Gels senkrecht auf eine anliegende Nitrocellulosemembran. Gleich der SDS-PAGE wanderten die Proteine entlang einer elektrischen Spannung in Richtung Anode.

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte hierbei innerhalb einer mit Transferpufferlösung gefüllten Transferkammer. Die Transferkammer wurde vorsichtig in die Elektrophoresekammer eingeklemmt. Der innere Bereich dieser Kammer wurde dann mit Transferpufferlösung und der äußere Bereich mit H₂O befüllt.

Die Elektrophorese erfolgte bei 30 V Spannung für 2 bis 3 Stunden. Zur Überprüfung der erfolgreichen Proteinübertragung wurde die Membran entnommen und mit dem unspezifischen Proteinfarbstoff Ponceau S für 2-5 Minuten behandelt. Im Anschluss wurde die Membran dann zweimal mit H₂O gespült und in Kunststoffolie eingeschweißt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

2.2.6.4 Immundetektion

Die in Kunststoffolie eingeschweißten Membranen wurden vorsichtig entpackt, in phosphatgepufferter Salzlösung mit 0,1% Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (TWEEN®20) in PBS gespült und in 50 ml Falcon® Zentrifugenröhrchen platziert. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen dann, je nach verwendetem Antikörper, mit 4% Milchpulver in PBST oder 4% Bovines Serumalbumin (BSA) in PBST zwischen 1 und 24 Stunden benetzt. Der Primärantikörper wurde dann nach den jeweiligen Angaben des Herstellers in 4 ml 4% Milchpulver- oder 4% BSA-PBST verdünnt und zur Membran hinzugefügt. Nachfolgend wurden die Zentrifugenröhrchen bei 4°C auf einem Rollmischer für 1 bis 12 Stunden inkubiert. Die Membranen wurden dann jeweils 3-mal mit PBST gewaschen. In einer Verdünnung von 1:2000 erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers in 4 ml Milchpulver-beziehungsweise 4 ml BSA-PBST. Die Inkubation erfolgte dann für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur. Erneut wurden die Membranen 3 mal 10 min mit PBST gewaschen. Pro Membran wurden dann 5 ml Luminol-Lösung, 0,5 ml Cumarinsäure und 5 µl H₂O₂ angesetzt und zur Membran hinzugefügt und erneut auf dem Rollmischer für 2 Minuten inkubiert. Die Membranen wurden dann an einem Röntgenfilm anliegend in einer

Röntgenkassette verriegelt. Je nach Antikörper wurden verschiedene Belichtungszeiten angewendet. Nach erfolgter Belichtung erfolgte bei Rotlicht die Entwicklung des Röntgenfilms. Im Anschluss wurden die Membranen in PBST gespült und zur weiteren Detektion verwendet. Die entwickelten Röntgenfilme wurden beschriftet und eingescannt. Die Bilddatenanalyse erfolgte mittels Image J. Unterstützt wurden die Experimente von Frau D. English.

3 Ergebnisse

Um den Einfluss der dualen PI3K/mTOR Inhibition auf die Strahlensensibilität der Zelllinien GaMG und U373-MG zu klären, wurden die folgenden Aspekte unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht:

3.1 Auswirkung der PI3K/mTOR-Inhibition auf die Zellproliferation

Im folgenden Ergebnisteil untersuchte man den Einfluss der PI3K/mTOR-Inhibition auf die metabolische Aktivität (Zellviabilität) der beiden Zelllinien. Die duale PI3K/mTOR Inhibition erfolgte durch NVP-BEZ235. Vergleichend dazu erfolgte die alleinige PI3K-Inhibition durch Ly294002 und die alleinige mTOR-Inhibition durch Rapamycin.

3.1.1.1 Einfluss von NVP-BEZ235 auf die Zellvitalität

Die nachstehende Abbildung zeigt sigmoidal verlaufende Kurven. Bei steigender Konzentration von NVP-BEZ235 zeigen die beiden Zelllinien U373-MG und GaMG einen kontinuierlichen Abfall der Zellviabilität bis zum Erreichen eines Plateaus. Dieses Plateau bildet sich 24 Stunden nach Zugabe von NVP-BEZ235 bei einer Konzentration von 100 nM. In diesem Bereich liegt der relative ATP-Gehalt der Zelllinie GaMG um die 60% und der ATP-Gehalt der Zelllinie U373-MG um die 65%.

48 Stunden nach Zugabe der Agenz, erreicht die Zellviabilität von U373-MG, gleich den 24 Stunden-Tests, ein Plateau ab einer Konzentration von 100 nM. GaMG hingegen zeigt nach 48 Stunden ein Plateau bereit ab einer Konzentration von ca. 60 nM. In Zusammenschau dieser Ergebnisse sowie übereinstimmender Literaturdaten (Murkherjee u.a., 2013; Manara u.a., 2010)^{37,38} wurde für die folgenden Experimente die Arbeitskonzentration auf 100 nM festgelegt.

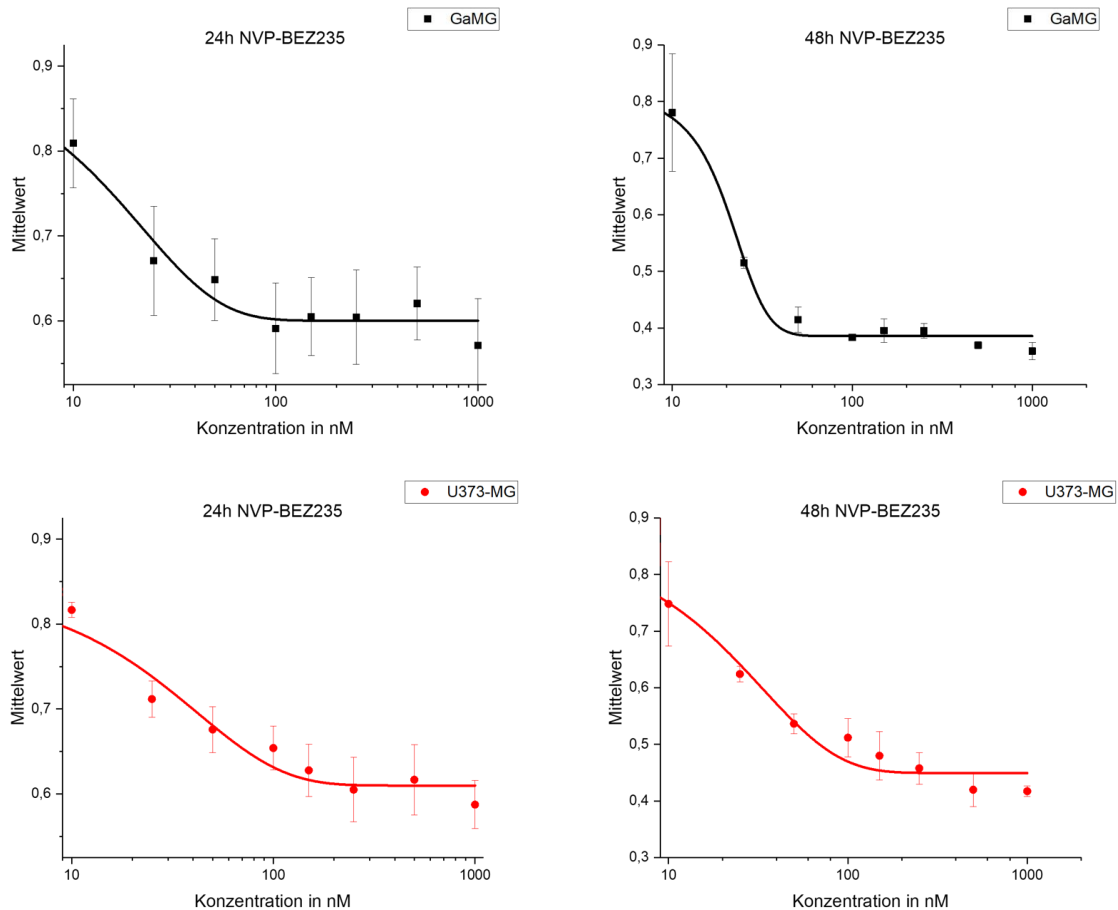


Abbildung 9: Einfluss von NVP-BEZ235 auf die Zellviabilität

Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und dazugehörige Standardabweichungen der Zellviabilität zweier Glioblastomzelllinien unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von NVP-BEZ235. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

3.1.1.2 Einfluss von Rapamycin auf die Zellvitalität

Die angefertigten Graphen zeigen wie bei den zuvor beschriebenen Daten einen für Zellviabilitäts-Assays typischen sigmoidalen Kurvenverlauf. Bei steigender Konzentration von Rapamycin erreicht der ATP-Gehalt beider Zelllinien ein Plateau. Dieses wird 24 Stunden nach Zugabe von Rapamycin von beiden Zelllinien ab einem Konzentrationsbereich von 15 bis 20 nM erreicht. In diesem Konzentrationsbereich lag der relative ATP-Gehalt bei GaMG im Bereich von ca. 95% und bei U373-MG im Bereich von ca. 85%.

48 Stunden nach Zugabe des Agens bildet U373-MG, gleich den 24 Stunden-Tests, ein Plateau bei einer Konzentration von 20 nM aus. GaMG hingegen bildet ein Plateau bei einer Konzentration von ca. 40 nM aus. In diesen Konzentrationsbereichen liegt der relative ATP-Gehalt für U373-MG im Bereich von ca. 79% und

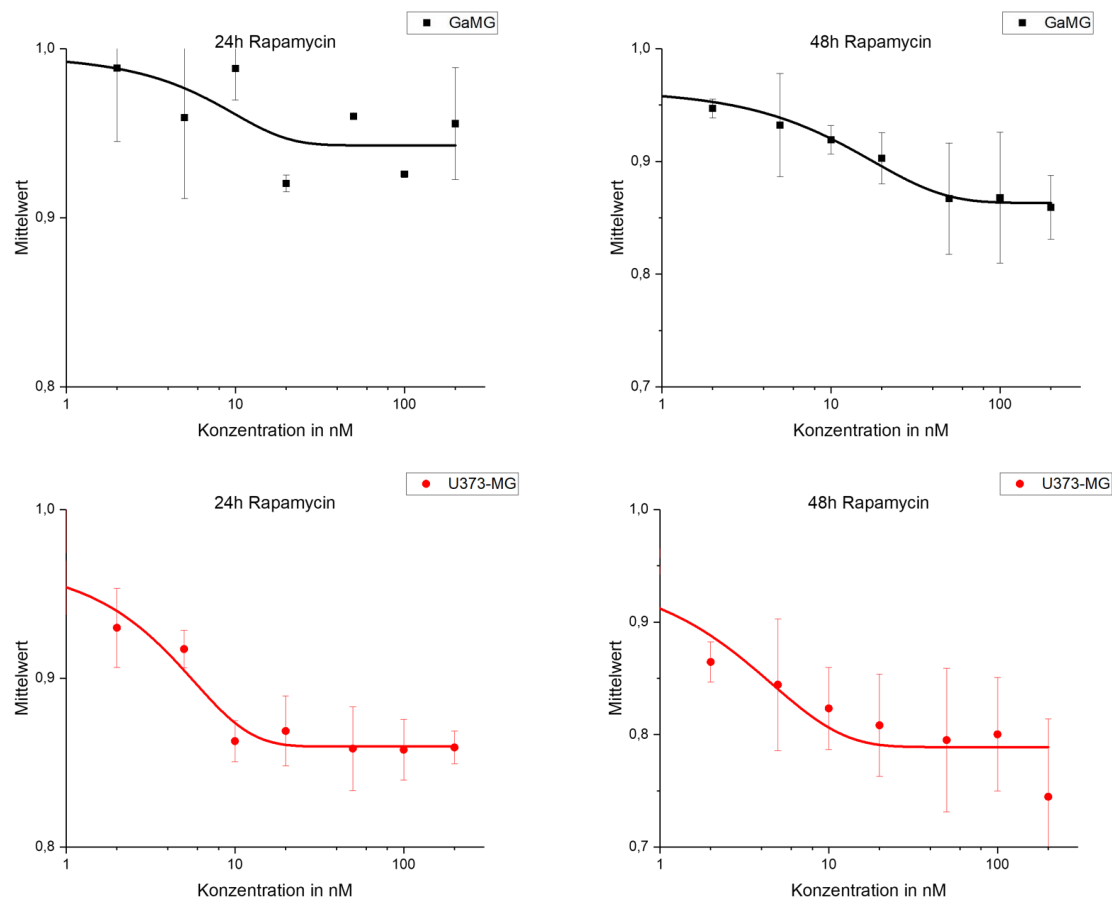


Abbildung 10: Einfluss von Rapamycin auf die Zellviabilität

Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und dazugehörige Standardabweichungen der Zellviabilität zweier Glioblastomzelllinien unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von Rapamycin. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

für GaMG im Bereich von ca. 88%. Gegensätzlich zu den Versuchen mit NVP-BEZ235 wird die Zellviabilität von U373-MG im Vergleich zu der von GaMG durch Rapamycin stärker reduziert. In Zusammenschau dieser Ergebnisse sowie übereinstimmender Literaturdaten (Benavides-Serrato u.a., 2017; Bahmad u.a., 2017)^{39,40} wurde für die folgenden Experimente die Arbeitskonzentration auf 20 nM festgelegt.

3.1.1.3 Einfluss von LY294002 auf die Zellvitalität

Nahezu alle folgenden Graphen zeigen einen für Zellviabilitäts-Assays typischen sigmoidalen Kurvenverlauf. Die Graphen zeigen ab einer Konzentration von 10 µM einen deutlich fallenden Kurvenverlauf. Ein deutliches Plateau konnte nicht

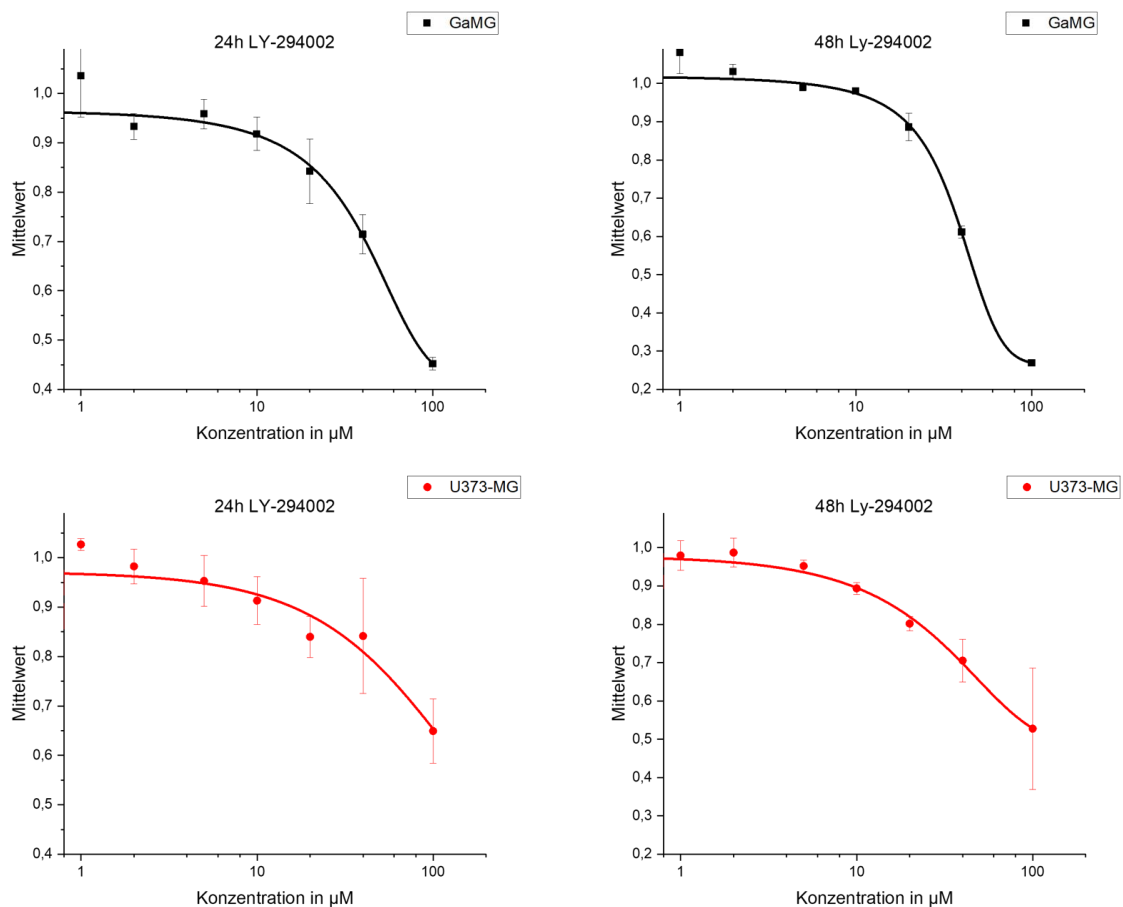


Abbildung 11: Einfluss von LY294002 auf die Zellviabilität

Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte und dazugehörige Standardabweichung der Zellviabilität zweier Glioblastomzelllinien unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von LY294002. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

dargestellt werden. Die Arbeitskonzentration für den Klasse I PI3K-Inhibitor LY294002 wurde bei 10 µM festgelegt. Die Grundlage für die Festlegung der Arbeitskonzentration bilden zahlreiche publizierte Daten (Brunn u.a., 1996; Vlahos u.a., 1994; Knight u.a., 2004; Lee u.a., 2006)^{41–44}.

3.2 Auswirkungen der PI3K/mTOR-Inhibition auf das Zellüberleben nach Radiatio

Die Untersuchungen zur Modulation der Strahlenempfindlichkeit beider Zelllinien unter Einfluss der drei Testsubstanzen erfolgte über den Koloniebildungstest. Hierfür wurde die Koloniebildungsfähigkeit von GaMG (*PTEN* wt) und U373-MG

(*PTEN* mut) untersucht. Zuvor wurden die Zellproben einer 24-stündigen Behandlung mit entweder LY294002 (PI3K-Inhibitor), Rapamycin (mTOR-Inhibitor) oder NVP-BEZ235 (dualer PI3K/mTOR-Inhibitor) unterzogen und anschließend mit unterschiedlichen Dosen (0, 2, 3, 5, 7, 8 Gy) bestrahlt. Nach zweiwöchiger Inkubation und darauffolgender Fixierung und Färbung der Proben erfolgte die Zählung der Kolonien. Um die unterschiedliche biologische Wirksamkeit verschiedener Strahlendosen zu berücksichtigen, erfolgte die Anpassung der Daten an das Linearquadratische-Modell. Untersucht wurden PE (prozentualer Anteil der ausgesäten Zellen, die eine Kolonie gebildet haben), SF₂ (Überlebensquote nach einer Bestrahlung mit 2 Gy), D₁₀ (die Strahlendosis in Gy, bei der die überlebenden Kolonien auf 10% reduziert sind) und I₁₀ (Wachstumsinhibitionsfaktor; Verhältnis aus D₁₀ Kontrolle und D₁₀ Testsubstanz). Die Daten werden im Folgenden graphisch und tabellarisch dargestellt und beschrieben.

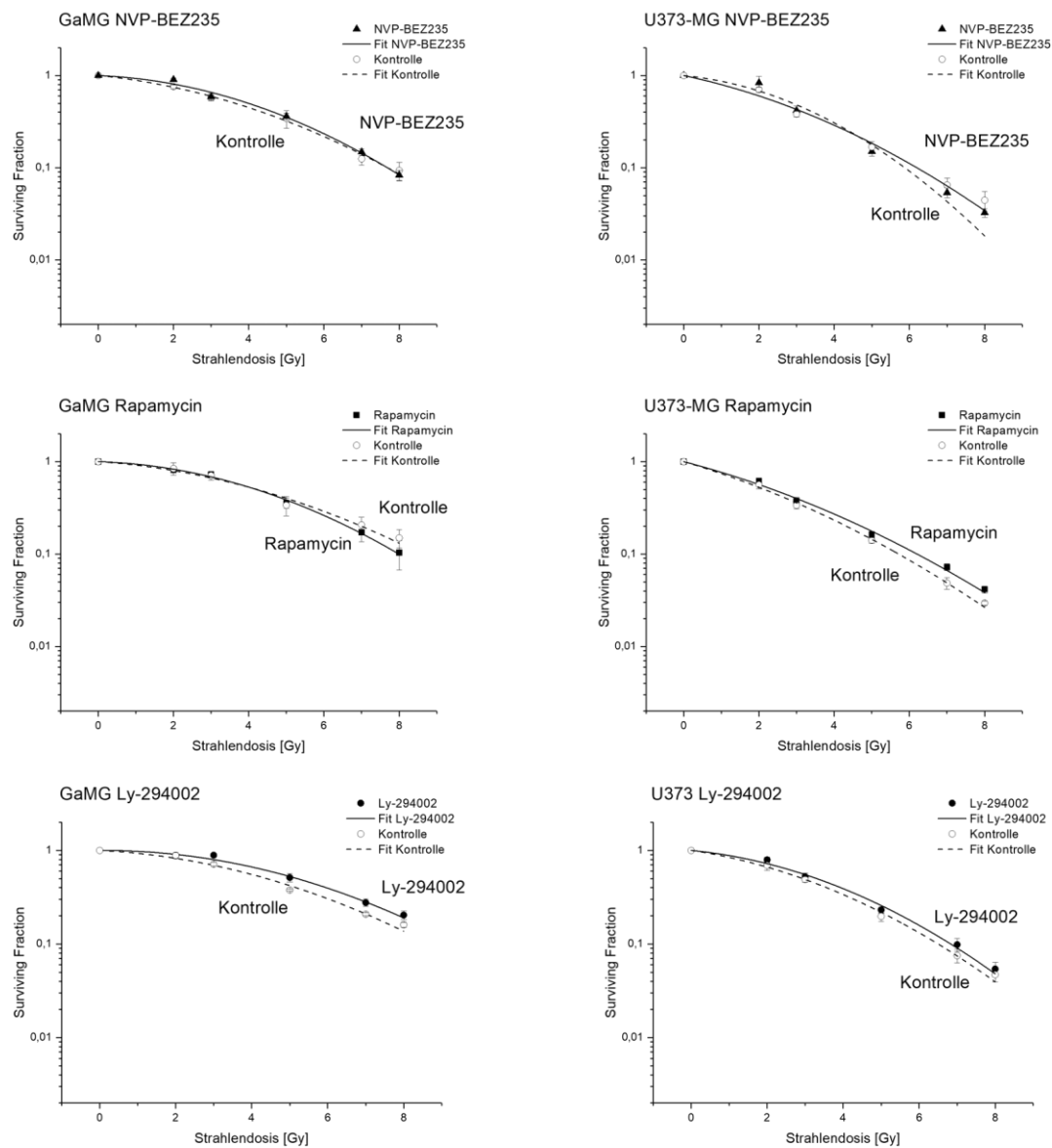


Abbildung 12: Einfluss der PI3K/mTOR-Inhibition auf die klonogene Überlebensrate

Graphisch dargestellt sind Überlebensfraktionen der Zelllinien GaMG und U373-MG, die 24 Stunden vor Bestrahlung mit unterschiedlichen Testsubstanzen behandelt wurden. Die unbehandelten Kontrollen sind gestrichelt dargestellt. Um die biologische Wirksamkeit der unterschiedlichen Strahlendosen zu vergleichen, erfolgte die Anpassung der Kurven mittels des Linearquadratischen-Modells. Abgebildet werden Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Versuchen.

Zelllinie	Substanz	PE	SF ₂	D ₁₀	I ₁₀
GaMG	Kontrolle	0.17±0.04	0.74±0.09	7.67±0.81	1.00±0.05
	NVP-BEZ235	0.14±0.02	0.79±0.04	7.69±0.62	
U373-MG	Kontrolle	0.38±0.19	0.64±0.12	6.00±0.51	0.99±0.12
	NVP-BEZ235	0.35±0.16	0.59±0.07	6.12±0.85	
GaMG	Kontrolle	0.14±0.03	0.77±0.12	8.50±1.27	1.05±0.07
	Rapamycin	0.13±0.01	0.80±0.03	8.08±1.17	
U373-MG	Kontrolle	0.33±0.08	0.53±0.07	5.68±0.31	0.92±0.01
	Rapamycin	0.34±0.08	0.56±0.06	6.17±0.31	
GaMG	Kontrolle	0.16±0.00	0.82±0.06	8.78±0.54	0.92±0.00
	Ly-294002	0.13±0.02	0.89±0.04	9.59±0.67	
U373-MG	Kontrolle	0.34±0.08	0.66±0.09	6.47±0.37	0.95±0.00
	Ly-294002	0.31±0.13	0.72±0.07	6.85±0.42	

Tabelle 5: Parameter der klonogenen Überlebensrate

Tabellarisch dargestellt sind die Mittelwerte der Plattierungseffizienz (PE), die Überlebensfraktion (SF₂), die Strahlendosis in Gy, die benötigt wird, um eine Koloniebildungsfähigkeit von 10% zu erreichen (D₁₀) und der Wachstums-Inhibitionsfaktor (I₁₀) mit der jeweiligen Standardabweichung (±). Die Werte beziehen sich auf die Zelllinie GaMG und U373-MG. Diese wurden 24 Stunden vor Bestrahlung mit einem der drei Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt. Gegenübergestellt ist die entsprechende Kontrolle. Die Mittelwerte stammen aus drei bis fünf unabhängigen Versuchen.

In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass U373-MG-Zellen im Vergleich zu GaMG-Zellen fähiger sind, nach Aussaat Kolonien zu bilden. Dieses spiegelt sich in größeren PE-Werten wider (0,38; 0,33; 0,34 vs. 0,17; 0,14; 0,16). Weiterhin weist die *PTEN*-mutierte Zelllinie U373-MG im Vergleich zu GaMG eine höhere Strahlensensibilität auf, was sich durch niedrigere SF₂- (0,64; 0,53; 0,66 vs. 0,74; 0,77; 0,82) und D₁₀-Werte (6,00; 5,68; 6,47 vs. 7,67; 8,50; 8,78) schlussfolgern lässt.

Unter Einfluss des PI3K/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235 zeigt GaMG keine wesentliche Änderung der SF₂ (0,79 vs. 0,74) und der D₁₀ (7,69 vs. 7,67 Gy). Es ergibt sich somit ein I₁₀-Wert von 1,00. Ähnlich verhält sich mit U373-MG. Die SF₂ (0,59 vs. 0,64) und die D₁₀ (6,12 vs. 6,00 Gy) weisen minimale Unterschiede auf, respektive ergibt sich ein I₁₀-Wert von 0,99. Somit liegt keine strahlensensibilisierende Wirkung durch NVP-BEZ235 vor.

Auch Rapamycin sorgt bei GaMG für keine wesentliche Änderung der SF₂ (0,80 vs. 0,77), jedoch für eine geringe Reduzierung der D₁₀ (8,08 vs. 8,50 Gy). Es ergibt sich somit ein I₁₀ von 1,05. Auch U373-MG zeigt unter Einfluss von Rapamycin keine Änderungen der SF₂ (0,56 vs. 0,53). Der D₁₀-Wert ist leicht höher (6,17 vs. 5,69 Gy), sodass I₁₀ bei 0,92 liegt. Somit sorgt die 24-stündige Behandlung durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin bei beiden Zelllinien für eine marginale Veränderung der SF₂ und D₁₀. Deutliche strahlensensibilisierende Effekte können nicht gezeigt werden.

Die Vorbehandlung mit LY294002 führt bei GaMG zu einer geringen Erhöhung der SF₂ (0,89 vs. 0,82) und D₁₀ (9,59 vs. 8,78 Gy). Es ergibt sich somit ein I₁₀ von 0,92. Auch U373-MG zeigt unter Einfluss von Ly294002 eine geringe Erhöhung der SF₂ (0,72 vs. 0,66) und D₁₀ (6,85 vs. 6,47 Gy). Der I₁₀-Wert liegt hier bei 0,95. Zusammenfassend sorgt die 24-stündige Behandlung durch den PI3K-Inhibitor LY294002 bei beiden Zelllinien für eine geringe Erhöhung der SF₂ und D₁₀. Strahlensensibilisierende Effekte können somit nicht gezeigt werden.

Die zuvor beschriebenen Daten verdeutlichen, dass weder durch den Einfluss von NVP-BEZ235, Rapamycin noch durch LY294002 deutliche Verlaufsänderungen der Zellüberlebenskurven nach Bestrahlung gezeigt werden können. Kurven von U373-MG fallen im Vergleich zu GaMG steiler ab, was U373-MG als die strahlensensiblere Zelllinie bestätigt. Zur weiteren kausalen Klärung des Ausbleibens von radiosensibilisierenden Effekten wurde im folgenden Abschnitt die Induktion- und der Abbau von DNS-Schäden untersucht.

3.3 Einfluss der PI3K/mTOR-Inhibition auf den DNS-Schaden

Die DNS-Schädigung in Form von Doppelstrangbrüchen führt zur Phosphorylierung des Serin139-Rests des Histon H2AX. Das entstandene γH2AX kann mit Antikörpern detektiert werden und bildet somit den sensitiven Nachweis eines strahlenbiologisch relevanten Zellschadens. In dem folgenden Abschnitt werden repräsentative Verteilungskurven der γH2AX-Expression und die normierten Mittelwerte der γH2AX-Menge beider Glioblastomzelllinien 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung und voriger Substanzbehandlung beschrieben.

In den repräsentativen Histogrammen wurden in beide Zelllinien direkt nach Bestrahlung die meisten DNS-Schäden induziert, wobei die *PTEN*-mutierte Zelllinie U373-MG im Vergleich zu GaMG höhere Mengen an γH2AX exprimiert. 24 und

48 Stunden nach Bestrahlung erfolgt ein zügiger Abbau der DNS-Schäden. Keine der Testsubstanzen kann eine ausgeprägte Reparaturverzögerung hervorrufen.

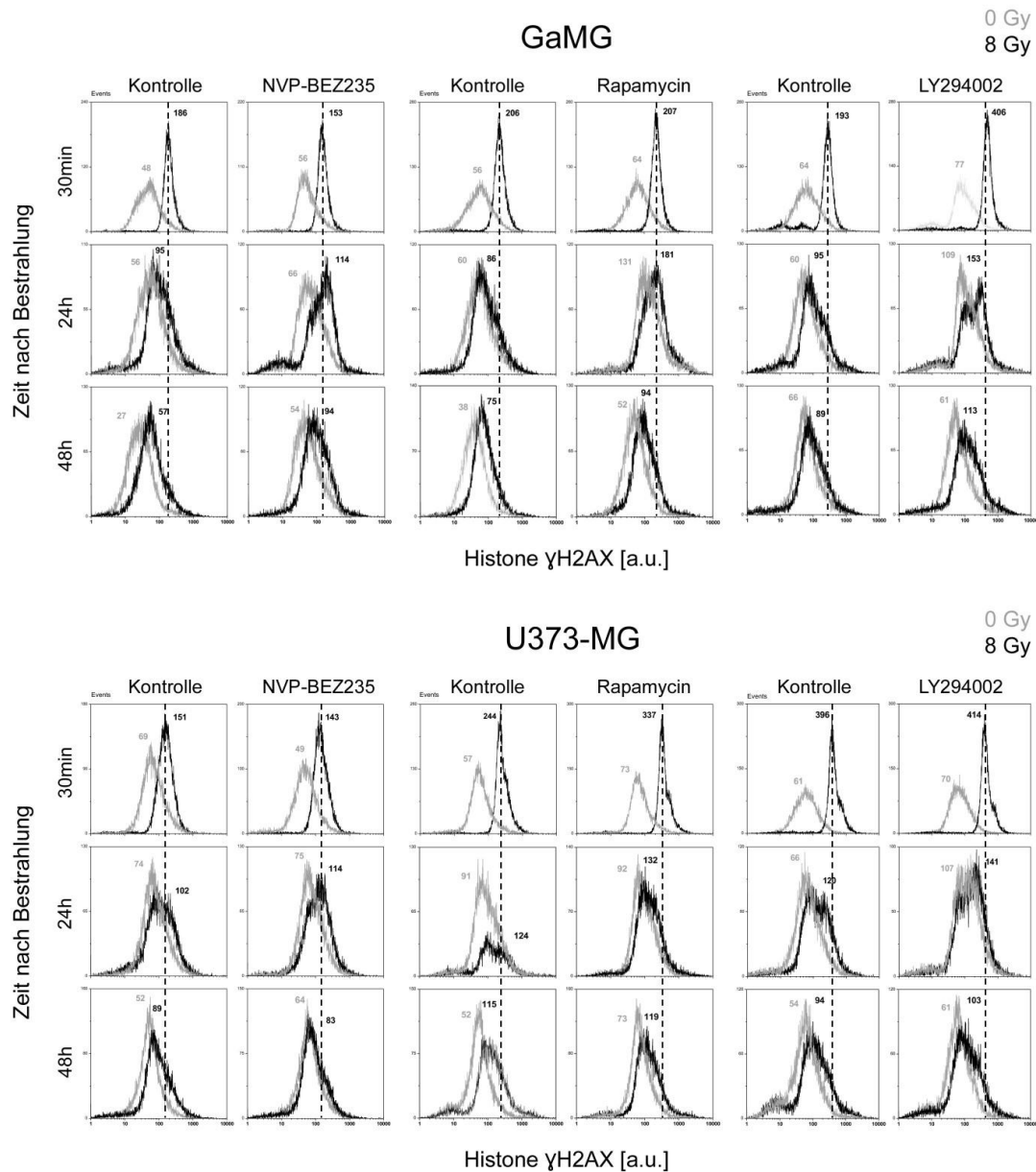


Abbildung 13: Einfluss der PI3K/mTOR-Inhibition auf die DNS-Schäden gemessen mittels der γ H2AX-Expression

Dargestellt sind repräsentative Histogramme der γ H2AX-Expressionen. Es werden die mit NVP-BE235, Rapamycin oder LY294002 vorbehandelten Zelllinien GaMG und U373-MG unterschieden, die 30 Minuten, 24 oder 48 Stunden nach Bestrahlung untersucht wurden. Als Kontrolle dienten die jeweils unbehandelten Proben. Gegenübergestellt sind jeweils eine bestrahlte (schwarzes Histogramm) und eine unbestrahlte Probe (graues Histogramm). Die mittlere γ H2AX-Menge ist jedem Histogramm als Zahl beigefügt. Eine gestrichelte Linie markiert die mittlere γ H2AX-Expression der 30 Minuten nach Bestrahlung ausgewerteten Probe, um mögliche Einflüsse auf die DSB-Reparatur zu visualisieren.

Dies äußert sich im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle in einer ähnlichen Angleichung der initialen Rechts-Links-Verschiebung beider Histogramme (bestrahlt und unbestrahlt).

Weder die kombinierte PI3K/mTOR-Inhibition mit NVP-BEZ235 noch die alleinige mTOR-Inhibition mit Rapamycin führen zu einer höheren Induktion oder zu einem verzögerten Abbau der DNS-Schäden. Einzig der PI3K-Inhibitor LY294002 zeigt 30 Minuten nach Bestrahlung bei der Zelllinie GaMG eine deutlich höhere Induktion von DNS-Schäden im Vergleich zur Kontrolle (406 vs. 193 relative Einheiten). Dieser Effekt war jedoch zunehmend nach 24 Stunden und nahezu komplett nach 48 Stunden rückläufig (113 vs. 89 relative Einheiten).

Beide Zelllinien zeigen erwartungsgemäß die größte Induktion an DNS-Schäden 30 Minuten nach Bestrahlung. Nach 24 und 48 Stunden werden die DNS-Schäden kontinuierlich abgebaut.

Die U373-MG-Linie zeigt durch keinen der Inhibitoren 30 Minuten nach Bestrahlung eine wesentliche höhere Induktion an DNS-Schäden (NVP-BEZ235: 3,31 vs. 3,23; Rapamycin: 5,50 vs. 5,04; Ly294002: 5,32 vs. 5,15). Dies bestätigt sich bei auch für NVP-BEZ235 (3,31 vs. 3,30) und Rapamycin (3,01 vs. 3,24), jedoch

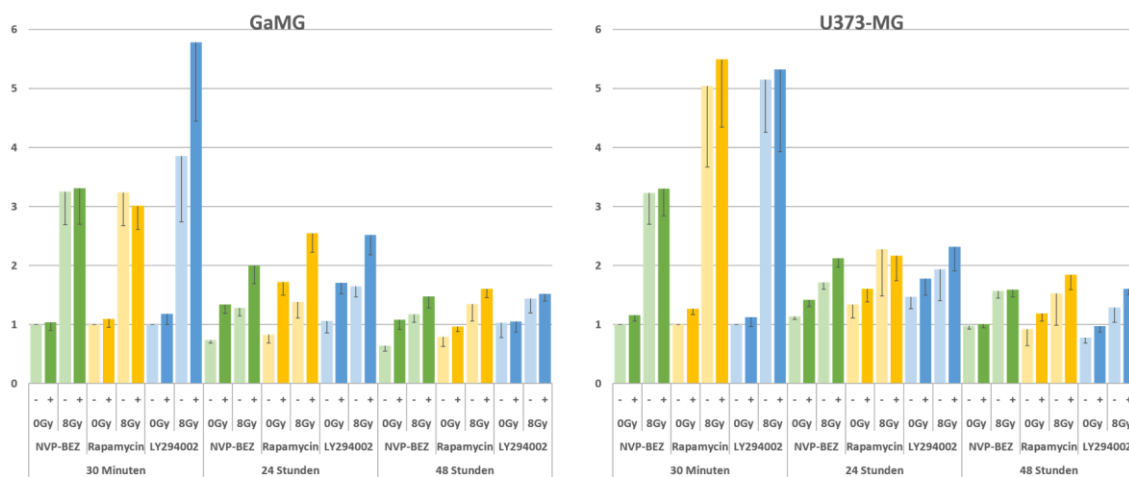


Abbildung 14: Einfluss der PI3K/mTOR-Inhibition auf die γ H2AX-Menge

Dargestellt sind die Mittelwerte der γ H2AX-Expression und deren Standardabweichung. Die Glioblastomzelllinien GaMG und U373-MG wurden für 24 Stunden mit einer der folgenden Substanzen behandelt: NVP-BEZ235 (+/grün), Rapamycin (+/gelb), LY294002 (+/blau). Anschließend erfolgte die Bestrahlung (8 Gy). 30 Minuten, 24 und 48 Stunden danach wurden pro Bedingung 20000 Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrolle dienten jeweils unbestrahlte (0 Gy) und unbehandelte (-/helle Farbe) Zellproben. Normiert wurden die Mittelwerte auf die Kontrolle, die nach 30 Minuten ausgewertet wurde. Die Mittelwerte bilden sich aus vier bis zwölf unabhängigen Versuchen.

führt die alleinige PI3K-Inhibition mit LY294002 zu einer höheren Induktion an DNS-Schäden im Vergleich zur Kontrolle (5,78 vs. 3,85).

Nach 24 Stunden weist GaMG durch alle Testsubstanzen im Vergleich zur unbehandelten Zellprobe einen verzögerten Abbau der DNS-Schäden auf. (NVP-BEZ235: 2,00 vs. 1,28; Rapamycin: 2,54 vs. 1,39; Ly294002: 2,52 vs. 1,65). U373-MG hingegen zeigt im Vergleich zur Kontrolle 24 Stunden nach Bestrahlung nur eine sehr geringe Erhöhung der γ H2AX Expression unter Einfluss der Testsubstanzen (NVP-BEZ235: 2,12 vs. 1,71; Rapamycin: 2,17 vs. 2,27; LY294002: 2,32 vs. 1,94).

Nach 48 Stunden zeigt die mit NVP-BEZ235 und Rapamycin behandelte Zelllinie GaMG im Vergleich zur Kontrolle nur eine geringfügig höhere γ H2AX-Menge (NVP-BEZ235: 1,48 vs. 1,17; Rapamycin: 1,61 vs. 1,34). Die Behandlung mit LY294002 zeigt keine wesentliche Veränderung (LY294002: 1,52 vs. 1,44), sodass kein verzögerter Abbau an DNS-Schäden festzustellen ist. Ebenso zeigt U373-MG im Vergleich zur Kontrolle unter NVP-BEZ235 und Rapamycin keinen wesentlich verzögerten DNS-Abbau (NVP-BEZ235: 1,59 vs. 1,57; Rapamycin: 1,84 vs. 1,53), wobei die Vorbehandlung mit LY294002 zu einem verzögerten Abbau führt (LY294002: 1,61 vs. 1,29).

3.4 Analyse des Proteinexpressionsmusters nach PI3K/mTOR Inhibition und Bestrahlung

Zur weiteren Klärung der Ursachen für ein Ausbleiben von radiosensibilisierenden Effekten wurde im folgenden Schritt der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg mittels quantitativer Proteinanalyse innerhalb unterschiedlicher Zeitfenster untersucht. Hierbei wurde nach Veränderungen des Proteinexpressionsmusters gesucht, um auf molekularer Ebene Ursachen für Effekte der drei Kinaseinhibitoren zur schließen. Die GaMG- und U373-MG-Linie wurden für 24 Stunden mit NVP-BEZ235, LY294002 oder Rapamycin behandelt und anschließend mit 8 Gy bestrahlt. Die Proben wurden 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung untersucht. Die Expressionen diverser Proteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, darunter PI3K mit seinen beiden Untereinheiten p85 und 110 α , PTEN, mTOR, phospho-mTOR (p-mTOR), S6, p-S6, phosphorylierter eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E-Bindungsprotein 1 (p-4E-BP1), Bcl-xL und Caspase 3, werden in

folgenden Unterpunkten beschrieben und in Abbildungen dargestellt. Die einzelnen Proteinexpressionen wurden auf die Expression des β -Aktins normalisiert. Des Weiteren werden die Protein/ β -Aktin-Quotienten der behandelten Zelllinien, mit denen der unbehandelten Kontrollen verglichen (Zelllinie: Untersuchungszeitpunkt nach Bestrahlung: Protein/ β -Aktin-Quotienten nach Behandlung vs. Protein/ β -Aktin-Quotienten Kontrolle).

3.4.1 Expression von PI3Kp85 und PI3Kp110 α Proteinen

PI3K, ein Heterodimer, bestehend aus der katalytischen Subeinheit p110 α und der regulatorischen Einheit p85,⁴⁵ bildet den Gegenspieler des Tumorsuppressorproteins PTEN und wird durch diverse Onkogene und Wachstumsrezeptoren stimuliert.

Beide Zelllinien zeigen unter Vorbehandlung mit NVP-BEZ235 bis 24 Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keinen Effekt auf den PI3Kp85/Aktin-Wert (vgl. Abbildung 15). Anders verhält es sich unter Rapamycin. Die Behandlung mit Rapamycin führt bei beiden Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einem noch nach 48 Stunden nachweisbaren, geringeren PI3Kp85/Aktin-Wert (GaMG: 48 h: 0,56 vs. 0,96; U373-MG: 48 h: 0,73 vs. 0,95) und PI3Kp110 α /Aktin-Wert (GaMG: 48 h: 0,38 vs. 0,65; U373-MG: 48 h: 0,74 vs. 0,82). Auch die Behandlung mit LY294002 führt bei beiden Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle zu einem marginal geringeren PI3Kp85/Aktin- (GaMG: 48 h: 0,58 vs. 0,78; U373-MG: 48 h: 1,15 vs. 1,03) und PI3Kp110 α /Aktin-Wert (GaMG: 48 h: 0,73 vs. 0,78; U373-MG: 48 h: 1,03 vs. 1,04.). Somit zeigt sich unter Einfluss der drei Testsubstanzen und Bestrahlung keine ausgeprägt veränderte Expression von PI3Kp85 und PI3Kp110 α , sodass das stetige Vorhandensein dieser beiden Subeinheiten unter allen Testbedingungen für die folgenden Ergebnisse nachgewiesen ist.

3.4.2 Expression vom PTEN Protein

Der häufig in Glioblastomen mutierte Tumorsuppressor *PTEN* wirkt als Gegenspieler zu PI3K. Durch Dephosphorylierung PIP3 zu PIP2 sorgt PTEN für eine geringere PIP3-Konzentration, die konsekutiv die Aktivierung von AKT, einem

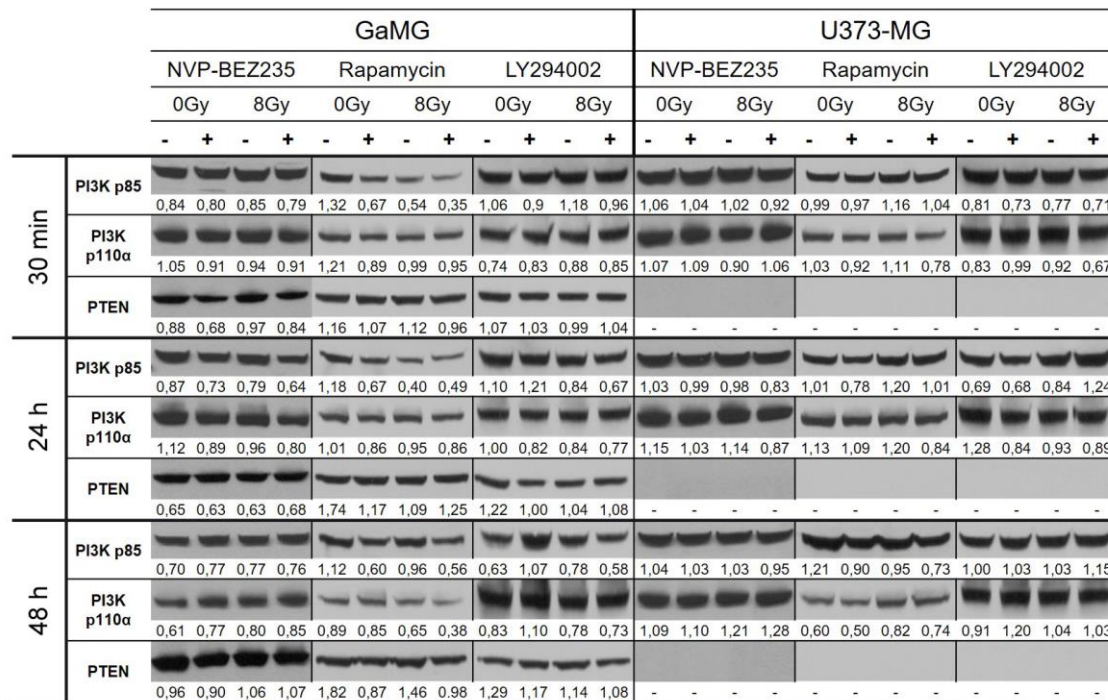


Abbildung 15: Expression von PI3Kp85, PI3Kp110α und PTEN Proteinen

Repräsentative Detektionen der Proteine PI3Kp85, PI3Kp110α und PTEN in der GaMG- und U373-MG-Linie 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung (8 Gy). Die Zelllinien wurden für 24 Stunden mit drei unterschiedlichen Inhibitoren behandelt (+). Unbehandelte (-) und unbestrahlte (0 Gy) Proben dienen als Kontrolle. Die Proteinexpressionen sind auf den jeweiligen β-Aktin-Wert normalisiert und unterhalb der jeweiligen Bande aufgeführt. Ausgewählt wurde aus ein bis drei unabhängige Versuchen.

zentralen Regulator diverser Zellfunktionen, blockiert. Somit nimmt PTEN Einfluss auf den Zellzyklus, die Proteintranslation und die Apoptose.⁴⁶

Im vorliegenden Experiment liegt bei beiden Zelllinien ein unterschiedlicher *PTEN*-Status vor. PTEN ist bei U373-MG unter allen Bedingungen nicht detektierbar, was den Mutationsstatus des Tumorsuppressors unterstreicht. Bei GaMG war PTEN unter allen Bedingungen nachweisbar. Die Expression blieb durch eine Vorbehandlung mit den 3 Testsubstanzen im Vergleich zu alleinig bestrahlten Proben ohne wesentliche Veränderungen (vgl. Abbildung 15).

3.4.3 Expression von mTOR und p-mTOR Proteinen

Die Serin-Threonin-Kinase mTOR und deren aktivierte Form p-mTOR balancieren die Signalregulation des Energiemetabolismus, der Nährstoffsituation und des Zellwachstums.^{47,48} Die Regulation innerhalb des PI3K/AKT-Signalwegs erfolgt mitunter über den Tuberöse-Sklerose-1/2-Komplex (TSC1/2) und AKT.

mTOR reguliert die Proliferation über S6 und die Proteintranslation über 4E-BP1 (vgl. Abbildung 5).^{13,33}

Beide Zelllinien weisen unter allen Bedingungen eine relativ gleichmäßige Expression von mTOR auf. Dies weist das stetige Vorhandensein von mTOR unter allen Testbedingungen innerhalb beider Zelllinien nach (vgl. Abbildung 16).

30 Minuten nach Bestrahlung zeigt die mit NVP-BEZ235 behandelte Zelllinie GaMG im Vergleich zur Kontrolle einen etwas höheren p-mTOR/Aktin-Wert. (GaMG: 30 min: 0,80 vs. 0,52). Nach 24 und 48 Stunden gleichen sich die Werte der Kontrolle wieder an (GaMG: 24 h: 0,97 vs. 0,91; GaMG: 48 h: 0,96 vs. 0,92). Bei bestrahlten U373-MG bewirkt NVP-BEZ235 im Vergleich zur Kontrolle nur in den 24-Stunden-Proben einen leicht höheren p-mTOR/Aktin-Wert (U373-MG: 24 h: 1,22 vs. 0,92). Somit lässt sich sagen, dass die 24-stündige Vorbehandlung mit dem PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 und eine anschließende Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung zu keiner ausgeprägten Depletion des aktiven mTORs (p-mTOR) und damit der mTOR-Aktivität führt. 24 h nach alleiniger Behandlung mit Rapamycin reduziert sich die Expression p-mTORs im Vergleich zur Kontrolle leicht (GaMG: 30 min: 0,97 vs. 1,20; U373-MG: 30 min: 0,66

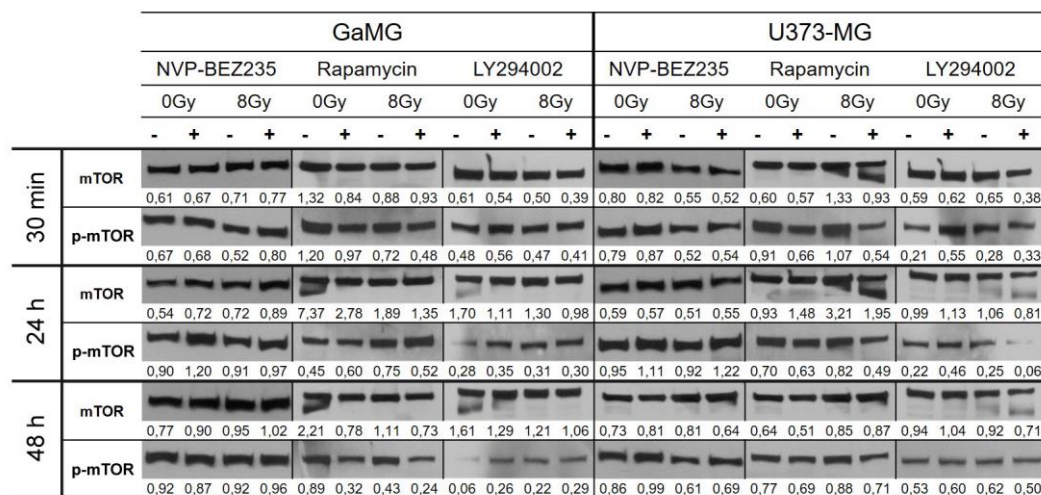


Abbildung 16: Expression von mTOR und p-mTOR Proteinen

Repräsentative Detektionen der Proteine mTOR und p-mTOR in der GaMG- und U373-MG-Linie 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung (8 Gy). Die Zelllinien wurden für 24 Stunden mit drei unterschiedlichen Inhibitoren behandelt (+). Unbehandelte (-) und unbestrahlte (0 Gy) Proben dienen als Kontrolle. Die Proteinexpressionen sind auf den jeweiligen β -Aktin-Wert normalisiert und unterhalb der jeweiligen Bande aufgeführt. Ausgewählt wurde aus ein bis drei unabhängigen Versuchen.

vs. 0,91). Dieser Effekt zeigt sich auch unter der Kombination mit einer Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle (GaMG: 30 min: 0,48 vs. 0,72; U373-MG: 30 min: 0,54 vs. 1,07). Die Reduzierung des p-mTOR/Aktin-Werts ist bei GaMG durch Rapamycin auch noch nach 48 Stunden und bei U373-MG bis 24 Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zu Kontrollzellen nachweisbar (GaMG: 48 h: 0,24 vs. 0,43; U373-MG: 24 h: 0,49 vs. 0,82). Unter LY294002 sind keine Veränderungen des Expressionsmusters von p-mTOR erkennbar.

3.4.4 Expression von S6, p-S6 und p-4E-BP1 Proteinen

Das ribosomale Protein S6 bildet einen Bestandteil der ribosomalen Untereinheit 40S und fungiert als Regulator des Zellwachstums und der Proliferation.^{8,49} Die aktivierte Form phospho-S6 (p-S6) bildet das Hauptsubstrat der ribosomalen Proteinkinasen und dient somit als Proliferationsmarker.

Das hypophosphorylierte Translations-Repressor-Protein 4E-BP1 reguliert den Großteil der Cap-abhängigen Proteintranslation. Die Phosphorylierung durch mTOR zur phospho-4E-BP1 (p-4E-BP1) sorgt für die Initiierung der Cap-abhängigen Transkription, sodass über weitere Schritte die Proteintranslation initiiert wird⁴⁹. Somit stellt p-4E-BP1 einen Translationsfaktor dar. Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss dreier Testsubstanzen (PI3K-, mTOR-, und kombinierter PI3K/mTOR-Inhibitor) in Kombination mit Bestrahlung auf die Expression des Proliferationsmarkers p-S6 und des Transkriptionsfaktors p-4E-BP1 beschrieben. Unter dem Einfluss von NVP-BEZ235 zeigen die GaMG- und U373-MG-Linie 30 Minuten nach Bestrahlung geringere S6/Aktin-Werte als die jeweilige Kontrolle (GaMG: 30 min: 0,69 vs. 0,91; U373-MG: 30 min: 0,57 vs. 0,77). Bei GaMG zeigt sich noch 48 Stunden nach Bestrahlung eine geringere Expression an S6 (GaMG: 48 h: 0,42 vs. 0,70). Bei U373-MG hingegen zeigen sich die Werte schon nach 24 Stunden an die Kontrollzellen angeglichen und nach 48 Stunden sogar minimal hochreguliert (U373-MG: 48 h: 0,58 vs. 0,40). Auch unter dem Einfluss von Rapamycin zeigen die GaMG- und U373-MG-Linie 30 Minuten nach Bestrahlung geringere S6/Aktin-Werte als die jeweilige Kontrolle (GaMG: 30 min: 0,49 vs. 0,72; U373-MG: 30 min: 0,62 vs. 0,93). 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung und Vorbehandlung mit Rapamycin bleibt die geringere Expression von S6 im Vergleich zur Kontrolle bei beiden Zelllinien fortbestehend (GaMG 48 h 0,50 vs. 0,92 U373-MG 48 h 0,65 vs. 0,81).

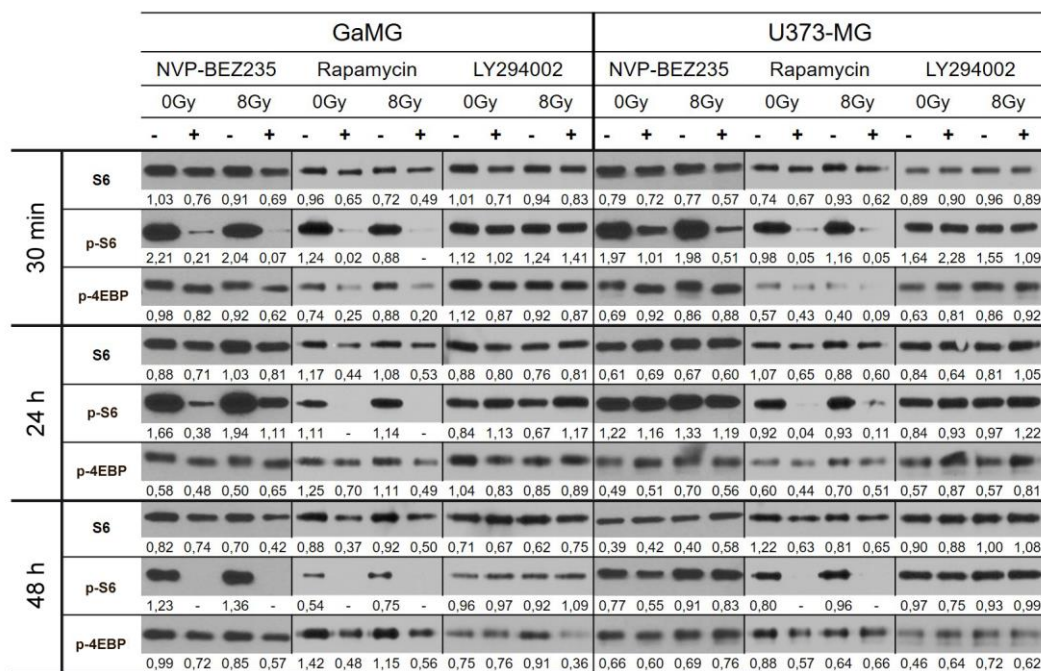


Abbildung 17: Expression von S6, p-S6 und p-4E-BP1 Proteinen

Repräsentative Detektionen der Proteine S6, p-S6 und p-4E-BP1 in der GaMG- und U373-MG-Linie 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung (8 Gy). Die Zelllinien wurden für 24 Stunden mit drei unterschiedlichen Inhibitoren behandelt (+). Unbehandelte (-) und unbestrahlte (0 Gy) Proben dienen als Kontrolle. Die Proteinexpressionen sind auf den jeweiligen β -Aktin-Wert normalisiert und unterhalb der jeweiligen Bande aufgeführt. Ausgewählt wurde aus ein bis drei unabhängige Versuchen.

Unter LY294002 zeigen beide bestrahlten Zelllinien im Vergleich zu Kontrollzellen nur marginale Veränderungen des S6/Aktin-Werts (GaMG: 30 min: 0,83 vs. 0,94; U373-MG: 30 min: 0,89 vs. 0,96). Bei beiden Zelllinien zeigen sich die S6-Aktin-Werte nach 24 Stunden zur Kontrolle weiter angleichend und nach 48 Stunden sogar geringgradig höher (GaMG: 48 h: 0,75 vs. 0,62; U373-MG: 48 h: 1,08 vs. 1,00). Zusammenfassend sorgt Rapamycin bei beiden bestrahlten Zelllinien und NVP-BEZ235 nur bei der bestrahlten GaMG-Linie für eine geringe Reduktion der Expression von S6, was Hinweise auf einen möglichen Verbrauch von S6 durch Phosphorylierung p-S6 gibt.

Konkordant zu dieser Behauptung zeigt sich die Expression des phosphorylierten S6. Der Dualkinase-Inhibitor NVP-BEZ235 sorgt bei bestrahlten GaMG-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen noch nach 48 Stunden für eine komplette Depletion von p-S6. Bei der bestrahlten U373-MG-Linie sorgt NVP-BEZ235 30 Minuten nach Bestrahlung im Vergleich zu Kontrollzellen für eine inkomplette Depletion

(U373-MG: 30 min 0,51 vs. 1,98), welche nach 24 Stunden zum größten Teil schon reversibel ist (U373-MG: 24 h: 1,19 vs. 1,98).

Rapamycin ruft in Kombination mit einer Bestrahlung bei beiden Zelllinien 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Behandlung eine komplette Depletion von p-S6 hervor. Unter LY294002 zeigen GaMG-Zellen 30 Minuten nach Bestrahlung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle eine geringe Erhöhung des p-S6/Aktin-Werts (GaMG: 30 min: 1,41 vs. 1,24), der nach 24 Stunden noch etwas zunimmt (GaMG: 24 h: 1,17 vs. 0,67) und sich nach 48 Stunden wieder angleicht (GaMG: 48 h: 1,09 vs. 0,92). Bei der U373-MG-Linie zeigt der Einfluss von LY294002 30 Minuten nach Bestrahlung im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle einen niedrigeren p-S6/Aktin-Wert (U373-MG: 30 min: 1,09 vs. 1,55), der nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle geringgradig höher ausfällt (U373-MG: 24 h: 1,22 vs. 0,97) und sich nach 48 Stunden der Kontrolle wieder angleicht (U373-MG: 48 h: 0,99 vs. 0,93). Zusammenfassend sorgt Rapamycin und NVP-BEZ235 nur bei GaMG in Kombination mit einer Bestrahlung für eine irreversible Depletion an p-S6, was auf eine starke Verringerung der Proliferation schließen lässt. Unter NVP-BEZ235 zeigt sich bei GaMG 30 Minuten und 48 Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zu Kontrollzellen eine geringe Reduzierung an p-4E-BP1 (GaMG: 30 min: 0,62 vs. 0,92, 48 h 0,57 vs. 0,85). Auf U373-MG zeigt sich keine Wirkung. Unter Rapamycin zeigen beide Zelllinien 30 Minuten nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle eine starke Reduktion der p-4E-BP1 Expression (GaMG: 30 min: 0,20 vs. 0,88; U373-MG: 30 min: 0,09 vs. 0,40). Dieser Effekt bleibt bei der GaMG-Linie auch nach 48 Stunden bestehen (GaMG: 48 h: 0,56 vs. 1,15). Im Gegenteil dazu normalisiert sich bei U373-MG nach 48 Stunden der p-4E-BP1/Aktin-Wert (U373-MG: 48 h: 0,66 vs. 0,64). LY294002 hingegen ruft bei der bestrahlten GaMG- und U373-MG-Linie keine deutlichen Veränderungen der Expression von p-4E-BP1 hervor.

Zusammenfassend verursacht NVP-BEZ235 bei bestrahlten GaMG-Zellen eine geringe Reduktion des Transkriptionsfaktors. Rapamycin sorgt bei der bestrahlten GaMG-Linie für eine irreversible und bei U373-MG-Linie für eine reversible Reduktion des Transkriptionsfaktors p-4E-BP1. LY294002 zeigt keinen Effekt auf die Expression von p-4E-BP1.

3.4.5 Expression von Bcl-xL und Caspase 3 Proteinen

Die Bcl-Familie besteht aus verschiedenen apoptoseregulierenden Proteinen, die in pro- und antiapoptotischen Regulationsproteinen unterteilt werden. Eines der antiapoptotischen Regulationsproteine ist Bcl-xL. Es stabilisiert die mitochondriale Membran und verhindert die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und wirkt der Apoptose entgegen.²⁹

Des Weiteren wird die Apoptose durch die Aktivierung einer Reihe von Cysteinproteasen, sogenannte Caspasen, begleitet. Sie sorgen für einen geregelten Abbau der Zellbestandteile. Innerhalb einer Cysteinproteasen-Kaskade erfolgt zunächst die Aktivierung der Initiator-Caspasen, die wiederum spalten inaktive Procaspasen, die sog. Effektor-Caspasen, was zu einer Aktivierung dieser führt. Eine elementare Effektor-Caspase ist Caspase 3. Sie wird am Ende der Caspasen-Kaskade aktiviert und bildet somit eine ausführende Rolle in Bezug auf die Apoptose.²⁹ Um Rückschlüsse auf die Apoptose zu ziehen, erfolgt im folgenden Schnitt die Proteinanalyse der Apoptosemarker Bcl-xL und der inaktiven Procaspase Caspase 3.

Direkt nach der 24-stündigen Behandlung mit NVP-BEZ235 exprimieren beide Zelllinien in Kombination mit Bestrahlung geringgradig mehr Bcl-xL als die Kontrollzellen (GaMG: 30 min: 1,28 vs. 0,98; U373-MG: 30 min: 1,26 vs. 0,90). Die leichte Expressionserhöhung passt sich bei GaMG nach 48 Stunden und bei U373-MG schon nach 24 Stunden der Kontrolle an (GaMG: 48 h: 0,96 vs. 0,99; U373-MG: 24 h: 1,13 vs. 1,04). Diese Expressionsveränderung spricht für geringgradige antiapoptotische Tendenzen durch die Vorbehandlung mit NVP-BEZ235. Rapamycin hingegen sorgt in beiden Zelllinien bis 48 Stunden nach Bestrahlung für einen geringen Rückgang der Expression von Bcl-xL (GaMG: 48 h: 0,72 vs. 1,03; U373-MG: 48 h: 0,42 vs. 0,70). Dieser leichte Expressionsrückgang spricht für einen minimalen proapoptotischen Effekt durch die Vorbehandlung mit Rapamycin. LY294002 zeigt keine relevanten Änderungen der Expression von Bcl-xL und somit weder eine Tendenz zu einem pro- oder antiapoptotischen Effekt. Der Apoptose-Effektors Caspase 3 zeigt unabhängig von Bestrahlung und Anwendung der Versuchssubstanzen keine Veränderungen seiner Expression innerhalb beider Zelllinien. Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass die Bcl-xL-Expression durch Rapamycin eine geringe proapoptotische und durch NVP-BEZ235 eine minimale antiapoptotische Tendenz aufweist. Da jedoch in

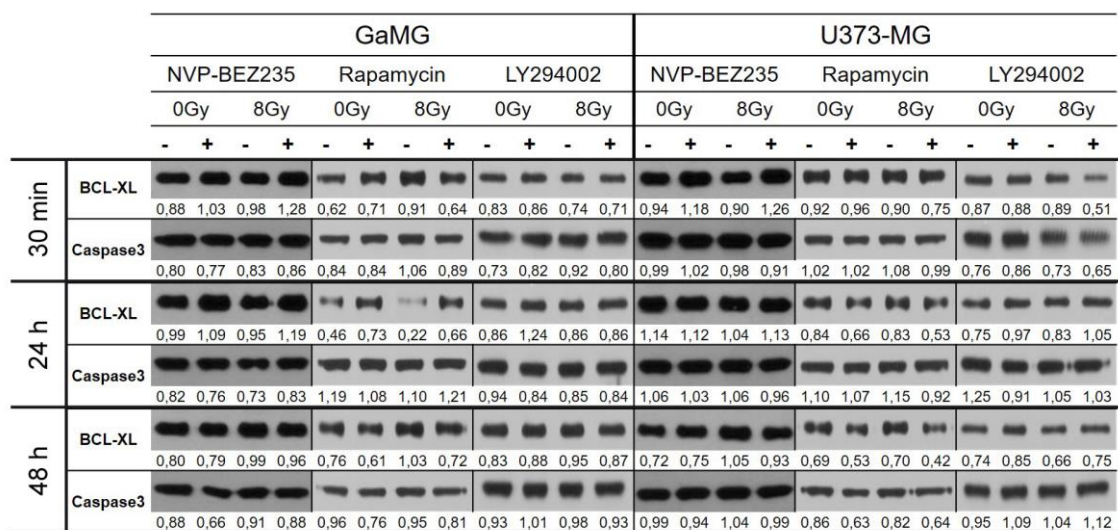


Abbildung 18: Expression von Bcl-xL und Caspase 3 Proteinen

Repräsentative Detektionen der Proteine Bcl-xL und Caspase-3 in der GaMG- und U373-MG-Linie 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung (8 Gy). Die Zelllinien wurden für 24 Stunden mit drei unterschiedlichen Inhibitoren behandelt (+). Unbehandelte (-) und unbestrahlte (0 Gy) Proben dienen als Kontrolle. Die Proteinexpressionen sind auf den jeweiligen β -Aktin-Wert normalisiert und unterhalb der jeweiligen Bande aufgeführt. Ausgewählt wurde aus ein bis drei unabhängigen Versuchen.

keinem der Fälle eine verminderte Expression der inaktiven Procaspase 3 vorliegt, kann diese Tendenz nicht bestätigt werden.

3.5 Einfluss einer PI3K/mTOR-Inhibition sowie einer Bestrahlung auf den Zellzyklus

Zur weiteren Klärung des Ausbleibens von radiosensibilisierenden Effekten durch die Vorbehandlung mit den drei Testsubstanzen erfolgte im Folgenden die Zellzyklusanalyse. Mittels Durchflusszytometrie wurde quantitativ die Zellzyklusphasen gemessen. Pro Bedingung wurde der DNS-Gehalt von jeweils 20000 Zellen gemessen. Im folgenden Abschnitt werden die Mittelwerte durchflusszytometrisch gemessener prozentualer Zellzyklusverteilungen zweier bestrahlter Glioblastomzelllinien mit unterschiedlichem *PTEN*-Status (U373-MG *PTEN* mut; GaMG *PTEN* wt) untersucht. Die Auswirkungen einer 24-stündigen Behandlung mittels NVP-BEZ235 oder Rapamycin oder LY294002 vor Bestrahlung wird im folgenden Abschnitt tabellarisch dargestellt und beschrieben.

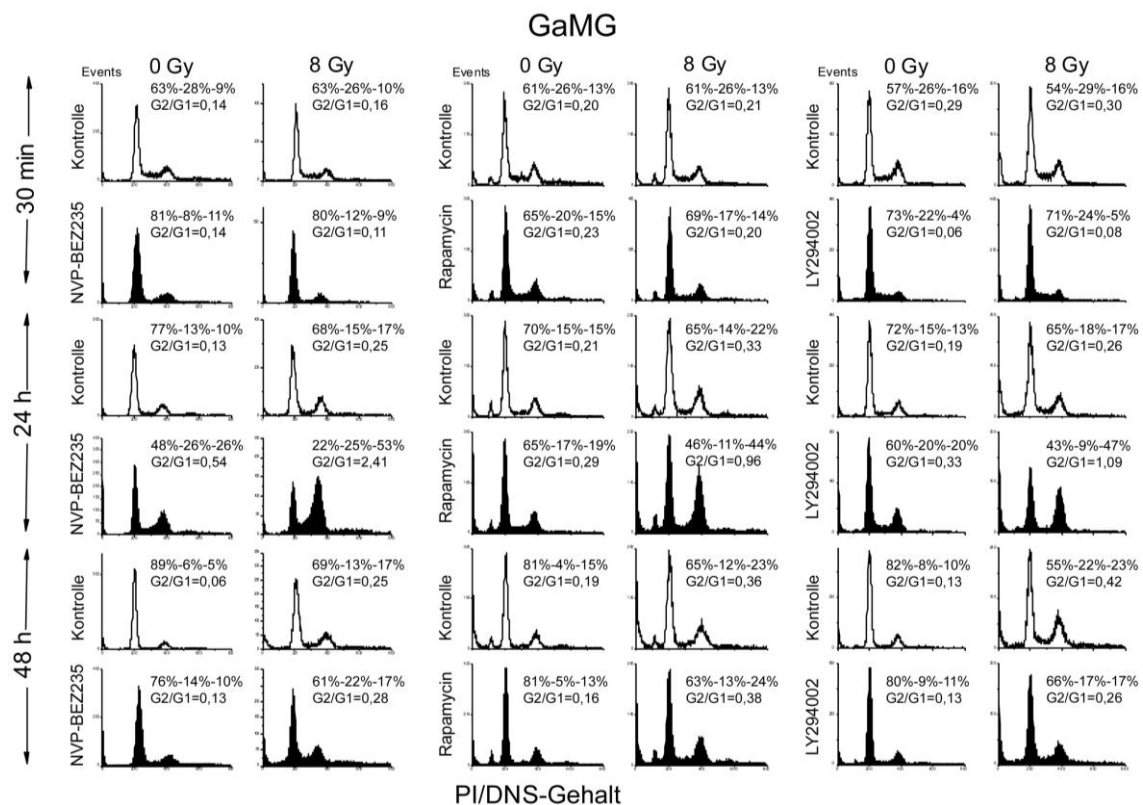


Abbildung 19: Repräsentative Zellzyklusverteilung der Zelllinie GaMG nach Vorbehandlung mit NVP-BEZ235, Rapamycin und LY294002 und Bestrahlung

Dargestellt sind repräsentative Zellzyklusverteilungen der Glioblastomzelllinie GaMG. Die Zellproben wurden für 24 Stunden entweder mit NVP-BEZ235 oder Rapamycin oder LY294002 behandelt (gefüllte Histogramme). Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit 8 Gy. 30 Minuten, 24 und 48 Stunden danach wurde der DNS-Gehalt von jeweils 20000 Zellen pro Bedingung gemessen. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen (ungefüllte Histogramme). Zusätzlich zur graphischen Darstellung der Zellzyklusverteilung sind jeweils die prozentualen Anteile der G1-, S-, G2-Fraktion und der G2/G1-Quotient dargestellt.

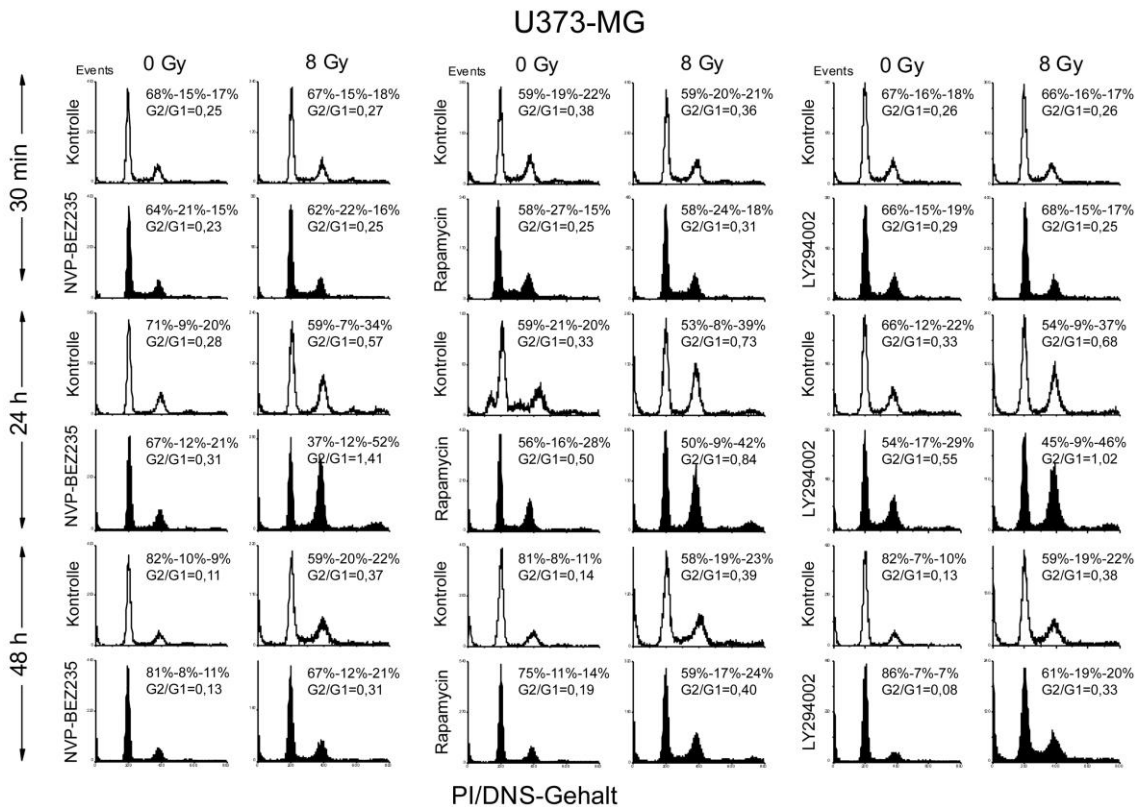


Abbildung 20: Repräsentative Zellzyklusverteilung der Zelllinie U373-MG nach Vorbehandlung mit NVP-BE2235, Rapamycin und LY294002 und Bestrahlung

Dargestellt sind repräsentative Zellzyklusverteilungen der Glioblastomzelllinie U373-MG. Die Zellproben wurden für 24 Stunden entweder mit NVP-BE2235 oder Rapamycin oder LY294002 behandelt (gefüllte Histogramme). Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit 8 Gy. 30 Minuten, 24 und 48 Stunden danach wurde der DNS-Gehalt von jeweils 20000 Zellen pro Bedingung gemessen. Als Kontrolle dienen jeweils unbehandelte Zellen (ungefüllte Histogramme). Zusätzlich zur graphischen Darstellung der Zellzyklusverteilung sind jeweils die prozentualen Anteile der G1-, S-, G2-Fraktion und der G2/G1-Quotient dargestellt.

3.5.1 Zellzyklusverteilung 30 Minuten nach Bestrahlung

30 Minuten nach alleiniger Bestrahlung zeigen beide Zelllinien im Vergleich zu unbestrahlten Proben keine Veränderung der Zellzyklusverteilung.

Anders verhält es sich unter einer alleinigen Behandlung mit den verschiedenen Testsubstanzen. GaMG weist unter dem Einfluss des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors NVP-BE2235 einen G1-Arrest auf, dabei steigt der G1-Anteil von 60 auf 79%. Ebenso bewirkt der PI3K-Inhibitor LY294002 bei GaMG einen G1-Arrest, dabei steigt der G1-Anteil von 59 auf 74%. Zudem verringert sich der Anteil an Zellen in der G2-Phase, was sich durch einen Abfall des G2-Anteils von 14 auf 8% bemerkbar macht. Geringer fällt die Steigerung des prozentualen G1-Anteils durch die alleinige mTOR-Inhibition mit Rapamycin aus. Der G1-Anteil steigt von 58 auf 66%.

Anders verhält es sich mit der *PTEN*-mutierten Zelllinie U373-MG. Keine der drei Testsubstanzen sorgt hier für eine wesentliche Änderung der Zellzyklusverteilung.

3.5.2 Zellzyklusverteilung 24 Stunden nach Bestrahlung

24 Stunden nach alleiniger Bestrahlung haben beide Zelllinien im Vergleich zu unbestrahlten Proben einen geringeren Anteil an Zellen in der G1- und einen höheren Anteil an Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus.

24 Stunden nach Abschluss der alleinigen Behandlung mit NVP-BEZ235 sinkt bei der GaMG-Linie der Anteil an Zellen in der G1-Phase von 73% auf 48%. Hingegen steigt der Anteil an Zellen in der G2-Phase von 9 auf 23%. Bei den bestrahlten Proben sinkt der G1-Anteil von 65% auf 27% und der G2-Anteil steigt von 17 auf 51%, sodass ein G2-Arrest vorliegt. Unter Behandlung mit LY294002 sinkt bei GaMG der G1-Anteil von 73% auf 60% und der G2-Anteil steigt von 13 auf 22%. Unter Bestrahlung zeigt sich dieser Effekt verstärkt. Der G1-Anteil sinkt von 65% auf 42% und der G2-Anteil steigt von 19 auf 49%, sodass auch hier ein G2-Arrest vorliegt. Wesentlich geringer ausgeprägt zeigt sich die Wirkung von Rapamycin. Der G1-Anteil sinkt von 71% auf 67% und der G2-Anteil steigt von 12 auf 15%. Dieser Effekt fällt bei bestrahlten Proben stärker, jedoch im Vergleich zu NVP-BEZ235 und Ly294002 schwächer aus. Der G1-Anteil sinkt von 61% auf 49% und der G2-Anteil steigt von 21 auf 41%.

Unter der alleinigen Behandlung mit NVP-BEZ235 sinkt bei der U373-MG-Linie der Anteil an Zellen in der G1-Phase von 68% auf 62%. Hingegen steigt der Anteil an Zellen in der G2-Phase von 21 auf 23%. Bei den bestrahlten Proben sinkt der G1-Anteil von 57% auf 37% und der G2-Anteil steigt von 35 auf 49%, sodass ein leichter G2-Arrest vorliegt. Unter alleiniger Behandlung mit LY294002 zeigt die U373-MG-Linie im Vergleich zur GaMG-Linie eine ähnliche Veränderung der Zellzyklusverteilung. Der G1-Anteil sinkt von 63% auf 51% und der G2-Anteil steigt von 23 auf 30%. Eine zusätzliche Bestrahlung lässt den G1-Anteil von 55 auf 46% sinken sowie den G2-Anteil von 36 auf 45% steigen. Eine alleinige Behandlung mit Rapamycin sowie die Kombination mit Bestrahlung zeigen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle bei der U373-MG-Linie keine Änderung der G1- und G2-Phasen des Zellzyklus.

3.5.3 Zellzyklusverteilung 48 Stunden nach Bestrahlung

48 Stunden nach Bestrahlung zeigen bestrahlte unbehandelte Zellen beider Linien im Vergleich zu unbestrahlten Zellproben einen geringeren Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und einen höheren Anteil an Zellen in der G2-Phase, sodass ein G2-Arrest vorliegt.

Unbestrahlte und mit NVP-BEZ235 vorbehandelte GaMG-Zellen zeigen einen geringeren Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus im Vergleich zur Kontrollzellen. Der G1-Anteil sinkt von 87 auf 81%. Hingegen zeigen bestrahlte und mit NVP-BEZ235 vorbehandelte GaMG-Zellen einen geringeren Anteil an Zellen in der G2-Phase. Weder unbestrahlte noch bestrahlte GaMG-Zellen zeigen durch die Vorbehandlung mit Rapamycin ausgeprägten Veränderungen der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus. GaMG-Zellen, die mit LY294002 behandelt wurden, zeigen keine Veränderung der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus, hingegen führt eine zusätzliche Bestrahlung bei GaMG-Zellen für einen Anstieg an Zellen in der G1-Phase von 59 auf 66% und einen geringen Abfall an Zellen in der G2-Phase von 22 auf 17%.

Mit NVP-BEZ235 oder Rapamycin behandelte U373-MG-Zellen zeigen unabhängig von der Bestrahlung keine wesentliche Änderung der G1- und G2-Phasen. Hingegen steigt bei U373-MG-Zellen, die alleinig mit LY294002 behandelt wurden, der G1-Anteil von 74 auf 81%. Eine zusätzliche Bestrahlung zeigt keine wesentlichen Veränderungen der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus.

GaMG	Dosis	Substanz	G1	S	G2	G2/G1	
30 Minuten	0Gy	Kontrolle	60±6	28±4	12±4	0,20	
		NVP-BEZ235	79±3	11±4	9±4	0,12	
	8Gy	Kontrolle	61±7	27±5	12±5	0,19	
		NVP-BEZ235	79±3	13±5	8±3	0,10	
	0Gy	Kontrolle	58±7	30±4	13±4	0,23	
		Rapamycin	66±11	21±7	13±5	0,20	
	8Gy	Kontrolle	59±6	29±3	13±3	0,22	
		Rapamycin	68±11	20±8	12±3	0,18	
	0Gy	Kontrolle	59±3	27±2	14±2	0,24	
		LY294002	74±3	18±6	8±3	0,10	
	8Gy	Kontrolle	58±6	28±3	14±2	0,25	
		LY294002	75±7	18±7	7±1	0,09	
	24 Stunden	0Gy	Kontrolle	73±6	18±5	9±3	0,13
			NVP-BEZ235	48±13	25±5	23±4	0,48
8Gy		Kontrolle	65±6	17±4	17±4	0,27	
		NVP-BEZ235	27±9	22±5	51±9	1,90	
0Gy		Kontrolle	71±9	18±5	12±5	0,16	
		Rapamycin	67±7	18±5	15±4	0,23	
8Gy		Kontrolle	61±9	18±6	21±6	0,34	
		Rapamycin	49±10	11±2	41±10	0,84	
0Gy		Kontrolle	73±11	14±6	13±5	0,18	
		LY294002	60±4	19±3	22±5	0,37	
8Gy		Kontrolle	65±5	15±4	19±3	0,30	
		LY294002	42±4	8±2	49±3	1,17	
48 Stunden	0Gy	Kontrolle	87±4	6±3	8±2	0,09	
		NVP-BEZ235	81±4	10±3	10±2	0,12	
	8Gy	Kontrolle	66±8	12±6	22±4	0,34	
		NVP-BEZ235	65±4	19±4	17±2	0,26	
	0Gy	Kontrolle	84±6	7±4	10±7	0,11	
		Rapamycin	86±4	6±2	8±3	0,10	
	8Gy	Kontrolle	65±9	11±5	24±6	0,37	
		Rapamycin	61±8	17±3	23±7	0,38	
	0Gy	Kontrolle	81±1	9±1	10±0	0,12	
		LY294002	80±4	10±2	10±3	0,13	
	8Gy	Kontrolle	59±4	19±3	22±1	0,36	
		LY294002	66±3	18±2	17±3	0,25	

Tabelle 6: Prozentualer Anteil der Zellzyklusphasen unbehandelter sowie behandelter GaMG-Zellen mit und ohne Bestrahlung

Tabellarisch dargestellt sind die Mittelwerte der prozentualen Zellzyklusverteilung der Zelllinie GaMG und nachstehend deren Standardabweichung (\pm) und der G2/G1-Quotient. Pro Versuch wurden 20000 Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Messungen erfolgten 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy. Die Zellproben wurden zuvor für 24 Stunden mit NVP-BEZ235 (dualer PI3K/mTOR-Inhibitor) oder Rapamycin (mTOR-Inhibitor) oder LY294002 (PI3K-Inhibitor) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellproben. Die Daten stammen aus vier bis elf unabhängigen Versuchen.

U373-MG	Dosis	Substanz	G1	S	G2	G2/G1	
30 Minuten	0Gy	Kontrolle	67±6	17±3	16±5	0,24	
		NVP-BEZ235	65±11	19±7	16±4	0,24	
	8Gy	Kontrolle	65±5	18±3	17±5	0,26	
		NVP-BEZ235	62±10	21±6	17±5	0,27	
	0Gy	Kontrolle	62±11	19±7	20±4	0,32	
		Rapamycin	57±10	23±6	20±5	0,34	
	8Gy	Kontrolle	60±9	20±6	21±3	0,35	
		Rapamycin	57±8	23±5	20±4	0,35	
	0Gy	Kontrolle	63±5	18±3	20±2	0,32	
		LY294002	66±3	15±3	19±2	0,28	
	8Gy	Kontrolle	63±4	17±3	20±2	0,32	
		LY294002	66±4	16±2	18±2	0,27	
	24 Stunden	0Gy	Kontrolle	68±7	12±2	21±5	0,31
			NVP-BEZ235	62±5	15±2	23±3	0,37
8Gy		Kontrolle	57±8	8±3	35±6	0,62	
		NVP-BEZ235	37±8	14±3	49±8	1,31	
0Gy		Kontrolle	57±8	16±6	28±7	0,49	
		Rapamycin	57±2	15±1	28±3	0,49	
8Gy		Kontrolle	47±15	10±2	44±13	0,95	
		Rapamycin	46±8	11±2	44±6	0,95	
0Gy		Kontrolle	63±2	14±2	23±2	0,37	
		LY294002	51±4	19±3	30±2	0,59	
8Gy		Kontrolle	55±3	9±1	36±3	0,66	
		LY294002	46±6	9±1	45±7	0,97	
48 Stunden		0Gy	Kontrolle	82±3	8±1	10±3	0,12
			NVP-BEZ235	79±3	9±2	12±2	0,15
	8Gy	Kontrolle	63±8	16±4	22±5	0,35	
		NVP-BEZ235	64±5	15±3	21±3	0,33	
	0Gy	Kontrolle	78±4	8±2	14±5	0,18	
		Rapamycin	76±2	11±1	14±2	0,18	
	8Gy	Kontrolle	56±11	21±12	23±3	0,40	
		Rapamycin	60±5	16±2	24±4	0,40	
	0Gy	Kontrolle	74±12	7±1	11±3	0,14	
		LY294002	83±3	7±1	11±3	0,13	
	8Gy	Kontrolle	61±3	17±1	23±3	0,37	
		LY294002	60±1	18±1	23±2	0,38	

Tabelle 7: Prozentualer Anteil der Zellzyklusphasen unbehandelter sowie behandelter U373-MG-Zellen mit und ohne Bestrahlung

Tabellarisch dargestellt sind die Mittelwerte der prozentualen Zellzyklusverteilung der Zelllinie U373-MG und nachstehend deren Standardabweichung (\pm) und der G2/G1-Quotient. Pro Versuch wurden 20000 Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Messungen erfolgten 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy. Die Zellproben wurden zuvor für 24 Stunden mit NVP-BEZ235 (dualer PI3K/mTOR-Inhibitor) oder Rapamycin (mTOR-Inhibitor) oder LY294002 (PI3K-Inhibitor) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellproben. Die Daten stammen aus vier bis elf unabhängigen Versuchen.

3.5.4 Zusammenfassung der Zellzyklusveränderungen nach einer PI3K/mTOR-Inhibition und Bestrahlung

Postradiogene Veränderungen der Zellzyklusverteilung äußern sich in beiden Zelllinien ab 24 bis 48 Stunden nach Bestrahlung in Form eines G2-Arrests.

Die alleinige Behandlung mit NVP-BEZ235 verursacht bei GaMG einen deutlichen G1 Arrest. Ähnlich, jedoch geringer ausgeprägt, verhält es sich unter der Behandlung mit Rapamycin oder LY294002. Diese G1-Arreste zeigen sich 24 und 48 Stunden nach Auswaschen der Testsubstanzen reversibel. Die Zellzyklusverteilung normalisiert sich. Die Vorbehandlung mit NVP-BEZ235 oder LY294002 von bestrahlten GaMG-Zellen verursacht 24 Stunden nach Bestrahlung einen deutlichen G2-Arrest. Ähnlich, jedoch etwas schwächer, fällt dieser G2-Arrest unter Rapamycin aus.

Die U373-MG-Linie zeigt durch die Vorbehandlung aller drei Testsubstanzen keine Änderung des Zellzyklus. Vergleichbar zur GaMG-Linie verhält es sich bei bestrahlten U373-MG-Zellproben. Durch NVP-BEZ235 oder LY294002 zeigt die U373-MG-Linie einen G2-Arrest. Rapamycin hingegen verursacht keinen G2-Arrest.

Nach 48 Stunden zeigen unbestrahlte und mit NVP-BEZ235 vorbehandelte GaMG-Zellen zeigen einen geringeren Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Bestrahlte GaMG-Zellen zeigen unter Vorbehandlung mit LY294002 einen leichten Anstieg an Zellen in der G1-Phase und einen leichten Abfall an Zellen in der G2-Phase. U373-Zellen zeigen nach alleiniger Behandlung mit LY294002 einen leicht höheren Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus.

3.6 Einfluss einer PI3K/mTOR-Inhibition sowie einer Bestrahlung auf die Induktion der Apoptose gemessen mittels Sub-G1-Fraktion

Die Zelllinien GaMG und U373-MG mit entweder NVP-BEZ235, Rapamycin oder LY294002 für 24 Stunden behandelt und anschließend mit 8 Gy bestrahlt. Als Kontrolle dienten unbehandelte und unbestrahlte Zellproben. Anschließend wurden die Proben mit dem DNS-Farbstoff PI gefärbt. Pro Probe wurde der DNS-Gehalt von jeweils 20000 Zellen gemessen. Apoptotische Zellfragmente können hierbei aufgrund eines geringen DNS-Gehaltes (geringer als der DNS-Gehalt von Zellen der G1-Fraktion) von teilungsaktiven Zellen in der Interphase differenziert werden.

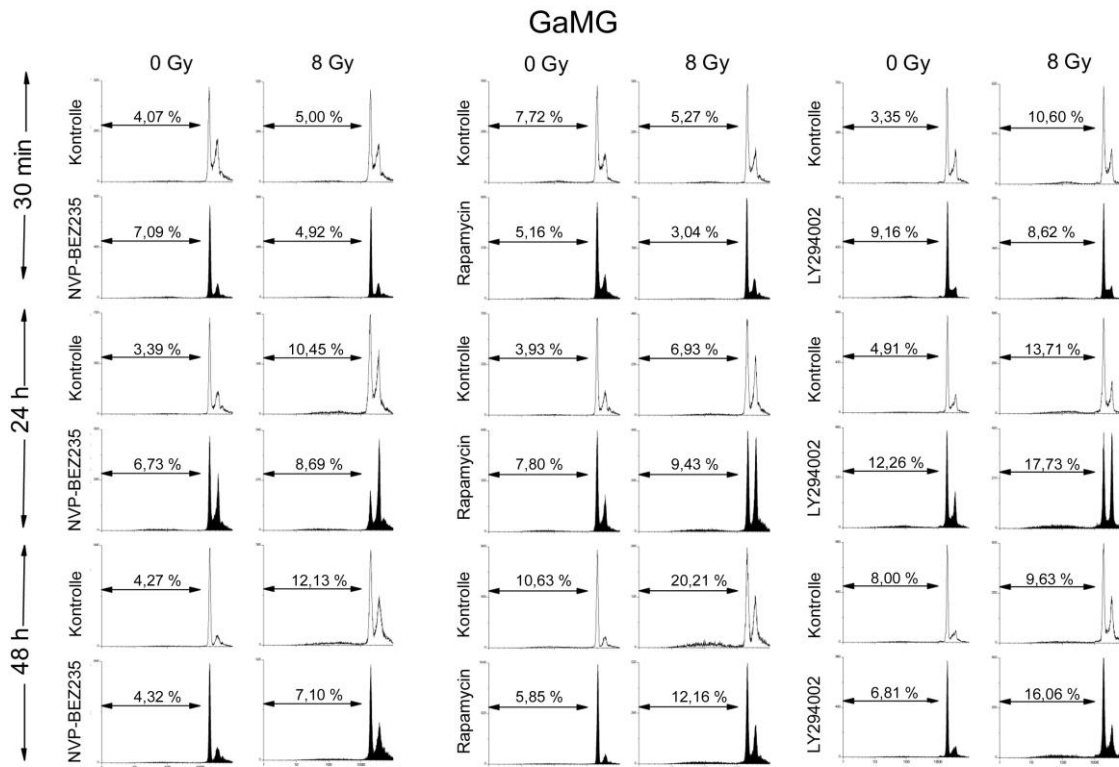


Abbildung 21: Repräsentative Histogramme der Sub-G1-Fraktion von unbehandelten Kontrollzellen sowie behandelter GaMG-Zellen mit und ohne anschließender Bestrahlung.

Dargestellt sind die repräsentativen Sub-G1-Fractionen. Die Sub-G1-Fraktion beinhaltet Zellen mit einem geringeren DNS-Gehalt als Zellen in der G1-Zellzyklusphase. GaMG-Zellen wurden für 24 Stunden mit entweder NVP-BEZ235 oder Rapamycin oder LY294002 behandelt (gefüllte Histogramme). Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit 8 Gy. 30 Minuten, 24 und 48 Stunden danach wurde der DNS-Gehalt von jeweils 20000 Zellen pro Bedingung gemessen. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen (ungefüllte Histogramme). Zusätzlich zur graphischen Darstellung sind jeweils die prozentualen Anteile der Sub-G1-Fraktion numerisch aufgelistet.

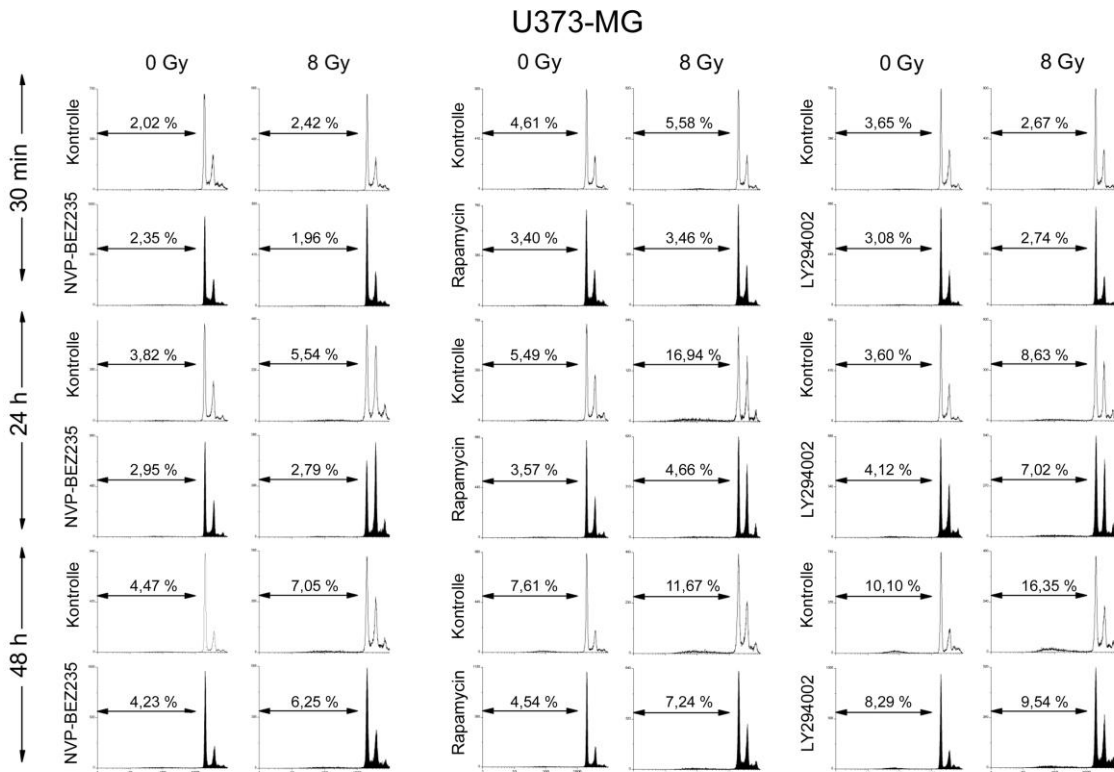


Abbildung 22: Repräsentative Histogramme der Sub-G1-Fraktion von U373-MG-Kontrollzellen sowie behandelter U373-MG-Zellen mit und ohne anschließender Bestrahlung

Dargestellt sind die repräsentativen Sub-G1-Fraktionen. Die Sub-G1-Fraktion beinhaltet Zellen mit einem geringeren DNS-Gehalt als Zellen in der G1-Zellzyklusphase. U373-MG-Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit NVP-BEZ235 oder Rapamycin oder LY294002 behandelt (gefüllte Histogramme). Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit 8 Gy. 30 Minuten, 24 und 48 Stunden danach wurde der DNS-Gehalt von jeweils 20000 Zellen pro Bedingung gemessen. Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen (ungefüllte Histogramme). Zusätzlich zur graphischen Darstellung sind jeweils die prozentualen Anteile der Sub-G1-Fraktion numerisch aufgelistet.

Beide Zelllinien weisen 24 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen eine höhere Sub-G1-Fraktion auf. Dieser Anstieg setzt sich bis zu 48 Stunden nach Bestrahlung fort, was die Apoptoseinduktion durch Bestrahlung darstellt.

Die kombinierte PI3K/mTOR-Inhibition mit NVP-BEZ235 sorgt bei der unbestrahlten und bestrahlten GaMG-Linie im Vergleich zu unbehandelten GaMG-Zellen bis 24 Stunden nach Behandlung zu einer Erhöhung der Sub-G1-Fraktion, die nach 48 Stunden bei unbestrahlten GaMG-Zellen rückläufig und bei bestrahlten GaMG-Zellen sogar in eine erniedrigte Sub-G1-Fraktion umschwenkt. Bei unbestrahlten und bestrahlten U373-MG hingegen kann durch den Einsatz von NVP-BEZ235 keine Änderung der Sub-G1-Fraktion beobachtet werden.

Passend zu der Expression von Bcl-xL (vgl. Absatz 3.4.5) zeigt somit die duale PI3K/mTOR-Inhibition mit NVP-BEZ235 bei bestrahlten und unbestrahlten U373-MG- und unbestrahlten GaMG-Zellen keine vermehrte Apoptose und bei bestrahlten GaMG-Zellen eine leicht verminderte Apoptose.

Die alleinige mTOR-Inhibition mit Rapamycin führt nach 24 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung der Sub-G1-Fraktion. Diese Erhöhung ist jedoch 48 Stunden nach Behandlung an die Kontrollgruppe angeglichen, sodass keine vermehrte Apoptose vorliegt. Eine zusätzliche Bestrahlung führt bei der GaMG-Linie zu keiner ausgeprägten Änderung der Sub-G1-Fraktion. Anders verhält es sich mit der Zelllinie U373-MG. Bestrahlte und unbestrahlte Zellen weisen 30 Minuten bis 48 Stunden nach Abschluss der Behandlung sogar eine reduzierte Sub-G1-Fraktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrollzellen auf, was eine verringerte Apoptose widerspiegelt. Leichte proapoptotische Effekte, auf die die Expression von Bcl-xL hinweist, können hier nicht bestätigt werden, was jedoch mit der jeweiligen Expression der Procaspase 3 (vgl. Absatz 3.4.5) übereinstimmt.

Durch den Einsatz des PI3K-Inhibitors LY294002 zeigen bestrahlte GaMG-Zellen, beginnend ab 24 Stunden und anhaltend bis 48 Stunden nach Behandlung, eine höhere Sub-G1-Fraktion als die jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen, sodass eine vermehrte Apoptose vorliegt. Unbestrahlte GaMG-Zellen zeigen keine wesentlichen Veränderungen der Sub-G1-Fraktion.

Ebenso zeigen unbestrahlte U373-MG-Zellen, die mit LY294002 vorbehandelt wurden, keine wesentlichen Veränderungen der Sub-G1-Fraktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Bestrahlte U373-MG-Zellen hingegen weisen 48 Stunden nach Bestrahlung eine geringere Sub-G1-Fraktion auf, was eine verringerte Apoptose zeigt. Allerdings korrelieren die Ergebnisse der Apoptose-Untersuchung mittels Sub-G1-Fraktion nicht mit den anderen Apoptosemarkern wie Bcl-xL oder Caspase 3 (vgl. Absatz 3.4.5). Ein möglicher Grund dafür wäre eine Caspaseabhängig- und -Caspaseunabhängigkeit der Apoptose.⁵⁰⁻⁵²

Zur weiteren Klärung des Ausbleibens von radiosensibilisierenden Effekten durch die Vorbehandlung mit den drei Testsubstanzen wurden in Zusammenschau mit der Proteinexpressionsanalyse von Bcl-xL (vgl. Absatz 3.4.5) pro- und antiapoptotische Effekte mittels der durchflusszytometrisch gemessenen Sub-G1-Fraktion untersucht.



Abbildung 23: Diagramme der Sub-G1-Fraktion von GaMG- und U373-MG-Kontrollzellen sowie behandelter GaMG- und U373-MG-Zellen mit und ohne anschließender Bestrahlung

Mittelwerte der durchflusszytometrisch gemessenen Sub-G1-Fraktion. Die Zellproben wurden für 24 Stunden mit einer der folgenden Substanzen behandelt: NVP-BEZ235 (grün), Rapamycin (gelb), LY294002 (blau). Anschließend erfolgte die Bestrahlung (8 Gy). 30 Minuten, 24 und 48 Stunden danach erfolgten die Messungen. Als Kontrolle dienen jeweils unbestrahlte (0 Gy) und unbehandelte Zellproben (helle Farben). Pro Versuch wurden 20000 Zellen gemessen. Als Kontrolle dienen die jeweils unbehandelten Zellproben. Die Daten stammen aus drei bis fünf unabhängigen Versuchen. Der Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts wird durch die Fehlerbalken gezeigt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mittels Klammern markiert.

4 Diskussion

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit bilden Versuche an zwei unterschiedlichen Glioblastomzelllinien. Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste ZNS-Tumor im Erwachsenenalter und hat eine fatale Prognose. Unbehandelt beträgt das mediane Überleben acht bis 16 Wochen.⁵³ Die mikrochirurgische Resektion gefolgt von einer adjuvanten Radiochemotherapie bilden den aktuellen Therapiestandard. Aufgrund des ausgeprägt infiltrativen Wachstums ist das primäre Ziel der Resektion die Reduktion der Tumormasse und die Gewinnung einer Biopsie. Hierbei steht die Vermeidung neuer permanenter neurologischer Defizite im Vordergrund.⁵⁴ Die adjuvante konformale Strahlentherapie verbessert die lokale Kontrolle und verdoppelt im Vergleich zur alleinigen Operation die mittlere Überlebenszeit, ohne weiteres Gewebe funktionell zu schädigen.^{4,55} Seit den 80ern weist zudem die Kombination einer Chemotherapie oder molekularer zielgerichteter Therapien mit Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung nicht nur bei Glioblastomen, sondern auch bei einer Vielzahl von anderen Tumoren eine verbesserte Wirksamkeit auf.^{54,56–58} Die Wirksamkeit der Radiochemotherapie ist dabei von mehreren Einflussgrößen abhängig. Eine davon ist der Behandlungsplan.^{59,60} Der EGFR-Inhibitor Erlotinib beispielsweise verstärkt die Strahlensensibilität bei gleichzeitiger Gabe von Gemcitabine. Die Gabe von Erlotinib nach Gemcitabine hingegen führt zu keiner Zunahme strahlensensibilisierender Effekte.⁶⁰

Den aktuellen Forschungsgegenstand dieser Arbeit bildet der in Glioblastomen häufig überaktivierte PI3K/AKT/mTOR-Signalweg.^{61–63} Eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Signalwegs spielt das Tumorsuppressorprotein PTEN. Ein mutiertes *PTEN* sorgt für die zuvor genannte Überaktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs und korreliert mit einer Radioresistenz.^{64–66}

Zwei humane Glioblastomzelllinien mit unterschiedlichem *PTEN*-Status (GaMG: *PTEN* wt; U373-MG: *PTEN* mut) wurden für 24 Stunden entweder mit NVP-BEZ235 (dualer PI3K/mTOR-Inhibitor), LY294002 (PI3K-Inhibitor) oder Rapamycin (mTOR-Inhibitor) behandelt und anschließend bestrahlt. Untersucht wurden die Auswirkungen auf die Zellproliferation, die Strahlensensibilität, das Proteinexpressionsmuster, die Zellzyklusverteilung, die Induktion und Reparaturfähigkeit des DNS-Schadens sowie die Einleitung des programmierten Zelltods.

Bzgl. der Proliferationshemmung zeigt die mTOR-Inhibition durch NVP-BEZ235 und Rapamycin bei beiden Zelllinien in Form eines G1-Arrests Wirkung, was zusätzlich durch eine reduzierte Expression des Proliferationsmarkers p-S6 sowie des Proteintranslationsfaktors p-4E-BP1 bestätigt wird. Die alleinige PI3K-Inhibition durch LY294002 hingegen hat keine antiproliferative Wirkung auf beide Zelllinien (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 17). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die mTOR-Inhibition unabhängig vom *PTEN*-Status für die Einflussnahme auf Proliferation und Proteintranslation vordergründig ist.

In Hinblick auf die Strahlensensibilität stellte sich U373-MG (*PTEN* mut) im Vergleich zur GaMG (*PTEN* wt) als die sensiblere Zelllinie heraus (vgl. Abbildung 12). Inwieweit der *PTEN*-Status Einfluss auf die Strahlensensibilität hat, konnte in der Literatur bislang nicht vollständig geklärt werden. Unterschiedliche Studien, darunter Inaba u.a. 2011⁶⁷ und Wick u.a. 1999⁶⁸, zeigten, dass ein *PTEN*-Gen-transfer Gliomzellen strahlensensibilisiert. Hingegen berichten andere Studien, darunter Mansour u.a. 2018⁶⁹ und McCabe u.a. 2015⁷⁰, dass eine *PTEN* Depletion Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung sensibilisiert. Diese konträren Ergebnisse verdeutlichen, wieso der *PTEN*-Mutationsstatus als eigenständiger Biomarker zur Bestimmung der Strahlensensibilität bislang nicht bestätigt wurde. Aufschluss über die teils widersprüchliche Datenlage ergeben die Untersuchungsergebnisse von Bassi u.a. 2013⁷¹ und Milella u.a. 2015⁷². Deren Untersuchungsergebnisse zeigten, dass *PTEN* neben seiner Funktion im Zytoplasma auch eine Rolle innerhalb des Nukleus spielt, die noch gänzlich ungeklärt ist und weiterer Erforschung bedarf.

Bei beiden Zelllinien ruft die PI3K/mTOR-Inhibition 24 Stunden vor Bestrahlung keine strahlensensibilisierenden Effekte hervor, was die vorliegenden Koloniebildungstests bestätigen (vgl. Abbildung 12). Ein möglicher Grund für die fehlende radiosensibilisierende Wirkung der Inhibitoren ist das Ausbleiben eines erhöhten DNS-Schadens und das Ausbleiben einer verzögerten DNS-Reparatur (vgl. Abbildung 12 und Abbildung 14). Ein weiterer Grund ist die längere Inkubationszeit der Substanzen (24 Stunden vor Bestrahlung), die zu einem G1-Arrest zum Zeitpunkt der Bestrahlung führt. Diese G1-Zellen sind dann weniger strahlenempfindlich als sich aktiv teilende G2-Zellen. Übereinstimmend dazu konnte Haas-Kogan u.a. 1996⁷³ an Glioblastomzelllinien zeigen, dass eine Synchronisation in der G1-

Phase zu einer Radioresistenz führt. Ein weiterer Erklärungsansatz für den ausbleibenden strahlensensibilisierenden Effekt bei beiden Zelllinien durch eine mTOR-Inhibition vor Bestrahlung ist die damit einhergehende Inhibierung der negativen Rückkopplungsschleife über das ribosomale Protein S6 (vgl. Abbildung 17). Diese Wirkung ist in der Literatur bei mTOR-Inhibitoren schon mehrfach beschrieben worden, u.a. durch Carracedo u.a. 2008¹³ und Guertin 2009⁷⁴: Durch die Inhibierung der negativen Rückkopplungsschleife erfolgt die Aktivierung des PI3K-Signalwegs zum Zeitpunkt der Bestrahlung. Die das Zellüberleben steigernde Kinase p-AKT ist aktiviert, wodurch die Apoptose unterdrückt wird (vgl. Abbildung 25).⁵⁹ Bestätigt wurde dieses für NVP-BEZ235, Rapamycin und LY294002 durch das Ausbleiben einer Reduktion der antiapoptotischen Marker Bcl-xL und der inaktiven Procaspase Caspase 3. Auch eine gesteigerte Sub-G1-Fraktion unter NVP-BEZ235 und Rapamycin blieb aus. Einzig bei der Zelllinie GaMG (*PTEN* wt) verursachte die Vorbehandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 eine Tendenz zur weiteren Steigerung der Sub-G1-Fraktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

Eine weitere mögliche Begründung für das Ausbleiben einer Apoptoseinduktion durch die Vorbehandlung mit den Testsubstanzen und insbesondere NVP-BEZ235 könnte auf eine zellspezifische Apoptoseinduktion zurückzuführen sein. Fokas u.a. 2012 konnte zeigen, dass NVP-BEZ235 in Kombination mit Bestrahlung eine Apoptose in SQ20B Larynxkarzinom-, jedoch nicht in FaDu Hypopharynxkarzinomzellen hervorruft.⁷⁵

Aufgrund der ausbleibenden Radiosensibilisierung durch die Langzeitinkubation mit NVP-BEZ235 vor Bestrahlung und dem bei Bestrahlung bestehenden G1-Arrest wurde in unserer Arbeitsgruppe ein anderer Behandlungsplan getestet. Dabei erfolgte die Behandlung eine Stunde vor Bestrahlung bis 24 Stunden nach Bestrahlung (Behandlungsplan II, Abbildung 25), um den G1-Arrest und die Inhibierung der negativen Rückkopplungsschleife zu vermeiden.

In unserer Publikation Kuger, ... Lutyj u.a. 2013 verglichen wir die Behandlung mit NVP-BEZ235 24 Stunden vor Bestrahlung (Behandlungsplan I) mit der Behandlung eine Stunde vor Bestrahlung (Behandlungsplan II). Die Behandlung nach Plan II führte zu einer ausgeprägten Strahlensensibilisierung (vgl. Abbildung 24). Die Gründe für die radiosensibilisierende Wirkung waren eine höhere

γ H2AX Menge, eine verzögerte DNS-Doppelstrangbruchreparatur, ein herunterregulierter PI3K-Signalweg, ein fehlender G1-Arrest und ein ausgeprägter G2/M-Arrest. Auch Djuzenova u.a. 2016⁷⁶ bestätigte die Bedeutung des Behandlungsablaufs für radiosensibilisierende Effekte und zeigte ähnliche Ergebnisse für PI-

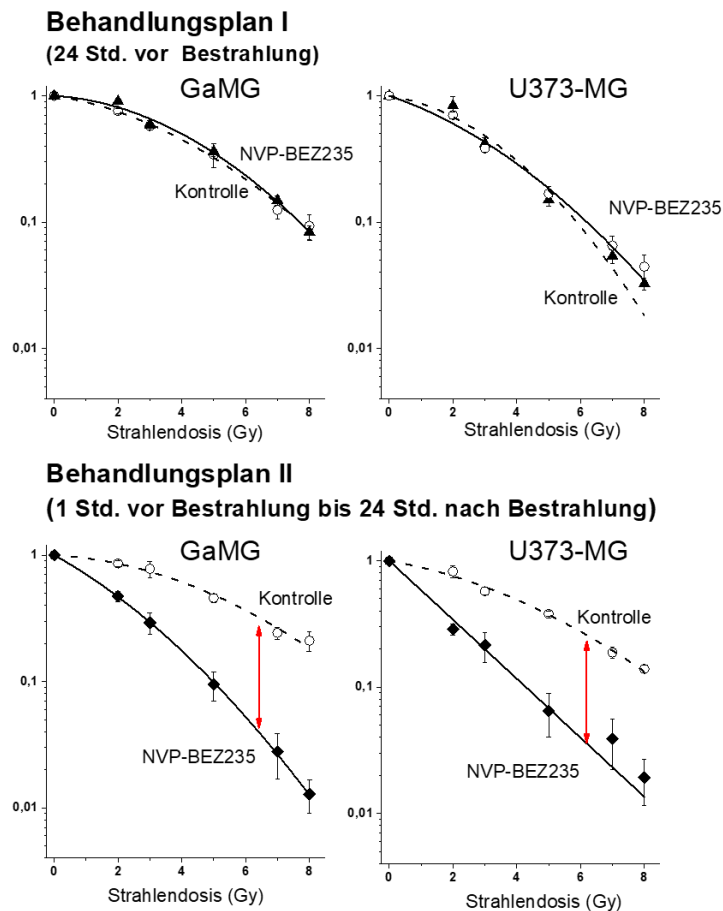


Abbildung 24: Die Rolle des Behandlungsplans des PI3K/mTOR-Inhibitors NVP-BE235 auf die klonogene Überlebensrate.

Graphisch dargestellt sind klonogene Überlebensfraktionen der Zelllinien GaMG und U373-MG, die entweder 24 Stunden vor Bestrahlung (Behandlungsplan I) oder eine Stunde vor Bestrahlung bis 24 Stunden nach Bestrahlung (Behandlungsplan II) mit NVP-BE235 behandelt wurden. Die DMSO-behandelten Kontrollen sind gestrichelt dargestellt. Die Überlebenskurven von Behandlungsplan I überlappen sich mit den Kontrollen, sodass keine radiosensibilisierenden Effekte vorliegen. Hingegen gehen die Überlebenskurven von Behandlungsplan II und deren Kontrollkurven weit auseinander, was eine starke Radiosensibilisierung zeigt. Die Zeit der Zugabe des Inhibitors und die Dauer der Behandlung spielen somit eine wesentliche Rolle für radiosensibilisierende Effekte.

Quelle: Auszug aus „Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BE235 Depends on Drug-Irradiation Schedule“ - S. Kuger, ... P. Lutyj, et al. (2013). Copyright © 2013 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved.

103, einen weiteren dualen PI3K/mTOR-Inhibitor, dessen Wirkung in Kombination mit dem Hsp90-Inhibitor NVP-AUY922 untersucht wurde.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine längere Inkubation mit NVP-BE2235 vor Bestrahlung zu keiner Radiosensibilisierung der GBM-Zellen führt, jedoch eine starke antiproliferative Wirkung hervorruft. Zudem fand unsere Arbeitsgruppe heraus, dass der Behandlungsplan von NVP-BE2235 für eine Radiosensibilisierung bei Glioblastomzellen ausschlaggebend ist. Eine Behandlung mit NVP-BE2235 kurz vor Bestrahlung und anschließender 24stündiger Inkubation zeigte im Vergleich zur 24stündigen Inkubation vor Bestrahlung eine starke

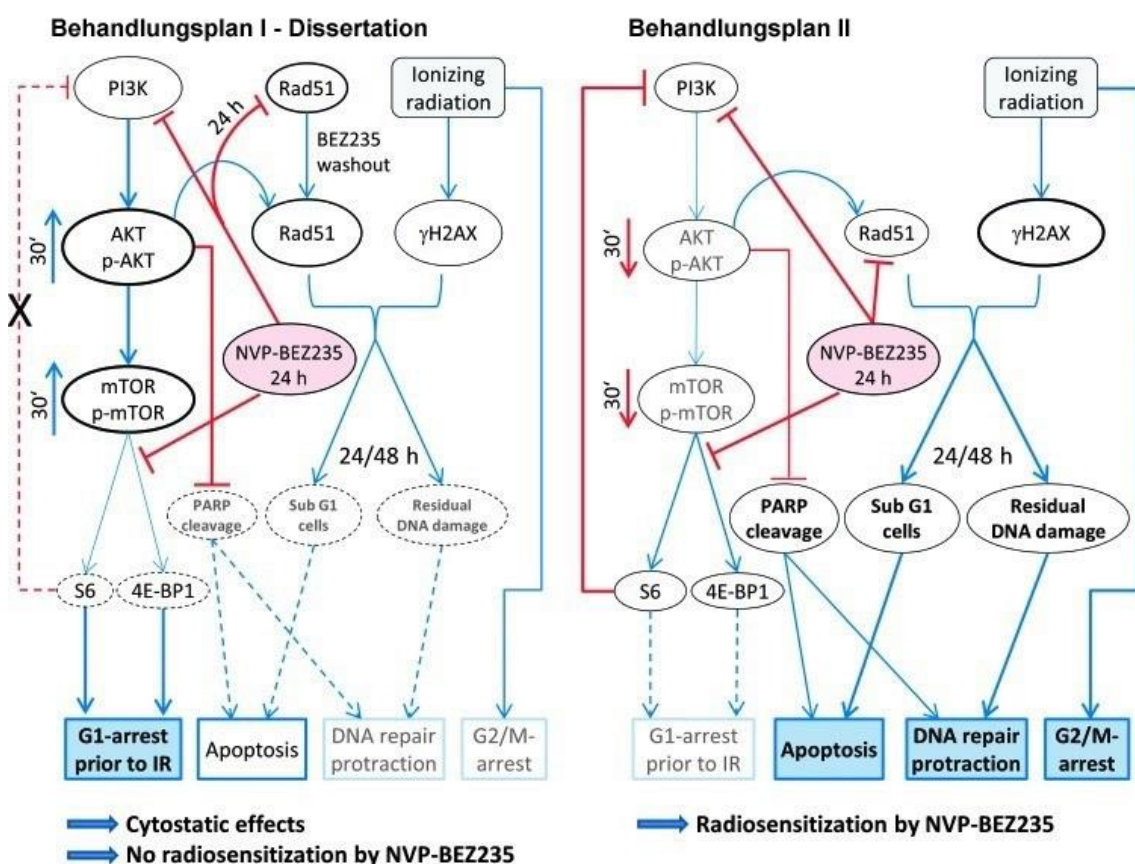


Abbildung 25: Vereinfachtes Diagramm zum Vergleich der Behandlungsplans I (Dissertation) mit dem Behandlungsplan II

Das linke Diagramm zeigt zelluläre Abläufe von Glioblastomzelllinien, die 24 Stunden mit NVP-BE2235 behandelt und dann bestrahlt wurden (Dissertation – Zeitplan I), das rechte Diagramm zeigt die zellulären Abläufe der Zellen, die unmittelbar vor Bestrahlung für 24 Stunden behandelt wurden (Zeitplan II).

Quelle: „Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BE2235 Depends on Drug-Irradiation Schedule“ - S. Kuger, ... P. Lutyj, et al. (2013). Copyright © 2013 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved.

Radiosensibilisierung. Die vorliegenden Untersuchungen bilden somit einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zu diesem Dualkinase-Inhibitor, der mittlerweile unter dem Handelsnamen Dactolisib® in klinischen Phase I und II Studien untersucht wird^{77,78}. Weitere vielversprechende noch zu erforschende Einsatzgebiete sind synergistische Effekte einer Kombinationstherapie von NVP-BEZ235 mit anderen therapeutischen Substanzen sowie die Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms, für die die mit Rapamycin verwandten mTOR-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus bereits eine Zulassung erhalten haben.^{12,12,79,80} Auch weitere Tumore mit einer starken mTOR-Überaktivierung, wie das Endometriumkarzinom, das Sarkom und das Mammakarzinom stellen vielversprechende Einsatzgebiete für die duale PI3K/mTOR-Inhibition dar.

5 Zusammenfassung

Die kombinierte Radiochemotherapie ist ein fester Bestandteil der aktuellen Therapie des Glioblastoma multiforme.⁵⁴ Unbehandelt überleben Patienten nur wenige Wochen.⁵³ Trotz der Fortschritte durch eine adjuvante normofraktionierte Bestrahlung, kombiniert mit dem simultanen und sequentiellen Einsatz von Chemotherapeutika, bleibt die Prognose mit ca. 16 Monaten fatal⁸¹ und Bedarf daher weiterer wissenschaftlicher Anstrengungen.

Ein wichtiger Aspekt zur Verbesserung der Prognose stellt die weitere Erforschung radiosensibilisierender Substanzen dar, die bei gleichbleibender Strahlendosis den Antitumoreffekt steigern, sodass keine weitere Schädigung des umliegenden Gewebes durch höhere Strahlendosen riskiert wird.

Der Forschungsgegenstand dieser Arbeit bildet der in Glioblastomen häufig überaktivierte PI3K/AKT/mTOR-Signalweg.^{61–63} Eine entscheidende Rolle dabei spielt das Tumorsuppressorprotein PTEN. Ein Funktionsverlust des PTENs führt zur Überaktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs und korreliert mit einer Radioresistenz.^{64–66}

Bisherige Versuche, den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg mittels des mTOR-Inhibitors Rapamycin zu inhibieren, schlugen fehl. Grund dafür ist die Inhibition einer negativen Rückkopplungsschleife, die zu einer erneuten Aktivierung des Signalwegs führt.^{13,14}

Einen neuartigen Therapieansatz bildet der duale PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235, der neben der mTOR-Inhibition auch die Reaktivierung des Signalwegs über die Inhibition einer negativen Rückkopplungsschleife verhindern soll.

In der vorliegenden Arbeit wurde die strahlensensibilisierende Wirkung von NVP-BEZ235 an zwei humane Glioblastomzelllinien mit unterschiedlichem *PTEN*-Status (GaMG: *PTEN* wt und U373-MG: *PTEN* mut) analysiert. Vergleichend dazu erfolgten Untersuchungen mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin und dem PI3K-Inhibitor LY294002.

Um die Wirkungsweise der dualen PI3K/mTOR-Inhibition mit und ohne Bestrahlung zu untersuchen, wurden zunächst unterschiedliche Arbeitskonzentrationen mittels ATP-Assay getestet. Die radiosensibilisierende Wirkung der Testsubstanzen wurde mittels Koloniebildungstest analysiert. Anschließend erfolgte die Messung von Doppelstrangbrüchen, der Zellzyklusanalyse und von fragmentierter

DNS, die als Marker für die Spät-Phase-Apoptose dient. Dafür wurden die GBM-Zellen mittels Propidiumjodid und einem γ H2AX-FITC-Antikörper gefärbt und mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Zuletzt wurde die Expression diverser Proteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs (PI3Kp85, PI3K110 α , PTEN, mTOR, p-mTOR, S6, p-S6, p-4E-BP1) und die Apoptosemarker (Bcl-xL und Caspase 3) mittels Western Blot untersucht.

Im ATP-Test wurde NVP-BEZ235 bei beiden Zelllinien mit einer Konzentrationen bis zu 1000 nM und einer Inkubationszeit von bis zu 48 Stunden untersucht. Dabei zeigte sich eine zytostatische und keine zytotoxische Wirkung.

Mittels Kolonietest konnte gezeigt werden, dass die *PTEN*-mutierte Zelllinie U373-MG im Vergleich zu der *PTEN*-Wildtyp-Zelllinie GaMG eine moderat höhere Strahlensensibilität aufweist. Allerdings konnten keine radiosensibilisierenden Effekte der PI3K/mTOR-Inhibition in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Einen Grund dafür zeigten die Messungen der DNS-Schädigung mittels γ H2AX. Es konnte weder eine erhöhte Rate an DNS-Doppelstrangbrüchen nach Bestrahlung noch eine verzögerte Reparatur durch die duale PI3K/mTOR-Inhibition gezeigt werden. Eine geringere γ H2AX-Menge konnte wiederum durch den G1-Arrest zum Zeitpunkt der Bestrahlung erklärt werden, da G1-Zellen strahlenresistenter sind.²³ Der G1-Arrest konnte wiederum wie folgt erklärt werden: Sowohl der alleinige mTOR-Inhibitor Rapamycin als auch der duale Inhibitor NVP-BEZ235 führten zu einer Hemmung der Proliferation und der Proteintranslation in beiden Zelllinien unabhängig vom *PTEN*-Status. Rapamycin verursachte eine starke Depletion des Proliferationsmarkers p-S6 sowie des Translationsfaktors p-4E-BP1 in beiden Zelllinien in gleichem Maße. Ähnlich, aber etwas moderater, waren die Effekte unter dualer Inhibition mit NVP-BEZ235. Im Unterschied zu Rapamycin und NVP-BEZ235 zeigte LY294002 durch alleinige PI3K-Inhibition keinen Effekt auf die Expression der p-S6- und p-4E-BP1-Proteine in beiden Zelllinien. Ein weiterer Grund für eine fehlende Strahlensensibilisierung war das Ausbleiben einer Apoptoseinduktion. Unter NVP-BEZ235 und Rapamycin konnte keine erhöhte Sub-G1-Fraktion gemessen werden, zudem trat unter keinem der drei Inhibitoren eine Änderung der Expression der antiapoptischen Marker Bcl-xL sowie Caspase 3 in beiden Zelllinien ein. Ein Ausbleiben der Apoptoseinduktion wurde bei NVP-BEZ235 und Rapamycin auf die Reaktivierung des PI3K-

Signalwegs zum Zeitpunkt der Bestrahlung zurückgeführt. Dabei erfolgte die Reaktivierung durch eine negative Rückkopplungsschleife über das ribosomale Protein S6, was die Zellüberleben fördernde Kinase AKT aktivierte, wodurch eine durch ionisierende Strahlung induzierte Apoptose verhindert wurde.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die starke zytostatische Wirkung an Glioblastomzelllinien durch den neuartigen dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Daten (nach Behandlungsplan I, vgl. Abbildung 25) wurde ein anderer Behandlungsplan untersucht, welcher die o.g. Ursachen für eine ausbleibende Strahlensensibilisierung vermeiden konnte (Behandlungsplan II). Die Vorbehandlungszeit wurde drastisch verkürzt, indem man die Zellen kurz vor Bestrahlung mit NVP-BEZ235 behandelte und für 24 Stunden inkubierte. Unter dem Behandlungsplan II kam es zu starken radiosensibilisierenden Effekten von NVP-BEZ235 in beiden Zelllinien. Wie zu erwarten war, zeigten die Zellen mehr DNS-Schäden, eine verzögerte Reparatur und einen ausgeprägten G2/M-Arrest nach der kombinierten Behandlung mit NVP-BEZ235 und Bestrahlung.⁵⁹

Ein einfacher Weg zur Steigerung der Effizienz von NVP-BEZ235 wäre die Erhöhung der Arbeitskonzentration auf 500 nM. Mit einem erhöhten Nebenwirkungsprofil müsste man jedoch rechnen, sodass wir zur Steigerung der Effizienz im Rahmen unserer Publikation Kuger, ... Lutyj u.a. 2013⁵⁹ zeigen konnten, dass die Verkürzung der Behandlungszeit mit NVP-BEZ235 vor Bestrahlung ein entscheidender Einflussfaktor für eine Strahlensensibilisierung ist (vgl. Abbildung 25).

Mittlerweile erfolgten die Testung des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235 innerhalb von klinischen Phase I und II Studien an diversen fortgeschrittenen, soliden Tumorerkrankungen (GBM, NSCLC, Mammakarzinom, NET des Pankreas, Nierenzellkarzinom), welche den ersten klinischen Einsatz eines PI3K-Inhibitors darstellen.^{78,77,82,83} In den zuvor genannten klinischen Studien zeigte NVP-BEZ235 bislang ein erhöhtes Nebenwirkungsprofil, was die Verbreitung der mittlerweile den Handelsnamen Dactolisib® tragenden Substanz verhinderte. Aus diesem Grund sind Untersuchungen mit geringeren Konzentrationen des PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 u.a. an diversen Tumorzelllinien und am

Mausmodell notwendig. Dabei stellen synergistische Effekte einer Kombinationstherapie von NVP-BEZ235 mit anderen therapeutischen Substanzen ein vielversprechendes Einsatzgebiet dar. Insbesondere sollte der Forschungsschwerpunkt auf Tumore mit einer starken mTOR-Überaktivierung, wie das Endometriumkarzinom, das Sarkom und das Mammakarzinom, gesetzt werden.

6 Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis

6.1 Literaturverzeichnis

1. Mukherjee, S., Schaden, Barbara. Der König aller Krankheiten Krebs - eine Biografie. (DuMont, 2012).
2. Golder, W. Hippokrates und das Corpus Hippocraticum: eine Einführung für Philologen und Mediziner. (Königshausen & Neumann, 2007).
3. Hippocrates. Die Werke des Hippokrates: die hippokratische Schriftensammlung in neuer deutscher Uebersetzung. (Anger-Verlag Eick, 1995).
4. Strahlentherapie. (Springer-Verlag, 2006).
5. Koch-Institut, R. Krebs in Deutschland | 2013/2014. 154.
6. Krebs - Krebs in Deutschland. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html.
7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674 (2011).
8. Porta, C., Paglino, C. & Mosca, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front. Oncol.* 4, (2014).
9. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655–1657 (2002).
10. LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B. & Dennis, P. A. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 11, 32–50 (2008).
11. Chang, L. et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 96, 507–517 (2015).
12. European Medicines Agency. Afinitor. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/afinitor> (2018).
13. Carracedo, A. et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* 118, 3065–3074 (2008).
14. O'Reilly, K. E. et al. mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt. *Cancer Res.* 66, 1500–1508 (2006).
15. Maira, S.-M. et al. 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. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1851–1863 (2008).
16. Sauer, R. Strahlentherapie und Onkologie. (Elsevier, Urban & Fischer, 2010).
17. FREUND, L. Ein mit Röntgen-Strahlen behandelter Fall von Naevus pigmentosus piliferus. *Wien Med Wochenschr* 47, 428–434 (1897).
18. Wendhausen, H., Kimmig, B., Wolf, J. H. & Kovacs, G. Die Strahlentherapie zwischen 1896 und 1916. *Z. Für Med. Phys.* 5, 148–154 (1995).
19. Kauffmann, G. W., Moser, E. & Sauer, R. Radiologie: mit 115 Tabellen ; Fragen und Antworten. (Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 2006).
20. Karstens, J. H. Strahlentherapie und Radioonkologie aus interdisziplinärer Sicht. (Lehmanns Media, 2010).
21. Lans, H., Marteijn, J. A. & Vermeulen, W. ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin* 5, 4 (2012).
22. Rossi, M. J., Mazina, O. M., Bugreev, D. V. & Mazin, A. V. The RecA/RAD51 protein drives migration of Holliday junctions via polymerization on DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6432–6437 (2011).
23. Fritz-Niggli, H. Strahlenbiologie: Grundlagen und Ergebnisse. (G. Thieme, 1959).

24. Galderisi, U., Jori, F. P. & Giordano, A. Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 22, 5208–5219 (2003).
25. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512 (1999).
26. Stiegler, P. & Giordano, A. Big Brothers Are Watching: the Retinoblastoma Family and Growth Control. in *Inhibitors of Cell Growth 25–42* (Springer, Berlin, Heidelberg, 1998). doi:10.1007/978-3-642-72149-6_3.
27. Passarge, E. *Taschenatlas Humangenetik*. (Georg Thieme Verlag, 2008).
28. Böhm, I. & Schild, H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 5, 2–14 (2003).
29. Finucane, D. M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N. J., Cotter, T. G. & Green, D. R. Bax-induced Caspase Activation and Apoptosis via Cytochrome c Release from Mitochondria Is Inhibitable by Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 274, 2225–2233 (1999).
30. Krauss, G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008).
31. Kawachi, K., Ogasawara, T., Yasuyama, M., Otsuka, K. & Yamada, O. Regulation and importance of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hematologic malignancies. *Anticancer Agents Med. Chem.* 9, 1024–1038 (2009).
32. Kasprzak, A., Kwasniewski, W., Adamek, A. & Gozdicka-Jozefiak, A. Insulin-like growth factor (IGF) axis in cancerogenesis. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 772, 78–104 (2017).
33. Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* 12, 9–22 (2007).
34. Chan, S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br. J. Cancer* 91, 1420–1424 (2004).
35. Panwalkar, A., Verstovsek, S. & Giles, F. J. Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer* 100, 657–666 (2004).
36. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. *Der Experimentator: Immunologie*. (Springer-Verlag, 2014).
37. Mukherjee, B. et al. The Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Is a Potent Inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-Mediated DNA Damage Responses. *Neoplasia N. Y. N* 14, 34–43 (2012).
38. Manara, M. C. et al. NVP-BEZ235 as a New Therapeutic Option for Sarcomas. *Clin. Cancer Res.* 16, 530–540 (2010).
39. Benavides-Serrato, A. et al. Correction: Specific blockade of Rictor-mTOR association inhibits mTORC2 activity and is cytotoxic in glioblastoma. *PLOS ONE* 14, e0212160 (2019).
40. Bahmad, H. F. et al. The Akt/mTOR pathway in cancer stem/progenitor cells is a potential therapeutic target for glioblastoma and neuroblastoma. *Oncotarget* 9, 33549–33561 (2018).
41. Brunn, G. J. et al. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J.* 15, 5256–5267 (1996).
42. Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. & Brown, R. F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269, 5241–5248 (1994).
43. Knight, Z. A. & Shokat, K. M. Features of Selective Kinase Inhibitors. *Chem. Biol.* 12, 621–637 (2005).
44. Lee, C. M. et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by LY294002 Radiosensitizes Human Cervical Cancer Cell Lines. *Clin. Cancer Res.* 12, 250–256 (2006).

45. Carpenter, C. L. et al. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 265, 19704–19711 (1990).
46. Simpson, L. & Parsons, R. PTEN: Life as a Tumor Suppressor. *Exp. Cell Res.* 264, 29–41 (2001).
47. Cell Signaling. mTOR functions as an ATP and amino acid sensor to balance nutrient availability and cell growth (4,5). <http://www.cellsignal.com/products/5536.html>.
48. Dai, Q. et al. mTOR/Raptor signaling is critical for skeletogenesis in mice through the regulation of Runx2 expression. *Cell Death Differ.* 24, 1886–1899 (2017).
49. Murphy, P. B. & Clarke, J. R. *Oncogene Proteins: Structure, functions and analyses.* (Nova Publishers, 2008).
50. Opel, D. et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition Broadly Sensitizes Glioblastoma Cells to Death Receptor– and Drug-Induced Apoptosis. *Cancer Res.* 68, 6271–6280 (2008).
51. Mills, J. C., Stone, N. L. & Pittman, R. N. Extranuclear Apoptosis. *J. Cell Biol.* 146, 703–708 (1999).
52. Chakravarti, A. et al. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 23, 7494–7506 (2004).
53. Cottrell, J. E. *Anesthesia and Neurosurgery.* (Mosby, 2001).
54. Weller, M. et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* 18, e315–e329 (2017).
55. Laperriere, N., Zuraw, L. & Cairncross, G. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother. Oncol.* 64, 259–273 (2002).
56. Gilbert, M. R. et al. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 699–708 (2014).
57. Chinot, O. L. et al. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 709–722 (2014).
58. Nyati, M. K., Morgan, M. A., Feng, F. Y. & Lawrence, T. S. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 6, 876–885 (2006).
59. Kuger, S. et al. Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. *Transl. Oncol.* 6, 169–179 (2013).
60. Morgan, M. A. et al. The Combination of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors with Gemcitabine and Radiation in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 5142–5149 (2008).
61. Li, J. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943–1947 (1997).
62. Wang, S. I. et al. Somatic Mutations of PTEN in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res.* 57, 4183–4186 (1997).
63. Smith, J. S. et al. PTEN Mutation, EGFR Amplification, and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1246–1256 (2001).
64. Li, H.-F., Kim, J.-S. & Waldman, T. Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiat. Oncol.* 4, 43 (2009).
65. Hambardzumyan, D. et al. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* 22, 436–448 (2008).

66. Kaye, A. H. & Jr, E. R. L. *Brain Tumors E-Book: An Encyclopedic Approach*, Expert Consult - Online and Print. (Elsevier Health Sciences, 2011).
67. Inaba, N. et al. The Effect of PTEN on Proliferation and Drug-, and Radiosensitivity in Malignant Glioma Cells. *Anticancer Res.* 31, 1653–1658 (2011).
68. Wick, W., Furnari, F. B., Naumann, U., Cavenee, W. K. & Weller, M. PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis. *Oncogene* 18, 3936 (1999).
69. Mansour, W. Y. et al. Loss of PTEN-assisted G2/M checkpoint impedes homologous recombination repair and enhances radio-curability and PARP inhibitor treatment response in prostate cancer. *Sci. Rep.* 8, 3947 (2018).
70. McCabe, N. et al. Mechanistic Rationale to Target PTEN-Deficient Tumor Cells with Inhibitors of the DNA Damage Response Kinase ATM. *Cancer Res.* 75, 2159–2165 (2015).
71. Bassi, C. et al. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science* 341, 395–399 (2013).
72. Milella, M. et al. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front. Oncol.* 5, (2015).
73. Haas-Kogan, D. A. et al. p53-Dependent G1 arrest and p53-independent apoptosis influence the radiobiologic response of glioblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* 36, 95–103 (1996).
74. Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. The Pharmacology of mTOR Inhibition. *Sci Signal* 2, pe24–pe24 (2009).
75. Fokas, E. et al. NVP-BEZ235 and NVP-BGT226, dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors, enhance tumor and endothelial cell radiosensitivity. *Radiat. Oncol.* 7, 48 (2012).
76. Djuzenova, C. S. et al. Dual PI3K- and mTOR-inhibitor PI-103 can either enhance or reduce the radiosensitizing effect of the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in tumor cells: The role of drug-irradiation schedule. *Oncotarget* 7, 38191 (2016).
77. Salazar, R. et al. Phase II Study of BEZ235 versus Everolimus in Patients with Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor-Naïve Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *The Oncologist* 23, 766–e90 (2018).
78. Wise-Draper, T. M. et al. A Phase Ib Study of the Dual PI3K/mTOR Inhibitor Dactolisib (BEZ235) Combined with Everolimus in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Target. Oncol.* 12, 323–332 (2017).
79. Hudes, G. et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 356, 2271–2281 (2007).
80. European Medicines Agency. Torisel. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/torisel> (2018).
81. Stupp, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996 (2005).
82. Massard, C. et al. Phase Ib dose-finding study of abiraterone acetate plus buparlisib (BKM120) or dactolisib (BEZ235) in patients with castration-resistant prostate cancer. *Eur. J. Cancer* 76, 36–44 (2017).
83. Carlo, M. I. et al. A Phase Ib Study of BEZ235, a Dual Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *The Oncologist* 21, 787–788 (2016).

6.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: graphische Darstellung der Comptonstreuung	6
Abbildung 2: Graphische Darstellung der direkten und indirekten Strahlenwirkung	7
Abbildung 3: Graphische Darstellung der NHEJ	8
Abbildung 4: Zellzyklusphasen	10
Abbildung 5: PI3K/AKT/mTOR-Signalweg	14
Abbildung 6: Pipettierschema 96-Well-Platte	24
Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Koloniebildungstests.....	26
Abbildung 8: Schematischer Ablauf des Western Blots	29
Abbildung 9: Einfluss von NVP-BE2235 auf die Zellviabilität	35
Abbildung 10: Einfluss von Rapamycin auf die Zellviabilität	36
Abbildung 11: Einfluss von LY294002 auf die Zellviabilität	37
Abbildung 12: Einfluss der PI3K/mTOR-Inhibition auf die klonogene Überlebensrate	39
Abbildung 13: Einfluss der PI3K/mTOR-Inhibition auf die DNS-Schäden gemessen mittels der γ H2AX-Expression	42
Abbildung 14: Einfluss der PI3K/mTOR-Inhibition auf die γ H2AX-Menge	43
Abbildung 15: Expression von PI3Kp85, PI3Kp110 α und PTEN Proteinen	46
Abbildung 16: Expression von mTOR und p-mTOR Proteinen	47
Abbildung 17: Expression von S6, p-S6 und p-4E-BP1 Proteinen	49
Abbildung 18: Expression von Bcl-xL und Caspase 3 Proteinen	52
Abbildung 19: Repräsentative Zellzyklusverteilung der Zelllinie GaMG nach Vorbehandlung mit NVP-BE2235, Rapamycin und LY294002 und Bestrahlung	53
Abbildung 20: Repräsentative Zellzyklusverteilung der Zelllinie U373-MG nach Vorbehandlung mit NVP-BE2235, Rapamycin und LY294002 und Bestrahlung	54
Abbildung 21: Repräsentative Histogramme der Sub-G1-Fraktion von unbehandelten Kontrollzellen sowie behandelter GaMG-Zellen mit und ohne anschließender Bestrahlung.	60
Abbildung 22: Repräsentative Histogramme der Sub-G1-Fraktion von U373-MG-Kontrollzellen sowie behandelter U373-MG-Zellen mit und ohne anschließender Bestrahlung	61
Abbildung 23: Diagramme der Sub-G1-Fraktion von GaMG- und U373-MG-Kontrollzellen sowie behandelter GaMG- und U373-MG-Zellen mit und ohne anschließender Bestrahlung	63
Abbildung 24: Die Rolle des Behandlungsplans des PI3K/mTOR-Inhibitors NVP-BE2235 auf die klonogene Überlebensrate.....	67
Abbildung 25: Vereinfachtes Diagramm zum Vergleich der Behandlungsplans I (Dissertation) mit dem Behandlungsplan II.....	68

7 Abschlussarbeiten

In Zusammenhang mit der Forschung für die vorliegende Arbeit entstanden auch die folgenden Abschlussarbeiten:

Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg: „Modulation der Strahlenempfindlichkeit humaner Glioblastomzelllinien unterschiedlichen PTEN-Status mittels des neuartigen dualen mTOR- und PI3K-Inhibitors NVP-BEZ235“ von Dorothea Englisch, betreut durch Prof. Dr. Djuzenova, 2011.

Naturwissenschaftliche Doktorarbeit der Universität Würzburg: „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“ von Sebastian Kuger, betreut durch Prof. Dr. Djuzenova und PD Dr. Soukhoroukov, 2015.

8 Vollständige Publikationsliste

8.1 veröffentlichte Publikationen, die ein Peer-Review-Verfahren durchlaufen sind

Kuger S., ... Lutyj P. et al., Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. *Transl. Oncol.* 6, 169–179 (2013).

8.2 wissenschaftliche Posterpräsentationen

Lutyj P. et al., Modulation der Strahlensensibilität mittels alleiniger sowie kombinierter PI3K/mTOR-Inhibierung im Glioblastommodell: die Rolle des PTEN-Status. Kongressbeitrag DEGRO 2019, Münster.

Lutyj P. et al., Modulation of Radiation Sensibility using the sole and combined PI3K/mTOR Inhibition in the Glioblast Model: The Role of PTEN Status. *Strahlentherapie und Onkologie* 195, 175-175 (2019).

Kuger S., ... Lutyj P. et al., Drug irradiation schedule is decisive for radiosensitization by the novel dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235. Kongressbeitrag (Elekta-Posterpreis) DEGRO 2013, Berlin.

Kuger S., ... Lutyj P. et al., Drug irradiation schedule is decisive for radiosensitization by the novel dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235. *Strahlentherapie und Onkologie* 189, 67-67 (2013).

8.3 weitere wissenschaftliche Arbeiten

Weick S., ... Lutyj P. et al., Non-rigid image registration of 4D-MRI data for improved target delineation of moving tumors in radiotherapy. In revision (2019).

Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die mich bei der Verfassung dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere möchte ich folgende Personen hervorheben:

Großer Dank gilt Herrn Prof. Flentje. Er gab mir überhaupt erst die Möglichkeit, experimentelle Untersuchungen im Zelllabor für Strahlentherapie zu betreiben, und hatte stets ein offenes Ohr für meine wissenschaftlichen und klinischen Belange.

Insbesondere gilt mein Dank Frau Prof. Djuzenova, die mir als Doktormutter jederzeit freundlich, zugewandt und hilfsbereit begegnet ist. Ich fühlte mich im Labor für Strahlenbiologie stets herzlich willkommen. Frau Prof. Djuzenova gab mir die Möglichkeit zur Teilnahme an vielen Fortbildungen und einen regen wissenschaftlichen Austausch. Sie führte mich in das wissenschaftliche Arbeiten ein und legte somit den Grundstein für die vorliegende Dissertation und meine weitere ärztliche Laufbahn.

Ein herzliches Dankschön möchte ich an Frau Prof. Stopper für die Übernahme des Korreferats richten.

Mein Dank gilt meinem Betreuer Dr. Sebastian Kuger für die detaillierte Einführung in das experimentelle Arbeiten und für die vielen Stunden der Betreuung sowie all meinen Laborkolleginnen und -kollegen, darunter Astrid Katzer, Svetlana Hiltz, Dorothea English, Nadine Günter, Rico Brendtke, Lavinia Stingl, Gisela Wohlleben, Natalia Niewidok, Susanne Hartmann und Ines Elsner für den regen Austausch und die kollegiale Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt Frau Dr. Beckmann für die vielen motivierenden Gespräche und den Rückhalt im klinischen Alltag.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung dieser Ausbildung und meiner Lebensgefährtin Charlotte für die tägliche Unterstützung bedanken.