

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

**Radiosensibilisierung humaner Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten
durch den MEK-Inhibitor PD184352 allein oder in Kombination mit dem HSP90-
Inhibitor NVP-AUY922: Einfluss der Behandlungsschemas**



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Felix Grabenbauer

aus Würzburg

Würzburg, Januar 2021

Referentin: Prof. Dr. T. Djuzenova

Korreferentin: Prof. Dr. H. Stopper

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	1
2.	Einleitung	4
2.1	Epidemiologie und Standardbehandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms	6
2.2	Epidemiologie und Standardbehandlung des Glioblastoms	7
2.3	Tumorbiologie und Signalwege	9
2.4	Strahlenbiologische Grundlagen	9
2.4.1	Der Zellzyklus	11
2.4.2	DNA-Schäden und Reparaturprozesse	13
2.4.3	HSP90, HSP70 und Inhibitor NVP-AUY922	16
2.4.4	MAPK-Signalweg und Inhibitor PD184352	17
2.5	Vorarbeiten	19
2.6	Zielsetzung der Arbeit	22
3.	Material und Methoden	24
3.1	Material	24
3.1.1	Zelllinien	24
3.1.2	Gebrauchsmittel	24
3.1.3	Gerätschaften	27
3.2	Methoden	29
3.2.1	Zellkultur	29
3.2.2	Behandlung und Bestrahlung der Zellen	30
3.2.3	Koloniebildungstest	30
3.2.4	Western Blotting	33
3.2.5	Durchflusszytometrie	36
4.	Ergebnisse	39
4.1	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung bei Set-up I	39
4.1.1	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an klonogenen Überlebenskurven	39
4.1.2	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Signalwegen	40
4.1.3	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Induktion und Reparatur der DNA-Schäden	52
4.1.4	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf Zellzyklusverteilungen	55
4.2	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung bei Set-up II	62
4.2.1	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an klonogenen Überlebenskurven	62
4.2.2	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Signalwegen	64
4.2.3	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Induktion und Reparatur der DNA-Schäden	76
4.2.4	Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf Zellzyklusverteilungen	80
5.	Diskussion	86
6.	Zusammenfassung	91
7.	Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis	92
7.1	Literaturverzeichnis	92
7.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	96
7.2.1	Abbildungen	96
7.2.2	Tabellen	98

8.	Publikationsliste.....	100
9.	Eidesstattliche Erklärung	101

1. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase B
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated kinase
ATP	Adenosintriphosphat
AUY	NVP-AUY922
BER	Base excision repair
BSA	Bovine serum albumin
CDC 25	Cell division cycle 25
CDK 1/2/4	Cyclin-abhängige Kinase 1/2/4
D ₁₀	Bestrahlungsdosis, bei der 10% der Zellen überleben
DSB	Double strand break
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	Epidermal growth factor (receptor)
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor4E
ERK1/2	Extracellular regulated kinase 1 and 2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
GBM	Glioblastoma multiforme
GEF	Guanosine triphosphate exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray, Einheit der Energiedosis
HJ	Holliday junction
HR	Homologous recombination
HRP	Horseradish peroxidase

Hsp70	Hitzeschockprotein 70
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IF ₁₀	Wachstumsinhibierungsfaktor (growth inhibition factor)
IMRT	Intensity-modulated radiotherapy
IR	Ionising radiation (ionisierende Strahlung)
kDa	Kilodalton
Ku70/80	Lupus Ku autoantigen protein p70/p80
MAPK	Mitogen-activated protein kinase = MEK
MEK	Mitogen-activated protein kinase = MAPK
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
MMR	Mismatch repair
MRN	MRE11–RAD50–NBS1
mut	Mutation/Mutante
NEF	Nucleotide exchange factor
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Nonhomologous end joining
NSCLC	Non-small cell lung cancer
pAKT	Phosphorylated AKT
PARP	Poly(ADP-ribose)-polymerase
p4E-BP1	Phosphorylated eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1
pERK	Phosphorylated extracellular regulated kinase
p53	Protein 53
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Plating efficiency (Plattiereffizienz)
PD	PD184352; CI-1040
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PKB	Protein kinase B = AKT
PTEN	Phosphatase and tensin homolog

RAC	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RAS	Rat sarcoma protooncogene
RAF-1	Rapidly accelerated fibrosarcoma protein 1
Rb	Retinoblastoma protein
RIPA	Radio immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
PI	Propidiumjodid
pS6	Protein S6
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SCLC	Small cell lung cancer
SD	Standard Deviation/Standardabweichung
SE	Standard Error/Standardfehler
SF2	Surviving fraction at 2 Gy
SOS-1	Son of sevenless homolog 1
SPRED	Sprouty-related protein with an EVH1 domain
SSB	Single strand break
TMZ	Temozolomide
TSG	Tumor suppressor gene
UICC	The Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
γ H2AX	An Serin 139 phosphoryliertes H2AX

2. Einleitung

Die Bestrahlung ist lange schon ein fester Bestandteil in der Therapie von Krebserkrankungen. Bis die Strahlung das Zielvolumen erreicht muss sie durch gesundes Gewebe treten, wodurch Nebeneffekte entstehen. Das ultimative Ziel ist es bei möglichst geringen Nebeneffekten maximal viele Tumorzellen abzutöten und die Kontrolle über das Tumorgewebe zu gewinnen. Mit der Intensitätsmodulierten Strahlentherapie (IMRT) sind die Möglichkeiten zur Schonung des Normalgewebes und Konzentration der ionisierenden Strahlung im Tumor an der technischen Limitation angelangt. Es erscheint daher wichtig, weitere Möglichkeiten zur Verbesserung auch aus anderen Teilbereichen der Krebstherapie zu evaluieren. Die Molekularbiologie beforcht neben direkt zytotoxischen Mitteln seit den letzten Dekaden insbesondere strahlensensibilisierenden Substanzen. In diesem Zusammenhang wird gerne von der personalisierten Medizin gesprochen, deren Intention es ist, anhand von biologischen Markern eine Individualisierung der Therapie vorzunehmen und damit eine bessere Tumorkontrolle zu erzielen.

Grundsätzliches Ziel dieser Therapie ist, durch eine hohe Spezifität der Wirkstoffe eine nebenwirkungsarme Therapie zu erreichen. Das Problem hierbei ist einerseits die Komplexität und Diversität der Zielpunkte, namentlich der Signalwege. Andererseits meist ein ubiquitäres Vorkommen der Ziele, so auch in gesunden Zellen. Das Wort „zielgerichtet“ ist in diesem Zusammenhang demnach nur bedingt gültig und stellt einen wesentlichen Faktor bezüglich der Nebenwirkungen dar.

Tumore besitzen weiterhin die Möglichkeit zur Kompensation von Schäden und müssen auch hinsichtlich dieser Eigenschaft behandelt werden. Dies berücksichtigend ist der aktuelle Ansatz, eine Kombination von Wirkstoffen zusammen mit der ionisierenden Strahlung zu verabreichen, die an verschiedenen Zielen angreifen.

Die nun folgende Einleitung gibt zunächst einen Überblick über die Standardbehandlung und die Klinik der beiden zur Diskussion stehenden

Krankheitsbilder, nämlich des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und des Glioblastoms. Anschließend werden Grundlagen der Tumorbiologie sowie typischer molekularer Signalwege erläutert, um dann auf der Basis von Vorarbeiten des strahlenbiologischen Labors der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie die Fragestellung dieser Arbeit darzulegen.

2.1 Epidemiologie und Standardbehandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms

Daten der WHO aus dem Jahre 2018 zufolge ist das Lungenkarzinom mit jährlich 2,1 Millionen Neuerkrankungen (11,6% aller Neuerkrankungen an Krebs) und einer Sterbezahl von 1,8 Millionen (18,4% aller Krebsopfer) unverändert die weltweit häufigste letale Krebserkrankung¹. 2016 verstarben in Deutschland 29.324 Männer und 16.481 Frauen an den unmittelbaren Folgen eines Lungenkarzinoms², wobei einheitlich eine steigende Tendenz bei Frauen verzeichnet wird. Die relative fünf-Jahres-Überlebensrate betrug im Jahr 2016 bei Männern 15% und bei Frauen 21%². Bei Männern stellt Lungenkrebs die häufigste durch Krebs bedingte Todesursache dar, bei Frauen folgt sie auf Brustkrebs als zweithäufigste Todesursache.

Lungenkrebs ist der Histologie nach in kleinzellige bzw. small cell (15%, SCLC) und nicht-kleinzellige Tumore bzw. non-small cell lung cancer (85%, NSCLC) einzuteilen, wobei die nicht-kleinzellige Variante weiter in Plattenepithel-, Adeno- und großzelliges Karzinom unterteilt wird³. Die angewandte Therapie richtet sich nach der Typisierung der Krebszellen sowie dem Stadium der Erkrankung. Befindet sich der Krebs noch in einem frühen Stadium (UICC I, II), ist eine operative Entfernung des Geschwürs vorgesehen⁴. Im Falle der Inoperabilität gilt die stereotaktische Radiotherapie als Standardverfahren der Wahl⁵. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien (UICC IIIA/B) erhalten die Patienten eine Radiochemotherapie. Als Standard-Chemotherapeutikum gilt die platinhaltige Doublette, bestehend aus entweder Carboplatin oder Cisplatin und einer weiteren Substanz wie Taxol oder Vinorelbine⁶. Der Trend geht dahin, die verabreichten Substanzen den Zelleigenschaften des Tumorgewebes individuell anzupassen. So werden beispielsweise fortgeschrittene und metastasierte Adenokarzinome mit einer Platin/Pemetrexed-Kombination, ggf. mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab behandelt⁷. Im Hinblick auf eine weitere Individualisierung der Behandlung des Adenokarzinoms steht neuerdings beim allerdings sehr seltenen, EGFR-mutierten Karzinom die Behandlung mit verschiedenen Antikörpern zur Verfügung. Interessanterweise konnte hier bei Vorliegen einer del19-Mutation ein deutlicher Überlebensvorteil durch den

Antikörper Afatinib im Vergleich zur Chemotherapie mit Cisplatin/Pemetrexat gesehen werden⁸. Bei Behandlung des Stadium-IV-Karzinoms nimmt die Radiotherapie, ggf. Chemotherapie, und wohl auch die Antikörperbehandlung eine ausschließlich palliative Rolle ein.

Die schlechten Prognosezahlen sind der unauffälligen Symptomatik im frühen Stadium und dadurch späten Diagnose geschuldet. Die Therapie beginnt für ca. 70% der Patienten erst in einem fortgeschrittenem Stadium und ermöglicht zu diesem Zeitpunkt kaum noch eine Chance auf kurativen Ausgang⁹.

2.2 Epidemiologie und Standardbehandlung des Glioblastoms

Glioblastome stellen bei einer jährlichen Inzidenz von drei Neuerkrankten auf 100.000 Personen mit einem Anteil von ca. 23% an allen primären Hirntumoren die häufigsten Gliome und gleichzeitig die bösartigsten Vertreter intrakranieller Tumore¹⁰. Eine Erkrankung an einem Gehirntumor ist deshalb verglichen mit allen anderen Krebsarten relativ selten. Für die Krankheit sind bislang keinerlei Risikofaktoren wie Rauchen, ungesunde Ernährung oder Alkoholabusus bekannt, die einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben.

Der derzeitige Behandlungsstandard für neu diagnostizierte Glioblastome ist eine größtmögliche chirurgische Resektion, gefolgt von einer adjuvanten Radiochemotherapie. Die Verabreichung von Temozolomid (TMZ) führt zu einer statistisch signifikant verbesserten Überlebensrate, während sie nur mit einer wenig erhöhten Toxizität einhergeht. Die Verbesserung der Lebenserwartung ist offenbar verbunden mit der durch TMZ bewirkten Methylierung des MGMT Promoters, was eine Stilllegung des Gens bewirkt¹¹.

Die Überlebensrate nach einer Temozolomid-basierten Radiochemotherapie betrug nach zwei Jahren 27,2%, nach drei Jahren 16,0%, nach vier Jahren 12,1%, und nach 5 Jahren 9,8%. Dem gegenüber standen Überlebensraten von 10,9%, 4,4%, 3,0%, und 1,9% zu den entsprechenden Zeitpunkten nach alleiniger Bestrahlung¹¹. Die Lebenserwartung beim Glioblastom ist insgesamt niedrig und durch zu erwartende funktionelle Einschränkungen ist die Radikalität einer Exzision sehr limitiert.

Die Behandlung dieser Krebsart beherbergt eine Reihe von Hindernissen, allen voran die Neigung des Geschwürs anliegendes Gehirngewebe diffus zu infiltrieren. Weiterhin sprechen die Zellen nur sehr mäßig auf Bestrahlung und Chemotherapie an¹², zumal besonders die sogenannte Blut-Hirn-Schranke eine große Hürde ist, die das Erreichen von wirksamen Medikamenten-Spiegeln im Liquor sehr schwierig gestaltet.

2.3 Tumorbiologie und Signalwege

In gesunden Zellen gibt es auf Proteinebene eine Vielzahl von Signalproteinen, die kaskadenartig aufeinander einwirken, und empfindliche Reparaturmechanismen, die für den reibungslosen Ablauf innerhalb der Zelle zuständig sind. Zur Entstehung von Tumoren kommt es, sobald infolge fehlerhaft oder unvollständig reparierten DNA-Schäden eine Mutation entstanden ist und der programmierte Zelltod ausbleibt. DNA-Schädigungen können exogenen (Chemische Substanzen, Viren, Strahlung) oder auch endogenen (reaktive Metabolite, Polymerasefehler, Depurinierungen) Ursprungs sein¹³.

Die primäre Problematik der Tumorerkrankung besteht darin, dass die schadhaften Zellen dazu befähigt sind, sich unendlich und unabhängig von externen Signalen zu teilen, also unaufhörlich wachsen. Daneben haben Tumorzellen die charakteristische Eigenschaft, abhängig von der Krebsart in umliegende Gewebe einzudringen und sogenannte Metastasen, Tochtergeschwülste, zu bilden.

Um in der Lage sein zu können, Defekte der Gewebemöostase zu charakterisieren, ist es entscheidend die einzelnen Komponenten zu benennen. Normal stehen proliferative und antiproliferative Mechanismen in einem Gleichgewicht, doch werden entweder Protoonkogene hochreguliert (damit zu Onkogenen) und/oder Tumorsuppressorgene (TSG) inaktiviert, besteht damit ein unkontrollierter Ablauf des Zellzyklus.

2.4 Strahlenbiologische Grundlagen

Eine klassische Strahlenantwort der Zelle ist kaum zu definieren. Die Auswirkung von Bestrahlung divergiert selbst innerhalb einer Zellart von Zelllinie zu Zelllinie, insbesondere bei unterschiedlichem Mutationsstatus. Zellen verschiedener Entität reagieren zudem sehr unterschiedlich auf Modifikatoren beziehungsweise Inhibitoren. Weiter entscheidet bei Bestrahlung die Strahlenart, Fraktionierung der Dosis und Dauer der Bestrahlung, alles im Zusammenhang mit entstandenen Schäden und Reparaturzeit. Der Erfolg von Kombinationen aus Modifikatoren und Bestrahlung hängt damit auch von dem Bestrahlungs/Behandlungs-Zeitplan

ab. Als beeinflussender Faktor gilt auch die Sauerstoffperfusion bzw. die Hypoxie. Bekannt ist, dass hypoxische Tumore resistenter, auch gegen Strahlung, sind¹⁴.

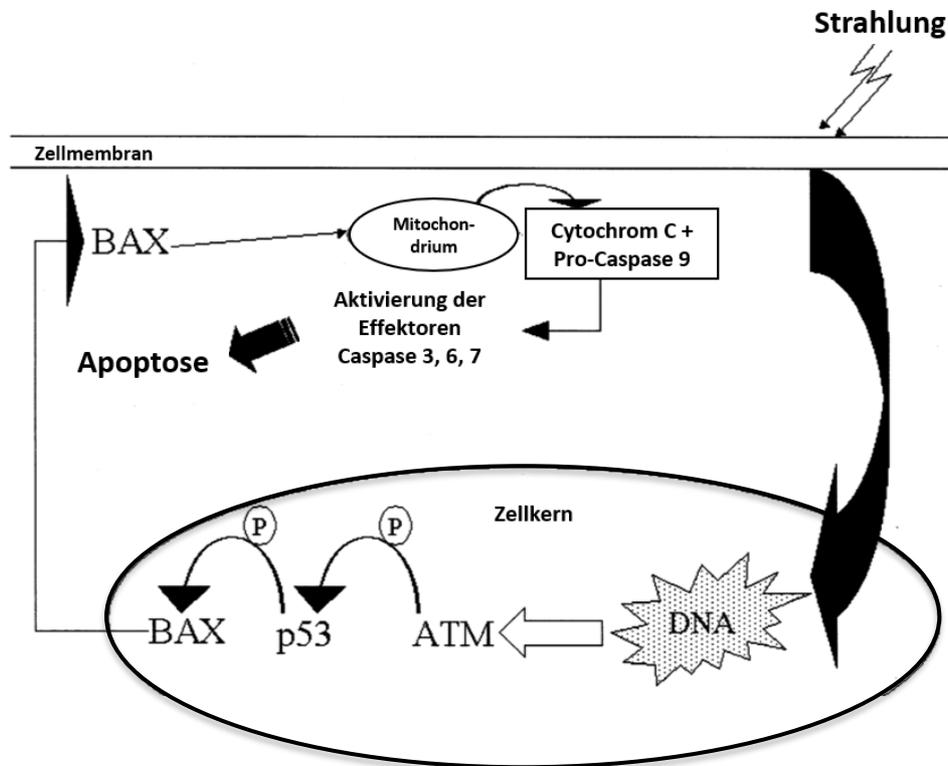


Abb. 2.1. Abbildung der mitochondrial vermittelten Apoptose als Antwort auf strahleninduzierten DNA-Schäden¹⁵. Primäres Ziel sind bei Bestrahlung die Zellkerne als biologisch kritische Moleküle. Entsteht dort ein nicht reparierbarer Schaden, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet. Modifiziert nach Pawlik, T. M. et al. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy (2004).

Ziel der Bestrahlung ist nicht unbedingt der direkte Zelltod (Mechanismus siehe Abb. 2.1.), sondern auch bereits ein Eingriff in die unbegrenzte Teilbarkeit der Tumorzellen. Neben dem Abtöten der Zellen gewinnt man lokale Kontrolle auch, indem ein klonogener Zelltod eintritt, d.h. Zellen nach Bestrahlung die Fähigkeit verlieren, sich unaufhörlich zu teilen¹⁶.

Ein weiteres Resultat von Bestrahlung ist eine Distorsion des Zellzyklus, typischerweise ein G2-Arrest. Zellen weisen abhängig von ihrem Befinden in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus eine unterschiedliche

Strahlensensibilität auf. Durch eine variierende Strahlensensibilität bedingt, tritt eine Zellzyklus-Synchronisation der behandelten Zellen auf.

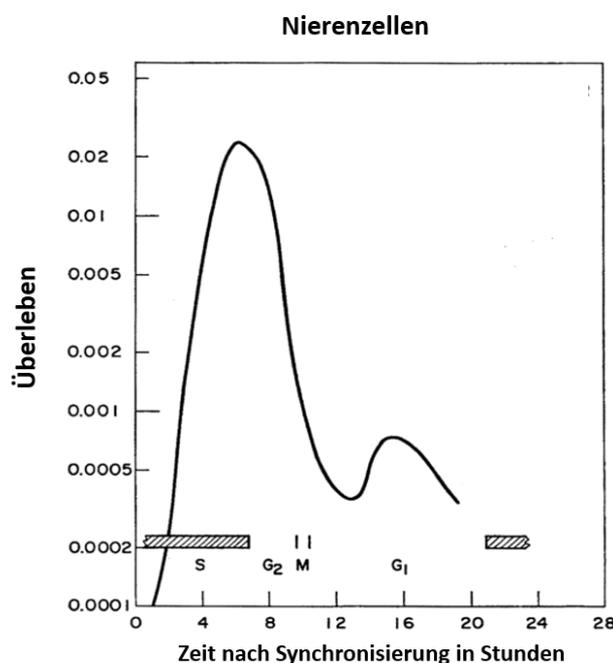


Abb. 2.2. Darstellung des Zellüberlebens nach Bestrahlung, exemplarisch für die Unterschiede in der Strahlensensibilität abhängig von der jeweiligen Zellzyklusphase¹⁵. Am Beispiel der obigen Überlebenskurve humaner Nierenzellen wurde hier sinnbildlich die schon 1969 von Sinclair beschriebene Zellzyklus-Abhängigkeit abgebildet. Modifiziert nach Pawlik, T. M. et al., Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy (2004).

Grundlegend weisen Zellen nach einem langsamen Anstieg der Strahlensensibilität während der G2-Phase in der Mitose die höchste Empfindlichkeit auf. In der G1-Phase zeichnen sich Zellen durch eine geringe Sensibilität aus und im späten Teil der S-Phase haben Zellen die höchste Strahlenresistenz. Unterschiedliche Zelllinien und Zellarten können völlig verschiedene Strahlenempfindlichkeiten aufweisen.

2.4.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus wird reguliert durch eine Reihe von heterodimeren Serin/Threonin-Kinasen, den Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks). Während die bloßen Kinasen den gesamten Zyklus über in relativ konstanter Menge vorliegen, oszillieren die Konzentrationen der Cycline je nach Phase des Zellzyklus und aktivieren damit ihre zugehörige Kinase¹⁷.

Die G1-Phase wird eingeleitet, wenn die Konzentration von Cyclin D ansteigt und

dadurch Cdk4 und Cdk6 aktiviert werden. In der späten G1-Phase wird zudem Cdk2 durch Bindung von Cyclin E aktiviert. Diese Kinasen sind verantwortlich für die Phosphorylierung des Retinoblastomaproteins (Rb), welches in hypophosphoryliertem Zustand die Anhäufung des Transkriptionsfaktors E2F verhindert, der für den Eintritt in die S-Phase nötig ist^{18,19}. Das durch den Transkriptionsfaktor ermöglichte Ablesen von Genen vermittelt die Progression in die S-Phase, in der Cdk2 durch erhöhte Cyclin A-Konzentration aktiviert wird, die ihre Funktion bis einschließlich zum S/G2 Übergang aufrecht erhält und mit verantwortlich für die identische Verdopplung des Erbguts ist²⁰. Der Eintritt von der G2-Phase in die Mitose benötigt die Akkumulation von Cyclin B/Cdk1 (=Cdc2). Der Abbau von Cyclin B nach dem Übergang von der G2-Phase zur Mitose resultiert in einer Rb-Hypophosphorylierung, was wiederum nach erfolgter Zellteilung das Überwinden des Spindelkontrollpunkts und das Ende des Zellzyklus einleitet^{21,22}.

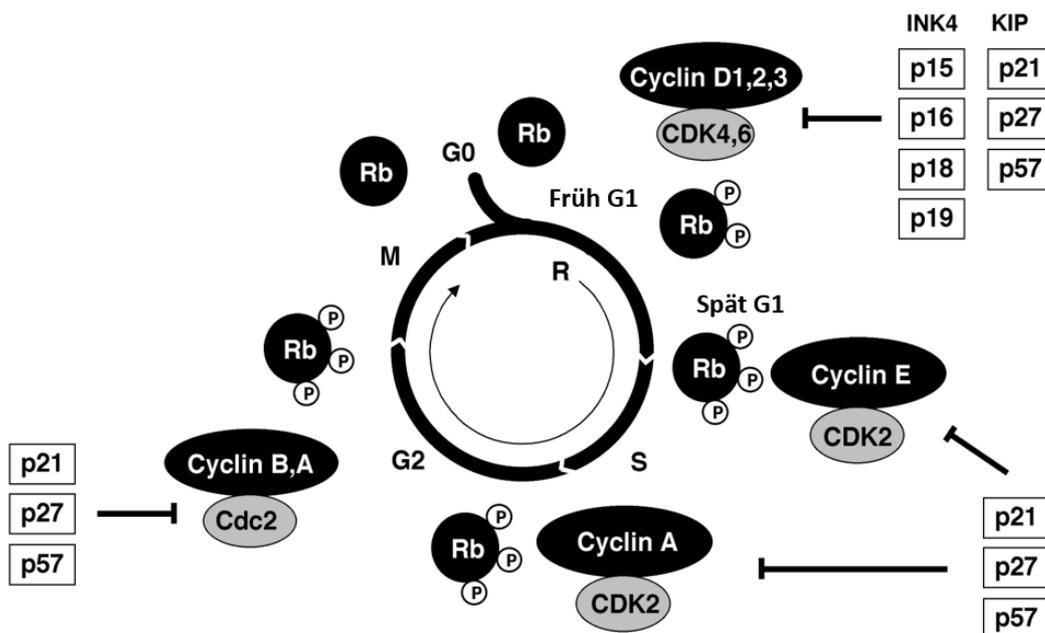


Abb. 2.3. Darstellung des Zyklus der Zellteilung. Dargestellt ist der oben erklärte Ablauf des Zellzyklus mitsamt der wichtigsten, für den Ablauf notwendigen Kinasen und Proteine²⁰. Modifiziert aus Daniel, P. Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren (2002).

Während des Zellzyklus wird ausschließlich an definierten Stellen die Unversehrtheit des Erbguts überprüft, so am Ende der G1-Phase. Dieser Kontrollpunkt wird wesentlich durch den Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 vermittelt. Liegt eine p53-Mutation vor, so kommt es

nach externem Stress zu keinem G1-Arrest. Als zelluläre Antwort auf eine niedrig dosierte Bestrahlung kommt es erfahrungsgemäß zu einem G2-Arrest¹⁶.

Das *p53* aktiviert beispielsweise die für Protein 21 und BAX codierenden Gene. Unter zellulärem Stress sorgen von *p53* transaktivierte Proteine wie p21 für einen Arrest des Zellzyklus oder es werden bei ausgebliebener Reparatur Proteine wie PUMA, BAX und NOXA für die Initiierung der Apoptose freigesetzt²³. Die genannten Proteine der Apoptose sorgen für eine sogenannte mitochondrial vermittelte Apoptose, die über Freisetzung von Cytochrom c aus der Atmungskette läuft.

2.4.2 DNA-Schäden und Reparaturprozesse

Ionisierende Strahlung oder der Kontakt mit zytotoxischen Substanzen können für Schäden in der DNA-Struktur sorgen. Wird eine Zelle mit einem Gray bestrahlt, entstehen ca. 4000 Schäden. Davon sind ca. 40 Doppelstrangbrüche (DSBs), 1000 Einzelstrangbrüche (SSBs) und weitere 3000 Basenschäden, gehäufte Läsionen und DNA-Protein-Verbindungen¹⁶. Ist ein aufgetretener Fehler erfolgreich erkannt und der Zellzyklus gestoppt, versucht die Zelle den Schaden zu beheben. Abhängig von dem Schaden, bei DSBs auch von der Zellzyklusphase, ist ein spezifischer Reparaturmechanismus für das Beheben des Defekts verantwortlich²³.

Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER, base excision repair) kommt zum Einsatz, wenn entweder ein Einzelstrangbruch oder eine fehlerhafte (alkylierte, oxidierte, deaminierte) bzw. fehlende Base vorliegt. Schadhafte Stellen werden enzymatisch aus dem Strang geschnitten und ersetzt, wobei die Schlüsselenzyme Poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) 1 und 2 als Sensoren fungieren und die Schäden erkennen²⁴. Im Vergleich zur BER ist die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER, nucleotide excision repair,) für das Beheben umfangreicherer DNA-Schäden zuständig. Große Defekte treten zum Beispiel als Konsequenz von UV-Strahlung oder Behandlung mit Cisplatin auf²⁵.

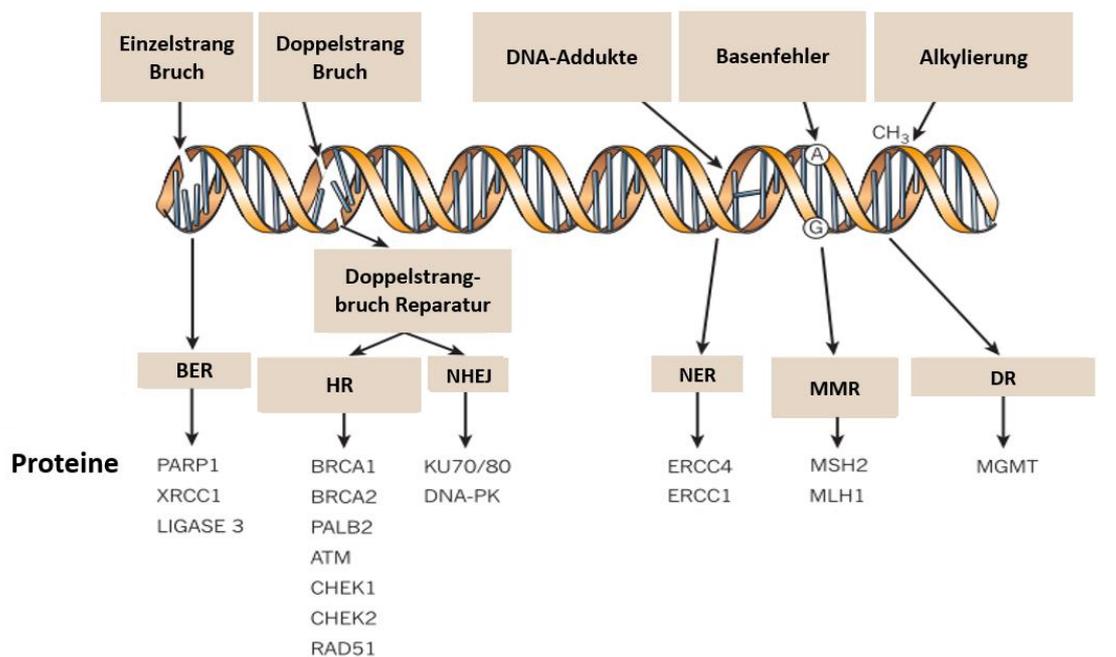


Abb. 2.4. Darstellung der unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen von der Art des Insultes bis hin zu den für die Reparatur benötigten Proteinen. Für die Instandhaltung der DNA gibt es fünf hauptverantwortliche Mechanismen. Diese umfassen die Nucleotid-Exzisionsreparatur (NER), die Basen-Exzisionsreparatur (BER), die Mismatch-Reparatur (MMR) und für Doppelstrangbrüche die Mechanismen der „Nicht-Homologen Endverbindung“ (NHEJ: non-homologous end joining) und der Homologen Rekombination (HR). Daneben gibt es weiterhin den Mechanismus der direkten Reparatur (DR). Die in den einzelnen Mechanismen involvierten Proteine sind unter dem jeweiligen Feld in der Grafik aufgeführt²⁴. Modifiziert nach Lehman, J. A. et al., Integration of DNA damage and repair with murine double-minute 2 (Mdm2) in tumorigenesis (2012).

Für DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) gibt es zwei Reparaturmöglichkeiten: Nicht-Homologes-End-Verbinden (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR). Die Phase des Zellzyklus entscheidet dabei, auf welche Weise repariert werden kann. Liegt das Erbgut verdoppelt vor, die Zelle befindet sich also in später S- oder G2-Phase, kann der komplementäre DNA-Strang als Matrize dienen und „Homologe Rekombination“ stattfinden. Bei diesem Prozess wird die ursprüngliche Basensequenz fehlerfrei nachgebaut²³. Durch einen MRN-Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1) am Doppelstrangbruch wird zunächst die ATM-Kinase rekrutiert, welche für die DSB-charakteristische Phosphorylierung von H2AX sorgt. Die phosphorylierte Form des H2AX wird γ H2AX genannt. Im Folgenden zersetzen Exonukleasen die Bruchstelle so, dass an beiden Seiten ein einsträngiger DNA-Abschnitt (ssDNA) vorhanden ist²⁶. An dieser Stelle bindet sich über das Replikations-Protein A (RPA) unter anderem Rad51, weshalb die Einzelstränge folgend Nukleoprotein-Filamente genannt werden. Diese

Filamente können sich nach Helikase-Aktivität am Schwesterchromosom anlegen und bilden die sogenannten Holiday Junctions (HJ)^{27,28}. Aus den Holiday Junctions gehen mit Hilfe von Enzymen zur DNA-Synthese, Resolvase und Ligase zwei intakte, homologe DNA-Stränge hervor.

Das Procedere des NHEJ beginnt damit, dass sich am jeweiligen Terminus das ringförmige Heterodimer Ku70/Ku80 anlagert, das die DNA-PK rekrutiert. Nach durch Phosphorylierung ausgelöster Aktivierung verbindet ein Effektor-Komplex (Ligase IV, Xrcc4, Xlf) die beiden Enden des Doppelstrangbruchs²⁶. Diese Art von Doppelstrangreparatur kann während des ganzen Zellzyklus ausgeführt werden und ist dabei verglichen mit der HR die schnellere Variante, jedoch anfälliger für Fehler²⁴.

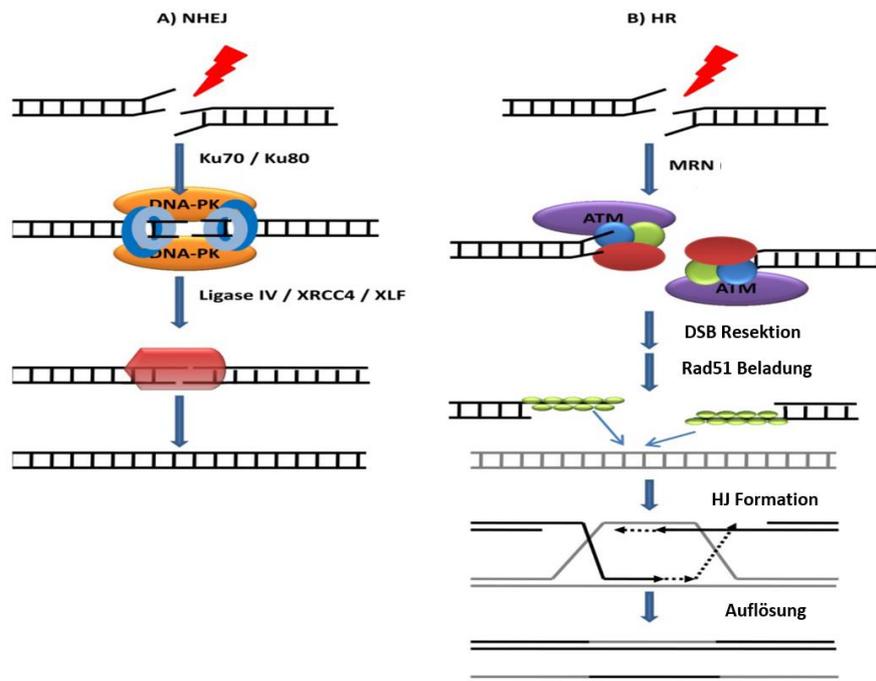


Abb. 2.5. Darstellung der Reparaturmechanismen, die für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zuständig sind. Kommt es zu einem Insult der DNA, woraus ein Doppelstrangbruch resultiert, gibt es zwei Möglichkeiten diesen Bruch zu beheben, per Nicht-Homologer Endverbindung oder der Homologen Rekombination. Aufgeführt sind auch für den Ablauf notwendige Proteine²⁶. Modifiziert nach Lopez-Contreras, A. J. et al. Signalling DNA Damage (2012).

Bleibt die volle Reparatur eines DNA-Schadens aus oder ist der Umfang des Defekts zu groß, wird idealerweise der programmierte Zelltod eingeleitet. Bleibt die Apoptose aus, kann es damit zu Mutationen und im Gefolge zur Tumorentstehung kommen.

2.4.3 HSP90, HSP70 und Inhibitor NVP-AUY922

Auf der Suche nach immer effektiveren Mitteln für die Tumorthherapie ist auch das Hitzeschockprotein 90 (HSP90, heat shock protein 90) in das Blickfeld der Forschung geraten. Mit einem Anteil von 1-2% an allen zellulären Proteinen ist es eines der verbreitetsten, zudem ubiquitär vorhanden und konstitutiv exprimiert. Erlittener Stress, HSP90 wird auch Stressprotein genannt, erhöht die gebildete HSP Menge zusätzlich und vermittelt viele Reaktionen, die Zellen strapazierfähig machen^{29,30}. Alles in allem sind Hitzeschockproteine als vielversprechendes „Target“ in Erscheinung getreten.

Das Hitzeschockprotein ist ein Chaperon und damit verantwortlich für einwandfreie Faltung oder Entfaltung von Klienten-Proteinen. Zu den Klienten von HSP90 zählen PKB, MEK, mTOR, Raf-1, p53, Zellzyklus-Proteine wie cdk1, cdk4 und andere^{30,31,32}. Von insbesondere den gerade genannten Proteinen ist wohl bekannt, dass sie die für Tumorzellen typischen Charakteristika, „Hallmarks of Cancer“, bedingen und zugleich Funktionen in den wichtigsten Signalwegen zeigen. Das Hemmen von HSP90 und dadurch indirekt bewirkte Deaktivierung bzw. Degradation von Klienten zeigt aufgrund der weitreichenden Funktion des Chaperons eine außerordentlich vielfältige Auswirkung. Weiterhin ist das HSP90 ein attraktiver Angriffspunkt für die Krebstherapie, da Proliferation und verminderte Neigung zur Apoptose oft durch eine Hochregulation des HSP-Systems bedingt sind³³.

HSP70 ist wie HSP90 ebenfalls ubiquitär vorhanden, ATPase-abhängig und an zahlreichen Zellfunktionen beteiligt. Obligatorisch für dieses Chaperon sind Cochaperone aus der J-Protein Familie (z.B. Hsp40) und „Nucleotide Exchange Factors“ (NEF)³⁴. HSP70 kann zusammen mit HSP90 eine zusammenhängende Maschinerie bilden, die für das Vervollständigen einiger Proteine notwendig ist. Unter den Klienten sind Hormonrezeptoren und einige Transkriptionsfaktoren³⁴.

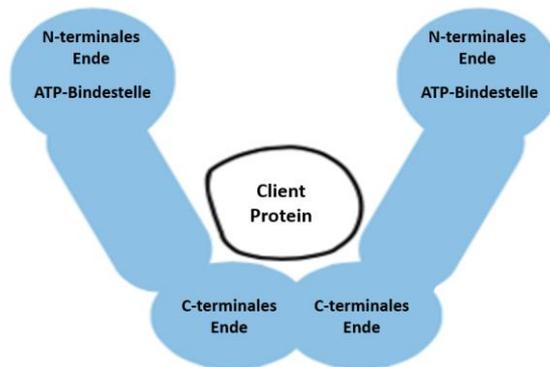


Abb. 2.6. Darstellung des Aufbaus von HSP90³⁵. Das Protein besteht aus drei Domänen und arbeitet in homodimerisierter Form unter dem Einfluss diverser Cochaperone. Während NVP-AUY922 inhibierend durch eine Wechselwirkung an der C-Endung des Hitzeschockproteins, genauer der ATP-Bindestelle, wirkt, gibt es ebenso Substanzen, die inhibierend über das C-terminale Ende wirken. Modifiziert nach Jegu, G. et al. Targeting heat shock proteins in cancer (2013).

Der angewendete Inhibitor NVP-AUY922 (auch genannt VER-52296 oder Luminespib) blockiert die ATP-Bindungsstelle des HSP90 und verhindert damit die Funktion des Chaperons³⁵.

2.4.4 MAPK-Signalweg und Inhibitor PD184352

Der zugrundeliegende Signalweg der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) ist eine lineare Abfolge oder auch Kaskade von Kinasen. Dass dieser Signalweg in jeder dritten aller untersuchten Krebszellen mutiert ist, macht ihn besonders beachtenswert^{36,37}. Durch eine solche Mutation kommt es zu einer konstitutiven Anregung der folgenden Signalproteine in der Signalkaskade.

Trifft im Normalfall ein externes Signal an den Rezeptor in der Zellwand, einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase, erfolgt eine Autophosphorylierung des Rezeptors, das Adapterprotein Grb2 bindet an die phosphorylierte Domäne und rekrutiert GEFs (GTP Exchange Factors) wie SOS-1 und CDC 25 an die Membran. RAS-Proteine werden durch die GEFs mit GTP versorgt und können sich somit binden³⁸. Bei den RAS-Isoformen (K-, N-, H-RAS) handelt es sich um eine GTPase, die ihrerseits in einem Viertel aller Fälle mutiert ist und mit einer Vielfalt von Aktivatoren und Effektoren in zahlreiche Funktionen, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose eingebunden ist³⁷. Neben der Übertragung auf das

RAF-Protein im MAPK-Weg sind die PI3K (Phosphatidyl-inositol-3-Kinase), PAK und Rac andere Ziele von RAS³⁹.

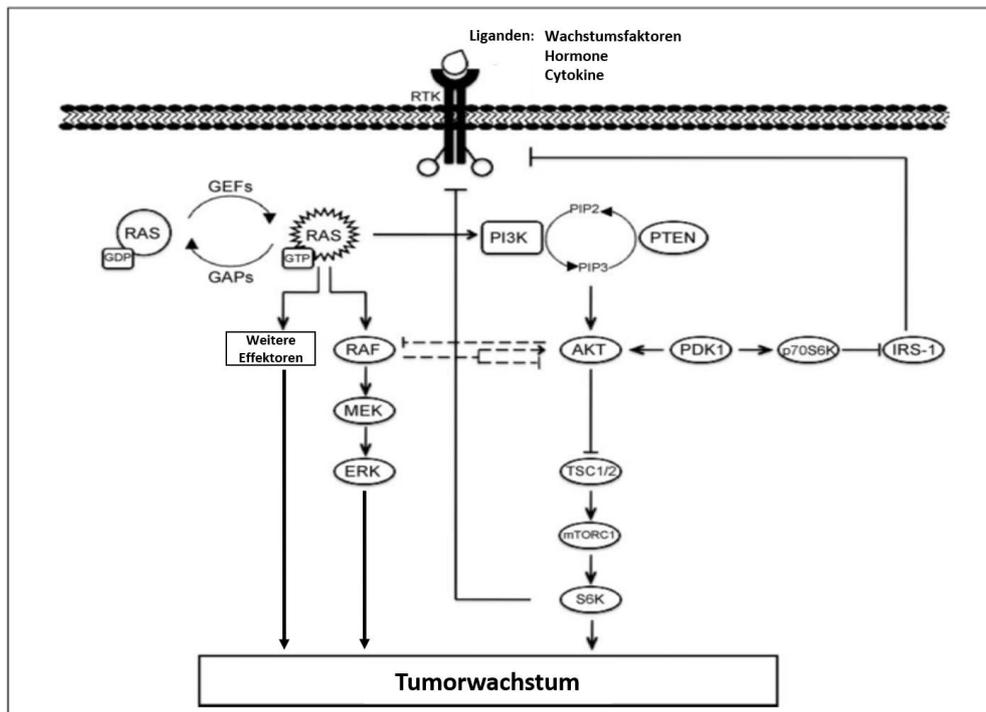


Abb. 2.7. Darstellung der Interaktion zwischen MAPK- und PI3K-Signalweg³⁸.

Es ist bekannt, dass einige Schnittstellen zwischen den beiden Signalwegen existieren. Unter anderem gibt es sogenannte Feedback-Signale zwischen ihnen, sodass es unter MEK-Inhibition beispielsweise zur einer Hochregulation von AKT kommt⁴⁰. Modifiziert nach Turke, A. B. et al. MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors (2012).

Im Folgenden aktiviert RAS eine der RAF-Protein-Isoformen, A-Raf, B-Raf oder C-Raf (=Raf-1), die wiederum durch Phosphorylierung MEK1 und MEK2 aktivieren⁴¹. Weil der MAPK-Signalweg über eine Vielzahl von Isoformen ablaufen kann, könnte man ihn treffender als multi-lineare Signalkaskade bezeichnen⁴². MEK1/2 bringt schlussendlich die Endglieder der Signalkette, ERK1 und ERK2, in Gang. ERK1/2 haben mit ihrem Einfluss auf Translation, Proliferation, Zellzyklus und Migration eine generell antiapoptotische Wirkung inne⁴³.

Mit der Entdeckung des MAPK-Signalwegs als gewichtiger Baustein der Tumorbologie sind einige verschiedene Inhibitoren diesbezüglich entwickelt worden. Neben Farnesyl- oder Geranylgeranyltransferase-Inhibitoren, selektiven

RAF-Inhibitoren (speziell V600E) und ATP kompetitiven ERK-Hemmstoffen wurden auch MEK-Inhibitoren wie PD184352 entwickelt⁴⁴. PD184352 (= CI-1040) ist in der Vergangenheit bis in die Phase II hinein getestet, bei guter Verträglichkeit jedoch klinisch unzureichender Wirkung aussortiert worden⁴⁵.

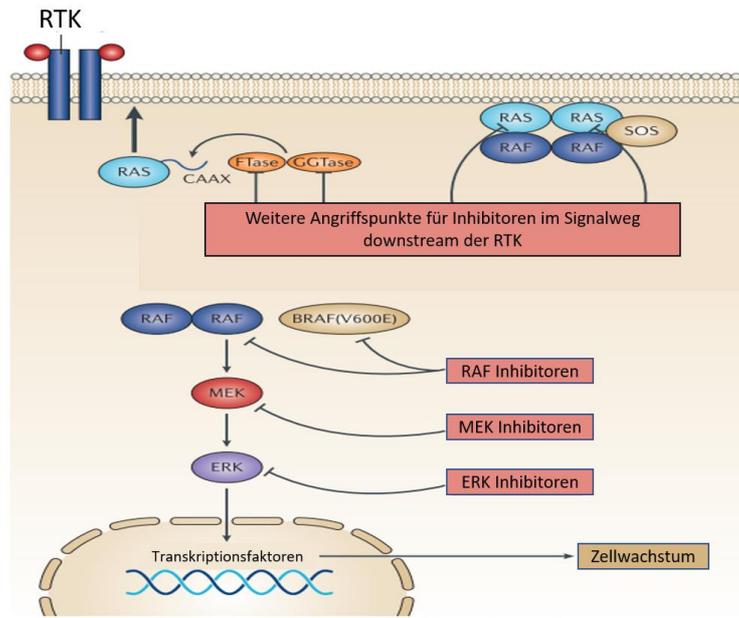


Abb. 2.8. Abbildung der Signalkaskade des MAPK-Weges⁴⁴.

Eine der prominentesten Mutationen des MAPK-Weges ist mit über 90% aller BRAF-Mutationen die sog. BRAF V600E-Mutation. An der Stelle der 600. Base tritt Glutamat an die Stelle von Valin, woraufhin die mutierte BRAF eine stark erhöhte Kinaseaktivität aufweist³⁷. Weiterhin aufgeführt sind einige der bekannten Angriffspunkte für die Hemmung der Signalkaskade. Modifiziert nach Samatar, A. A. et al., Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges (2014).

Der MEK-Inhibitor PD184352 bindet mit einem IC50- (inhibitory concentration) Wert von 17 nM speziell an MEK1/2. Die Hemmung erfolgt nicht ATP- oder ERK1/2-kompetitiv sondern allosterisch^{46,47}. Der Eingriff im Signalweg an der Stelle der MEK-Kinase ist sinnvoll, da diese nur selten mutiert und damit ein zuverlässiger Schalter für Untersuchungen ist⁴³.

2.5 Vorarbeiten

Im Vorfeld wurde in Untersuchungen durch Stingl et al.⁴⁸ bei NVP-AUY922-Behandlung eine starke Strahlensensibilisierung der Zelllinie SNB19 nachgewiesen. In der Durchflusszytometrie stellte sich heraus, dass besonders die Kombination des Hemmstoffs mit einer Bestrahlung die Kinetik der DNA-

Reparatur verlangsamt und der Zellzyklus unter S-Phasen-Depletion in einen G2/M-Phasen-Arrest verfällt. Die Untersuchung Zellzyklus assoziierter Proteine unterstützt die beobachteten Zellzyklus-Veränderungen, da pRb, Cdk1 und Cdk4 verringert exprimiert wurden. Weiterhin wurde ein Abfall der Menge von Survivin und den HSP90-Klienten Raf-1 und pAkt verzeichnet. Konträr zu diesen stimmigen Ergebnissen kommt es gleichzeitig zu einer erhöhten Expression von pS6, p4E-BP1 und speziell HSP70, einem Protein, das mit seiner antiapoptotischen Wirkung in die entgegengesetzte Richtung zielt.

Um festzustellen, ob bei den Effekten eine Abhängigkeit von Bestrahlungs/Behandlungs-Zeitplan besteht, untersuchten Niewidok et al.⁴⁹ die Folgen einer Behandlung mit dem Inhibitor NVP-AUY922 nach Bestrahlung anstatt wie Stingl et al.⁴⁸ vor Bestrahlung. Bei untereinander und mit den vorhergegangenen Versuchen vergleichbaren Veränderungen in der Proteinexpression zeigten sich große klonogene Unterschiede zwischen den Zelllinien A549 und SNB19 (s. Abb. 2.9.). Daraus wurde geschlussfolgert, dass beobachtete Expressionsveränderungen antiapoptotischer Proteine (Akt, Raf-1 und Survivin) nicht hauptverantwortlich für den radiosensibilisierenden Effekt auf SNB19-Zellen waren.

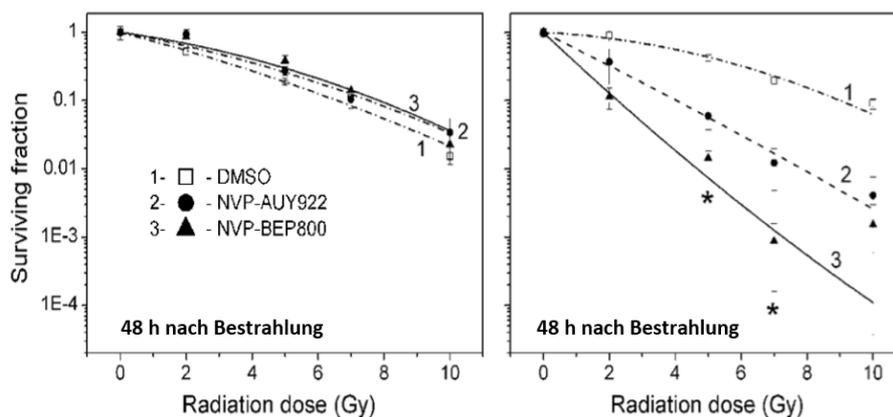


Abb. 2.9. Darstellung klonogener Überlebenskurven der Zelllinien A549 (links) und SNB19 (rechts)⁴⁹. Dargestellt ist die nach Bestrahlung überlebende Zellfraktion gegenüber der angewandten Strahlendosis. Zelllinie SNB19 weist ein deutlich geringeres Zellüberleben auf. Bei beiden Inhibitoren handelt es sich um Hitzeschockprotein 90-Inhibitoren. Modifiziert aus Niewidok, N. et al. Hsp90 Inhibitors NVP-AUY922 and NVP-BEP800 May Exert a Significant Radiosensitization on Tumor Cells along with a Cell Type-Specific Cytotoxicity (2012).

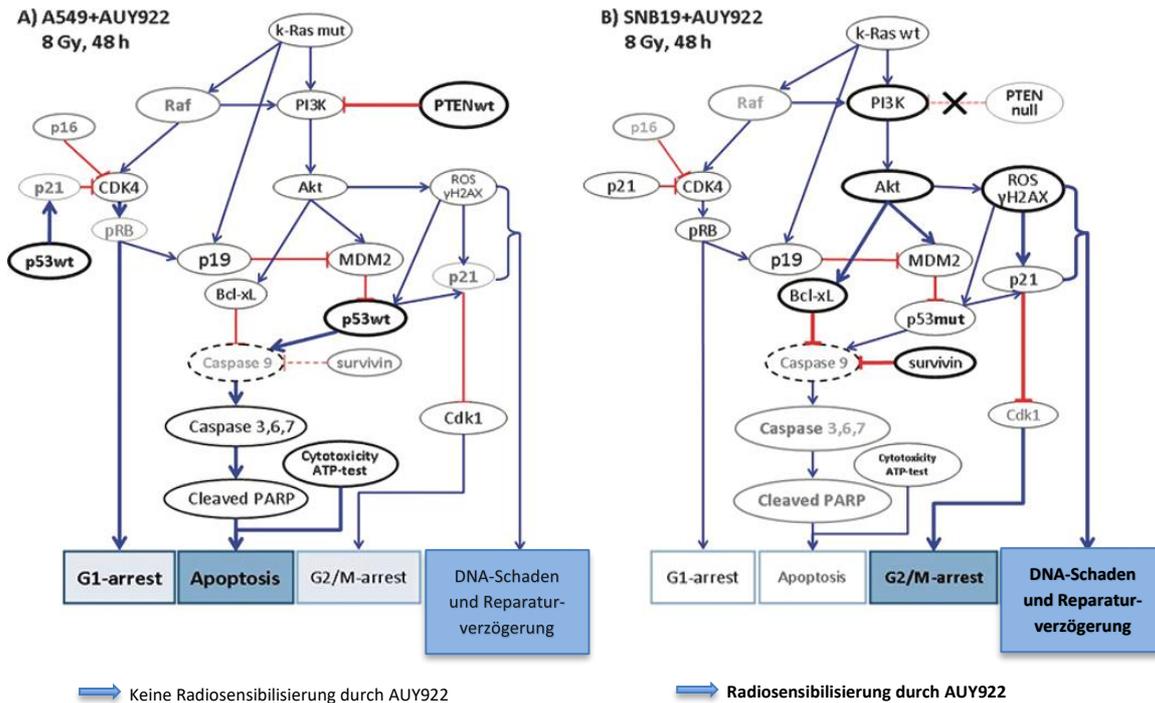


Abb. 2.10. Darstellung der bei gemeinsamer HSP90-Inhibition und Bestrahlung auftretenden Interaktionen in den Signalwegen der Zelllinien A549 (A) und SNB19 (B)⁴⁹. Die Veränderung in der Proteinexpression als Antwort auf die Behandlung untermauert das Auftreten oder Ausbleiben einer Radiosensibilisierung. Im direkten Vergleich zwischen den beiden Zelllinien zeigen sich grundlegend unterschiedliche Reaktionen auf die Behandlung. Modifiziert aus Niewidok, N. et al. Hsp90 Inhibitors NVP-AUY922 and NVP-BEP800 May Exert a Significant Radiosensitization on Tumor Cells along with a Cell Type-Specific Cytotoxicity (2012).

Erklärt wurde die Divergenz im Verhalten der beiden Zelllinien durch den unterschiedlichen Mutationsstatus. Die vermutet entsprechend unterschiedlich verlaufenden Reaktionen auf Stress sind in der oben aufgeführten Grafik (Abb. 2.10.) beschrieben.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Ein großer Fortschritt in der Beforschung von Tumorerkrankungen wurde durch die Erkenntnis der Schlüsselrolle überexprimierter Signalwege geleistet. Solche Signalwege neigen dazu, speziell in entarteten Zellen übermäßig aktiviert zu sein und dieser Zelle damit einen Überlebensvorteil zu verschaffen. Von eben solch einer Bedeutung sind die in dieser Arbeit untersuchten Zielstrukturen im MAPK-Weg und das Chaperon HSP90.

In der vorliegenden Arbeit soll die radiosensibilisierende Wirkung von MEK-Inhibitor PD184352 allein oder in Kombination mit dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 auf Tumorzellen verschiedener Entitäten untersucht werden. Hierfür wurden Zellen des Glioblastoms und des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms untersucht. Das Glioblastom gilt als der häufigste primäre, maligne Hirntumor und wird wegen seiner geringen Überlebenszeit als sehr aggressiv eingestuft⁵⁰. Die chirurgische Resektion und die postoperative Strahlentherapie gelten als Standardbehandlung. Allerdings erzielen diesen Standardbehandlungen nur palliative Behandlungserfolge⁵¹. Auch im Falle eines metastasierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, das standardmäßig per Radiochemotherapie behandelt wird, ist die 2-Jahres-Überlebensrate mit 27,2% sehr gering¹¹. Deshalb wird nach neuen Therapieansätzen auf molekularer Ebene gesucht. Derzeit sind „multi-target“ spezifische Tumortherapien in der Entwicklung, die durch das Angreifen eines Zielmoleküls mehrere Zellsignalwege blockieren und somit die Chance auf eine Resistenzausbildung der Tumorzellen gegen das Chemotherapeutikum verringern.

Ziel dieser Arbeit war, anhand der Untersuchung zweier verschiedener Tumorzelllinien (Lungenkarzinomlinie A549 und Glioblastomlinie SNB19), die sich u.a. in ihrem *p53*- und *PTEN*-Status unterscheiden, den Einfluss der MEK- und HSP90-Inhibierung auf die Strahlenantwort, bei Exponierung mit ionisierender Strahlung, zu untersuchen.

Mittels Koloniebildungstests wurde der klonogene Zelltod und das unterschiedliche Ausmaß der Strahlensensibilisierung an den Zelllinien bei unterschiedlichen Behandlungsmodalitäten betrachtet. Weiterhin wurde per Durchflusszytometrie die Wirkung der Inhibitoren auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels γ H2AX ermittelt und die Zellzyklus-Verteilung untersucht. Western Blot Versuche erbrachten Kenntnisse über Veränderungen der Proteinexpressionen.

Zusammenfassend beschäftigte sich diese Arbeit mit der Untersuchung der Modulation der Radiosensibilisierung zweier unterschiedlicher Tumorzelllinien durch Anwendung verschiedener Behandlungsschemas, variierend in der Kombination der Inhibitoren und dem Zeitpunkt der Bestrahlung. Es wurden zwei feste Zeitpläne, Set-up I und Set-up II für die Bestrahlung der Zellen verfolgt (s. Kapitel 3.2.2, Abb. 3.1.). Hierzu sollten im Einzelnen folgende Fragestellungen genauer untersucht werden:

1. Kann die MEK-Inhibition mittels PD184352 eine Strahlensensibilisierung humaner Tumorzellen hervorrufen?
2. Kann die MEK-Inhibition mit PD184352 die strahlensensibilisierende Wirkung von HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 in zwei Tumorzelllinien, Lungenkarzinom A549 und Glioblastom SNB19, verstärken?
3. Ist die Radiosensibilisierung durch den MEK-Inhibitor PD184352 vom Behandlungsschema abhängig?
4. Wie unterscheiden sich die zwei Behandlungsschemata in Hinblick auf klonogene Überlebensraten, Proteinexpressionen sowie Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und bei unterschiedlicher Zelllinie?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Verwendet wurden zwei adhärent wachsende Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten, A549 und SNB19. Die Lungenkarzinomzelllinie A549 wurde 1972 aus dem Tumor eines 58 Jahre alten Mannes kultiviert. Die Glioblastomzelllinie SNB19 stammt von einem Astrozytom eines 47-jährigen Mannes aus dem Jahre 1980. Beide Zelllinien wurden durch das Strahlenbiologische Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg bereitgestellt.

Zelllinie	<i>p53</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTEN</i>
A549	wt	mut	wt
SNB19	mut	wt	mut

Tabelle 1 Verbirdlichung des genetischen Status der Zelllinien A549 und SNB19 in ausgewählten Tumorsuppressorgenen. Die Abkürzung „wt“ steht für Wildtyp, es liegt keine Mutation in dem Gen vor. Die Abkürzung „mut“ steht für Mutation, das Gen ist mutiert.

3.1.2 Gebrauchsmittel

Inhibitoren

PD184352 (Selleckchem)

NVP-AUY922 (Selleckchem)

Dimethylsulfoxid (DMSO) als Vehikel-Kontrolle (Sigma-Aldrich)

Beide Inhibitoren wurden steril mit DMSO verdünnt aliquotiert und bis zur Verwendung im Gefrierschrank bei -80°C eingelagert.

Zellkultur

Medium für A549 und SNB19:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1000 mg Glucose (D-6046,

Sigma-Aldrich) mit folgenden Zusätzen:

10% fetal calf serum, FCS (S-0615, Biochrom)

1% L-Glutamin (G-7513, Sigma-Aldrich)

1% Penicillin/Streptomycin (P-4333, Sigma-Aldrich)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-8537, Sigma-Aldrich)
Trypsin-EDTA-Solution (T-3924, Sigma-Aldrich)

Durchflusszytometrie

Alexa Fluor 488 Goat-anti-mouse (Molecular Probes, Life Technologies)
Anti-phospho-Histon-H2AX-Antikörper (05-636, Merck Millipore)
70% Ethanol (100% Ethanol, Sigma-Aldrich)
5% FCS in PBS
0,5% Triton X-100 (T-3253, Sigma-Aldrich) in PBS
10 µg/ml Propidiumiodid (P-4170, Sigma-Aldrich) in PBS
20 µg/ml Ribonuclease A (R-5250, Sigma-Aldrich) in PBS
0,1% Saponin (47036, Fluka BioChemika) in PBS

Koloniebildungstest

Methanol p.A. (32213, Sigma-Aldrich)
Essigsäure 100% p.A. (Sigma-Aldrich)
Fixativ wurde erstellt aus drei Teilen Methanol und einem Teil Essigsäure
0,5% Kristallviolett (C-3886, Sigma-Aldrich) in H₂O

Western Blotting

Proteinbestimmung: DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, München)
Blockierpuffer 4% Milchpulver (Carl Roth) in 0.1% Tween-20/PBS (Sigma-Aldrich)
Waschpuffer 0.1% Tween-20/PBS
Verdünnungslösungen für primäre und sekundäre Antikörper:

4% Milchpulver in PBS/Tween 20 oder
4% BSA in PBS/Tween 20

Protein-Marker Precision Plus All Blue (Bio-Rad Laboratories, München)

RIPA Lysepuffer:

50 mM Tris-HCl, pH 7,4 (Sigma-Aldrich)

1% Igepal (=NP-40) (Sigma-Aldrich)

0,25% Na-Deoxycholat (Sigma-Aldrich)

150 mM NaCl (Sigma-Aldrich)

1 mM EDTA (Sigma-Aldrich)

Zu RIPA zugesetzte Protease-Inhibitoren:

1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich)

1 µg/ml Aprotinin (Sigma-Aldrich)

1 µg/ml Leupeptin (Sigma-Aldrich)

1 µg/ml Pepstatin A (Sigma-Aldrich)

Zu RIPA zugesetzte Phosphatase-Inhibitoren:

0,5 mM Natriumorthovanadat Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich)

1 mM Natriumfluorid NaF (Sigma-Aldrich)

Cumarinsäure (220 mg p-Cumarinsäure, Sigma Aldrich, in 200 ml DMSO)

ECL (Enhanced chemiluminescence, Proteindetektion) pro Membran:

5 ml Luminol (4°C)

500 µl Cumarinsäure (110 mg p-Cumarinsäure in 100 ml DMSO, RT)

5 µl H_2O_2 30%

Luminol (500 ml):

500 ml 0,1 M Tris-HCl (Sigma-Aldrich) in H_2O , pH 8,6

125 mg Luminol (Santa Cruz)

pH 8,6

0.1% Tween-20/PBS:

200 ml PBS (10x)

1800 ml H₂O

2 ml TWEEN 20

2 ml NaN₃ (5 g/50 ml PBS) in PBS

PBS (10x)

80,0 g NaCl

2,0 g KCl

4,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂HPO₄

ad 1 l H₂O, pH 7,4

Gele und Membranen (bezogen von Life Technologies):

NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel (1 mm, 12 well)

NuPAGE® 3-8% Tris-Acetate Gel (1 mm, 12 well)

NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)

Trisacetate-SDS-Running Buffer (20x)

NuPAGE® Antioxidant

NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (10 ml)

NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)

NuPAGE Transfer Buffer (20x)

Nitrocellulose Membrane, 0,2 µm Porengröße

3.1.3 Gerätschaften

Absaugpumpe N022AN.18 (KNF-Neuberger, Freiburg)

Autoklav Typ 23 (Melag Medizintechnik, Berlin)

Bestrahlungsgerät: Primus Linearbeschleuniger (6 MV, Dosisleistung 2 Gy/min, Siemens Medical Solutions, Concord, USA)

Brutschrank: Heraeus BB 5060 und BB 6220

Durchflusszytometer: FACS Canto™ II (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA)

Eismaschine (AF80, Genheimer, Hettsadt)

Elektrische Pipettierhilfe Accu-Jet® Pro (BRAND GmbH und Co KG, Wertheim)

Eppendorf Safe-Lock Gefäße™ (Eppendorf AG, Hamburg)

FACS-Röhrchen: BD Falcon™ 5 ml (BD, Biosciences, San Jose, CA, USA)

Mikroskop: Leica DM IL

Petrischalen CELLSTAR® (100 x 20mm) Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen

Pipetten: Gilson P2, P20, P100, P200, P1000

Röntgenfilme cxBCt (Röntgen Bender, Baden-Baden)

Röntgenkassette Hyperkassette (Amersham, Freiburg)

Schüttler: Vibro-Shaker L-40 (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)

Sterilbank: Heraeus HeraSafe HS12

Vortexer REAX DR1 (Heideloph Instruments GmbH & Co.KG, Kelheim)

Wasserbad: Memmert und GFL 1083

Zählkammer Neubauer-Improved (Paul Mariefeld, Lauda-Königshofen)

Zellkulturflasche: CELLSTAR® (75cm²) (Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen)

Zentrifuge: Eppendorf centrifuge 5810R (Eppendorf AG, München) und Heraeus Megafuge 1.0 R

Software

FACSDiva software v 8.0.1 (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien)

Flowing Software 2.5.1 (Turku Centre for Biotechnology, Finland)

ImageJ 1.46r (Wane Rasband, NIH, USA)

IrfanView (Irfan Skiljan)

Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

Microsoft Word 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

Modfit LT[®] Programm (Verity Software House, Topsham, ME, USA)

Origin Pro[®] 8.5G (Microcal Software, Northampton, MA, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Glioblastom- und Lungenkarzinomzelllinie werden beide auf die gleiche Art und Weise kultiviert. Die zwei adhären Zellen wurden in Standardkulturflaschen bei 37°C und einem CO₂ Luftgehalt von 5% im Brutschrank gezüchtet. Bevor die Böden der Kulturflaschen zuwachsen konnten wurden die Zellen abgelöst und aufgeteilt („gesplittet“). Das Verhältnis des Splittens war im Falle der Linie SNB19 bis zu 1:5, bei A549 Zellen bis zu 1:10, jeweils abhängig von der Zelldichte und Proliferationszeit. Das Verfahren des Aufteilens beinhaltet nacheinander das Absaugen des Nährmediums, Waschen der Kulturflasche mit PBS und Ablösen der Zellen mittels Trypsin-EDTA. Nach kurzer Einwirkdauer des Enzyms wird die Enzymreaktion mit der Zugabe von Nährmedium abgestoppt und die dadurch erhaltene Zellsuspension kann auf mehrere Kulturflaschen verteilt werden.

Kultiviert wurden die Zellen im mit 10% FCS, 1% L-Glutamin (1 mmol/l), sowie jeweils 1% Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml), supplementierten Nährmedium DMEM mit 1000 mg Glucose/l.

3.2.2 Behandlung und Bestrahlung der Zellen

Es wurden zwei verschiedene Zeitpläne, Set-ups, angewendet.

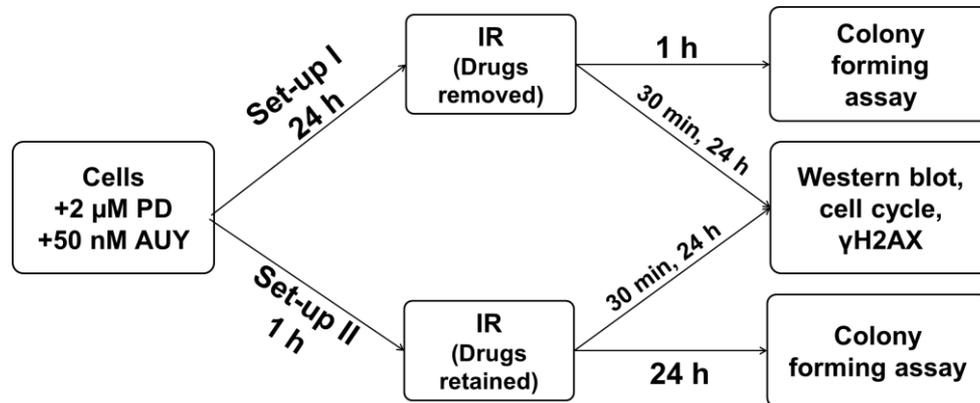


Abb. 3.1. Übersicht über den Ablauf der beiden Set-ups. „IR“ meint den Zeitpunkt der Bestrahlung („Ionizing Radiation“). In Set-up I wurden die Inhibitoren 24 h vor Bestrahlung zu den Zellen gegeben und unmittelbar vor Bestrahlung ausgewaschen. In Set-up II wurden die Inhibitoren 1 h vor Bestrahlung zu den Zellen gegeben und 24 h nach Bestrahlung ausgewaschen. Endpunkte waren Koloniebildungstest, Western Blot und Durchflusszytometrie mit Untersuchung des Zellzyklus und der aufgetretenen Zellschäden.

Für beide Set-ups gab es vier untersuchte Modalitäten: Behandlung mit DMSO (Kontrolle), PD184352 allein (im Folgenden kurz: „PD“), NYP-AUY922 allein (im Folgenden kurz: „AUY“) und PD+AUY kombiniert. Bei Set-up I wurden die Zellen 24 h vor Bestrahlung inkubiert und vor Bestrahlung per Mediumwechsel aller Substanzen entledigt. Die Aussaat der Zellen folgte direkt auf die Bestrahlung. Bei Set-up II wurde erst eine Stunde vor Bestrahlung inkubiert und die Substanzen blieben bis zur Aussaat, die 24 h nach der Bestrahlung vollzogen wurde, auf den Zellen. Verwendete Konzentrationen der Substanzen waren 2 µM PD, 50 nM AUY und die äquivalente Menge DMSO als Vehikel-Kontrolle. Die Bestrahlung erfolgte mit 6 MV-Photonen an dem Linearbeschleuniger Primus der Firma Siemens (Siemens, Erlangen). Die verwendete Strahlendosis betrug 0, 2, 3, 5, 7 oder 8 Gy.

3.2.3 Koloniebildungstest

Schäden in einer Zelle manifestieren sich nicht nur über DNA-Strangbrüche oder direkten Zelltod. Der Großteil der Schäden äußert sich in dem Verlust der Fähigkeit zur Zellteilung, der klonogenen Überlebensrate. Mit dieser Methode wird die klonogene Überlebensrate von Zellen unter Bestrahlung und

Behandlung mit Substanzen ermittelt. Die Anzahl der ausgesäten Zellen wurde der Bestrahlungsdosis und Aggressivität der zugegebenen Substanz angepasst.

Bestrahlungsdosis [Gy]	Behandelt mit DMSO	Behandelt mit PD	Behandelt mit AUY bzw. AUY + PD
0	250/500	250/500	500/500
2	500/1000	250/1000	1000/1000
3	500/2000	250/2000	1000/2000
5	1000/3000	500/3000	2000/3000
7	1000/5000	1000/5000	2000/5000
8	2000/5000	1000/5000	5000/5000

Tabelle 2 Darstellung der pro Petrischale ausgesäten Zellen für die Zelllinie A549 (linke Zahl) und SNB19 (rechte Zahl). Die Anzahl der ausgesäten Zellen wurde an die Dosis der Bestrahlung und zugegebene Substanzen angepasst. Die Zahlen sind wie folgt zu lesen: Für die Kontrollprobe (DMSO, 0 Gy) wurden für die Zelllinie A549 250 Zellen und für die Zelllinie SNB19 500 Zellen ausgesät (entspricht 250/500).

Ausgesät wurden pro Bedingung vier Petrischalen mit je 15 ml Medium, die im Anschluss für zwei Wochen in den Brutschrank postiert wurden. Nach diesen zwei Wochen erfolgte ein 20-minütiges Fixieren mit eiskalter Methanol-Essigsäurelösung und Anfärben der Kolonietests mit Kristallviolett. Nach Abwaschen und Trocknen konnten die Kolonien ausgezählt werden, wobei eine Kolonie als eng benachbarte Zellgruppe von mehr als 50 Zellen definiert wurde. Die für den Kolonietest typische Dosis-Überlebenskurve ergibt sich nach dem linearquadratischen Modell von Kellerer und Rossi^{52,53} aus an der Abszisse linear angetragener Bestrahlungsdosis und logarithmisch angetragener Überlebensfraktion der Zellen (SF) an der Ordinate.

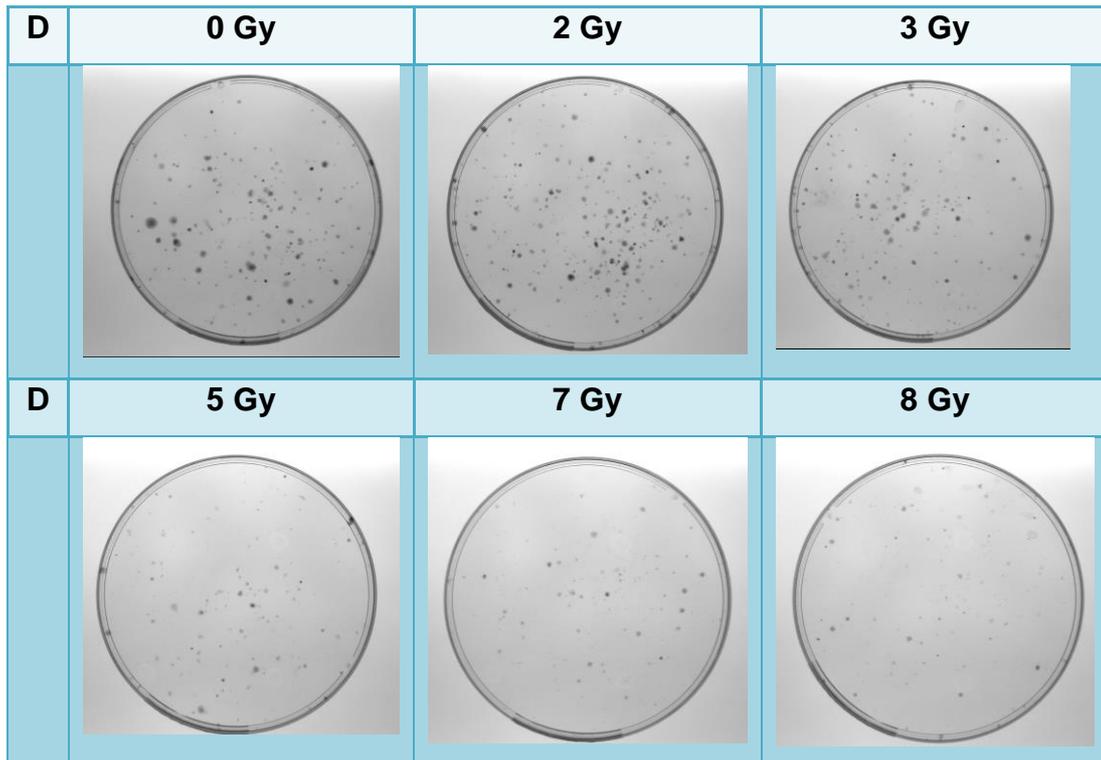


Tabelle 3 Exemplarisch für die Auswertung eines Kolonietests die Darstellung von sechs Petrischalen. Alle Proben sind aus der Zelllinie A549, behandelt mit DMSO und nach Set-up 1 unterschiedlich bestrahlt mit Dosen (D) von 0, 2, 3, 5, 7 oder 8 Gy. Im Folgenden werden Zellgruppen/Kolonien manuell ausgezählt.

Anhand der Dosis-Überlebenskurve kann die klonogene Überlebensrate bei 2 Gy (SF2), die Dosis, bei der die Zellen nur noch 10% ihrer Koloniebildungsfähigkeit besitzen (D_{10}), und die „Plating Efficiency“ (PE) ermittelt werden. Der SF-Wert (surviving fraction) beschreibt die Anzahl der Zellen, bei denen die klonogene Teilungsfähigkeit erhalten geblieben ist. Die surviving fraction ergibt sich, indem der Mittelwert aus den vier pro Bedingung angesetzten Petrischalen unter Berücksichtigung der Standardfehler auf die Kontrolle (DMSO, 0 Gy) normiert wird.

$$SF = \exp(-\alpha x - \beta x^2)$$

Formel 1: Linearquadratisches Modell. SF: Surviving Fraction/Überlebensfraktion, α : lineare gewebe-spezifische Konstante, β : quadratische gewebespezifische Konstante, x: Bestrahlungsdosis in Gray

$$PE = \frac{\text{Angewachsene Kolonien}}{\text{Ausgesäte Zellen}}$$

Formel 2: Errechnung der Plating Efficiency/Platier-effizienz. Die PE wird errechnet, indem der Quotienten aus angewachsenen Kolonien und ausgesäten Zellen gebildet wird.

Neben diesen Parametern gibt es weiterhin den Wachstums-Inhibierungsfaktor (IF₁₀).

$$IF_{10} = \frac{D_{10} \text{ Wert Kontrolle}}{D_{10} \text{ Wert Inhibitor}}$$

Formel 3: Errechnung des growth inhibition factor/Wachstumsinhibierungsfaktors. Der IF₁₀-Wert wird ermittelt, indem der Quotient aus der Dosis, bei der die Kontrolle nur noch 10% ihrer Koloniebildungsfähigkeit besitzt, und der Dosis, bei der die mit Inhibitor behandelten Zellen nur noch 10% ihrer Koloniebildungsfähigkeit besitzen, gebildet wird.

Der Verlauf der Dosis-Überlebenskurve gibt Aufschluss über das strahlungsbezogene Verhalten der Zelllinie. Sogenannte Schulterkurven stehen für eine Strahlenresistenz, ein linearer Verlauf ist charakteristisch für eine hohe Strahlensensibilität.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Origin 8.5 Pro.

3.2.4 Western Blotting

Dieses Verfahren diente dazu, Veränderungen in der Proteinexpression zu detektieren. Der erste Schritt beinhaltet das Anfertigen von Zelllysaten 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung. Dabei wurden die Zellen zunächst abgelöst und die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, 4°C). Das dadurch erhaltene Pellet wurde mit kaltem PBS gewaschen und dann seiner Größe nach für mindestens 30 Minuten in 30-50 µl des Protease- und Phosphatase-Inhibitoren enthaltenden RIPA Lysepuffers auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (12 min, 12000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in einen Eppendorf Behälter überführt und eingefroren (-20°C).

Im zweiten Schritt wurde die in den Proben enthaltene Proteinmenge bestimmt. Unter Verwendung des Dc Protein Assay Kit (Biorad, München) wurde die Absorption der Proben im Spectrophotometer (750 nm) gemessen. Mit den Absorptionswerten konnte anhand einer Eichgerade auf den Proteingehalt der Zelllysate geschlossen werden. Mit Hilfe dieser Daten war für die einzelnen Proben das Volumen bekannt, in dem sich die in diesem Fall verwendete Menge von 40 µg Protein befand. Die exakte Bestimmung dieses Volumens war im Folgenden wichtig für eine gleichmäßige Beladung der Gele. Nacheinander

wurden die Proben erst mit RIPA-Puffer auf 15 µl aufgefüllt, dann 5 µl Sample Buffer und 2 µl Sample Reducing Agent hinzugegeben, insgesamt ein Volumen von 22 µl ergebend. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung für 10 min bei 70°C im Wasserbad erhitzt. Die denaturierten Proben wurden auf SDS-Polyacrylamid- oder Trisacetatgele geladen und ihrem Molekulargewicht nach elektrophoretisch aufgetrennt: Tris-Acetat Gele unter einer Spannung von 150 V für 60 Minuten, Bis-Tris Gele unter einer Spannung von 200 V für 50 Minuten. Neben den Proben wurde auf die Gele ein „Größenmarker“ geladen, eine Substanz mit standardisiertem Molekulargewicht und damit bekanntem Auftrennungsmuster. Es fanden zwei unterschiedliche Typen von Gelen Anwendung. Zum einen 4-12% Bis-Tris-Gele für das beste Auftrennen im Bereich von 15-100 kDa und zum anderen 3-8% Tris-Acetat-Gele für vor allem größere Proteine über 100 kDa. Folgend wurden die Proteine per Elektrophorese (30 V, 2 Stunden) auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (Tank-Blot-System, Biorad) und auf dieser mit Ponceau S gefärbt. In Plastikfolie eingeschweißt wurde die Membran bis zum Blockieren vor der Detektion bei 4°C aufbewahrt.

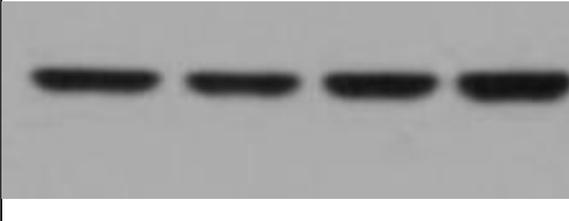
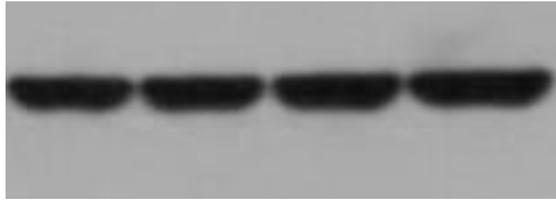
A549				SNB19			
DMSO	PD	AUY	PD+AUY	DMSO	PD	AUY	PD+AUY
							

Tabelle 4 Beladungsmuster der Gele. Jeweils am Rand und in der Mitte sind Marker aufgetragen, die hier bereits aus dem Bild geschnitten sind. Für einen leichten Vergleich des Verhaltens bei unterschiedlicher Behandlung sind die beiden Zelllinien direkt nebeneinander aufgetragen.

Vor dem eigentlichen Detektieren wurde die Membran zunächst für das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde in 4%ige Milchpulverlösung (siehe Kapitel 2.1.2.) gelegt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation des mit 4%iger BSA- oder 4%iger Milchpulverlösung verdünnten primären Antikörpers über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Membranen in drei Durchläufen á zehn Minuten mit PBS-Tween 20 gewaschen und dann für mindestens eine Stunde mit dem verdünnten sekundären Antikörper inkubiert. Der zweite Antikörper ist HRP-gekoppelt (Horseradish Peroxidase), womit er spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Nach einem weiteren Waschvorgang, drei mal zehn Minuten, wurden die zugeschnittenen Membranstreifen in der Dunkelkammer mit einer selbst angesetzten ECL-Lösung (Enhanced chemiluminescence) inkubiert. Die Lösung besteht aus 5 ml Luminol-Lösung, 0,5 ml Cumarinsäure und 5 µl H₂O₂ und wird für zwei Minuten auf der Membran belassen.

Detektiert wurde die Stärke der Lumineszenz als ein Zeichen der Intensität der Proteinexpression. Dafür wurde ein Röntgenfilm für eine Dauer von wenigen Sekunden bis 15 Minuten gemeinsam mit dem Membranstreifen in eine Kassette gelegt. Je stärker die Chemolumineszenz, desto stärker wird der Röntgenfilm geschwärzt.

Primärer Antikörper	Verdünnung	Atomare Masseneinheit	Verdünnungsmittel in PBS-Tween	Sekundärer Antikörper
HSP90	1:2000	90 kDa	4% Milchpulver	Anti mouse
HSP70	1:2000	70 kDa	4% Milchpulver	Anti mouse
PI3K p110α	1:1000	85 kDa	4% BSA	Anti rabbit
pAkt	1:1000	60 kDa	4% BSA	Anti mouse
pmTOR	1:1000	289 kDa	4% BSA	Anti rabbit
pS6	1:1000	37 kDa	4% Milchpulver	Anti rabbit
p4E-BP1	1:1000	15-20 kDa	4% Milchpulver	Anti rabbit

Tabelle 5 Informationen zu den primären Antikörpern. Neben der angewendeten Verdünnung sind unter weiteren Informationen das verwendete Verdünnungsmittel sowie der sekundäre Antikörper aufgeführt.

Primärer Antikörper	Verdünnung	Atomare Masseneinheit	Verdünnungsmittel in PBS-Tween	Sekundärer Antikörper
Raf-1	1:500	72 kDa	4% Milchpulver	Anti rabbit
pMEK1/2	1:500	45 kDa	4% BSA	Anti rabbit
pERK1/2	1:1000	42/44 kDa	4% Milchpulver	Anti rabbit
Rad51	1:1000	37 kDa	4% Milchpulver	Anti rabbit
Ku70	1:400	70 kDa	4% Milchpulver	Anti mouse
Ku80	1:1000	86 kDa	4% Milchpulver	Anti rabbit
β -Aktin	1:20000	42 kDa	4% Milchpulver	Anti mouse
p53	1:400	53 kDa	4% Milchpulver	Anti mouse
PTEN	1:1000	54 kDa	4% Milchpulver	Anti rabbit

Tabelle 5 Informationen zu den primären Antikörpern (fortgesetzt). Neben der angewendeten Verdünnung sind unter weiteren Informationen das verwendete Verdünnungsmittel sowie der sekundäre Antikörper aufgeführt.

In der Dunkelkammer direkt per Entwicklermaschine entwickelte Filme wurden im Anschluss eingescannt und mittels IrfanView und ImageJ ausgewertet. Als Haushaltsprotein für die Ladungskontrolle wurde β -Aktin herangezogen.

Die Western Blot Untersuchungen wurden freundlicherweise von Frau Astrid Katzer, MTA des Würzburger Strahlenlabors, unterstützt.

3.2.5 Durchflusszytometrie

FACS (fluorescence activated cell sorting) ermöglicht es, die Verteilung der Zellzyklusphasen und erlittene DNA-Schäden in den einzelnen Zellen zu untersuchen. Die Methode macht sich die von Zelle zu Zelle unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften bei Anregung durch Laserlicht zu Nutze.

Die Analyse der Zellzyklusphasen erfolgt indirekt über den DNA-Gehalt der Zellen nach Propidiumjodid (PI)-Einbau, die Messung der DNA-Schäden per γ H2AX-Expression.

Kongruent zu dem Erstellen von Zelllysaten wurden 500.000 Zellen ausgesät und 24 h danach inkubiert. Die Proben wurden dem jeweiligen Schema entsprechend mit den Substanzen behandelt und dann entweder 30 min oder 24 h nach Bestrahlung weiterverarbeitet. Bestrahlt wurde mit einer jeweiligen Dosis von 2 Gy und 8 Gy. Als Kontrolle dienten unbestrahlte Proben.

Insgesamt wurden damit 24 Proben erstellt:

Gy	DMSO	PD	AUY	PD+ AUY	DMSO	PD	AUY	PD+ AUY
0	30'	30'	30'	30'	24 h	24 h	24 h	24 h
2	30'	30'	30'	30'	24 h	24 h	24 h	24 h
8	30'	30'	30'	30'	24 h	24 h	24 h	24 h

Tabelle 6 Veranschaulichung der erstellten Proben. Die Bezeichnung „30“ steht für 30 Minuten nach Bestrahlung und „24 h“ für 24 Stunden nach Bestrahlung verarbeitete Proben.

Nachdem die Zellen die obige Behandlung erfahren hatten, wurden sie mit Trypsin/EDTA von den Kulturflaschen abgelöst. Durch Zentrifugation (10 min, 1200 rpm, 4°C) erhaltene Zellpellets wurden zweifach mit PBS gewaschen und anschließend mit 70%igem Ethanol (-20°C) fixiert.

Vor der eigentlichen FACS-Analyse durchliefen die Zellen zuerst einen „Färbeprozess“. Die in Ethanol fixierten Proben wurden abzentrifugiert (5 min, 1300 rpm, 4°C), zwei Mal mit je 5 ml PBS gewaschen, für 10 Minuten mit 0,5% Triton X-PBS resuspendiert und anschließend für eine Stunde mit FCS-PBS blockiert. Im Anschluss wurde der γ H2AX Antikörper verdünnt in 100 μ l BSA-PBS für zwei Stunden aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen mit 2% BSA-PBS wurden die Proben bei einer Verdünnung von 1:100 für 45 Minuten im Dunkeln mit Alexa Fluor 488 inkubiert. An einen weiteren Waschschrift anknüpfend wurden die Zellen schließlich mit dem „Mastermix“, bestehend aus Saponin, PBS, RNase und Propidiumjodid (PI), behandelt und direkt im Anschluss für eine

halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Messungen erfolgten in der Regel am darauffolgenden Tag; Mit Ethanol fixierte Proben konnten mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Für 400 µl Mastermix: 362,5 µl PBS

+25 µl Saponin (10% in PBS)

+10 µl Propidiumjodid (1 mg/ml) in PBS

+3,2 µl RNase (1 mg/ml) in PBS

Hintergrund für die Analyse auf γ H2AX, die phosphorylierte Form des H2A-Histon Bestandteils H2AX, ist, dass H2AX beim Vorliegen von Doppelstrangbrüchen phosphoryliert wird (s. Kapitel 2.4.2).

PI wird für die Analyse des Zellzyklus herangezogen, da es in die DNA interkalieren kann, also proportional zu der DNA-Menge fluoresziert. Weil in den Zellen während der verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedliche Mengen an DNA enthalten sind, können die Phasen unterschieden werden. Aufgrund dessen, dass PI allerdings auch in RNA interkaliert, wird zusätzlich RNase beigefügt, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern.

Als Analysewerkzeug diente das Gerät FACS Canto™ II und die zugehörige Software FACSDiva (V. 8.0.1). Zu jeder Bedingung wurden jeweils 20.000 Zellen analysiert und die Ergebnisse folgend mit den Programmen Excel, Flowing Software 2, Origin 8.5 und ModFit ausgewertet. Für die Darstellung des Zellzyklus wird der PI/DNA-Gehalt linear gegen die Häufigkeit der Ereignisse („Events“) angetragen. Für die Darstellung der DNA-Schäden wird der γ H2AX-Wert logarithmisch gegen die Events angetragen.

4. Ergebnisse

4.1 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung bei Set-up I

4.1.1 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an klonogenen Überlebenskurven

Bei diesem Versuch wird die klonogene Überlebensrate der wie in Kapitel 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben behandelten Zellen untersucht. Abbildung 4.1. zeigt jeweils einen für das Verhalten des Zellüberlebens für A549- und SNB19-Zellen repräsentativen Versuch.

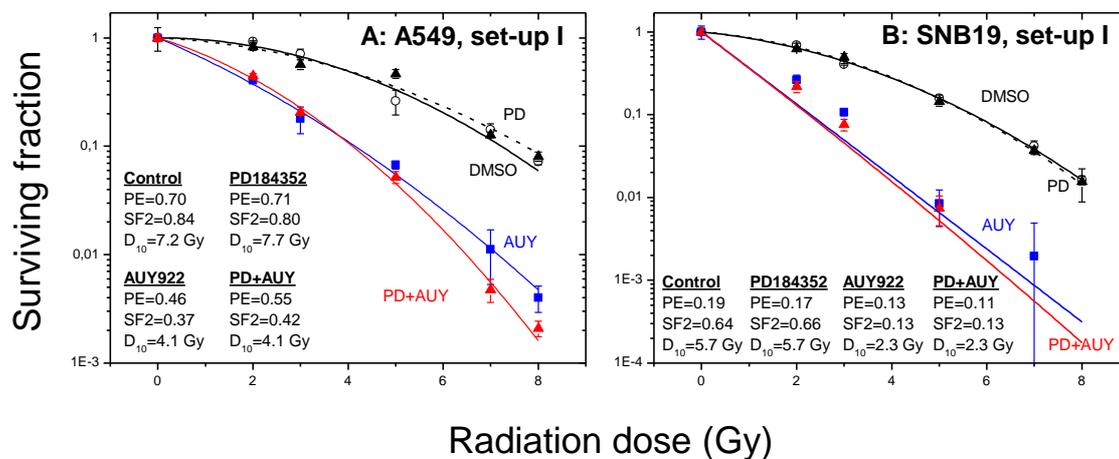


Abb. 4.1. Klonogene Überlebenskurven nach Set-up I. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Versuch mit Mittelwerten und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen pro Zelllinie. Die linke Grafik ist ein Versuch mit der Zelllinie A549 und die rechte Grafik ein Versuch mit der Zelllinie SNB19. Die Zellen wurden entsprechend Set-up I 24 h lang vor Bestrahlung mit den Inhibitoren behandelt. Die Daten wurden nach dem linearquadratischen Modell angefitet. DMSO-Behandlung dient als Vehikel-Kontrolle. SD ist durch Balken gekennzeichnet.

Im Allgemeinen (die Werte sind der folgenden Tabelle 7 zu entnehmen) wies die Zelllinie A549 (Kontroll-PE: 0,7) eine deutlich höhere PE als SNB19 Zellen (Kontroll-PE: 0,2) auf. Alleinige Behandlung mit PD nach Set-up I zeigte in beiden Zelllinien keinerlei Effekt. Die PE, SF2, D₁₀ und IF₁₀-Werte (s. Tabelle 7) entsprachen nach PD-Behandlung unverändert denen der Kontrollgruppe. Zugabe von AUY zeigte hingegen eine sehr deutliche strahlensensibilisierende Wirkung in beiden Zelllinien. Bei sowohl A549 als auch SNB19 sanken PE, SF2 und D₁₀-Werte stark ab. Gleichzeitig stieg durch AUY der IF₁₀-Wert bei Lungenkarzinom und Glioblastom stark an (s. Tabelle 7). Zudem sank bei beiden Zelllinien der SF2-Wert enorm (s. Tabelle 7: SF2 von 0,7 auf 0,3). Die Kombination von AUY mit PD zeigte in keiner der beiden Überlebenskurven,

verglichen mit alleiniger AUY-Behandlung, einen sichtbaren Effekt (s. Abb. 4.1.). Alle Werte waren weitgehend identisch (s. Tabelle 7).

Zelllinie	Behandlung	Plating efficiency	SF2	D10 [Gy]	IF ₁₀
A549	DMSO	0,73±0,03	0,72±0,06	6,5±0,40	1,00
	PD	0,66±0,04	0,70±0,05	6,73±0,53	0,97±0,02
	AUY	0,42±0,04*	0,34±0,06*	3,76±0,29*	1,77±0,20*
	PD+AUY	0,42±0,05*	0,35±0,04*	3,76±0,18*	1,75±0,15*
SNB 19	DMSO	0,20±0,02	0,66±0,02	6,65±0,5	1,00
	PD	0,18±0,03	0,71±0,03	5,9±0,15	1,12±0,06
	AUY	0,13±0,03*	0,31±0,06*	3,28±0,43*	2,08±0,14*
	PD+AUY	0,11±0,03*	0,29±0,05*	3,20±0,35*	2,12±0,15*

Tabelle 7 Mittelwerte (± SE) aus vier unabhängigen Koloniebildungstests, Zellen wurden entsprechend Set-up I 24 h lang vor Bestrahlung mit den Inhibitoren behandelt. SF2: Zellüberleben nach 2 Gy; D₁₀: Strahlendosis, um die klonogene Überlebensrate auf 10% zu reduzieren, IF₁₀: Wachstumsinhibitionsfaktor, PD: PD184352, AUY: NVP-AUY922. Bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe (n=4) konnten durch die diversen Behandlungsmodalitäten signifikante Änderungen (Signifikanzniveau von 5% bzw. p < 0,05) der Parameter des Zellüberlebens nachgewiesen werden, diese sind per Stern gekennzeichnet (*).

4.1.2 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Signalwegen

Die Untersuchung der Expressionen soll Hinweise darauf liefern, ob eine Strahlensensibilisierung beobachtet werden kann und wie diese zu erklären ist. Es wurden die Effekte von beiden Inhibitoren und Bestrahlung auf HSP90/70, PI3K- und MAPK-Wege untersucht.

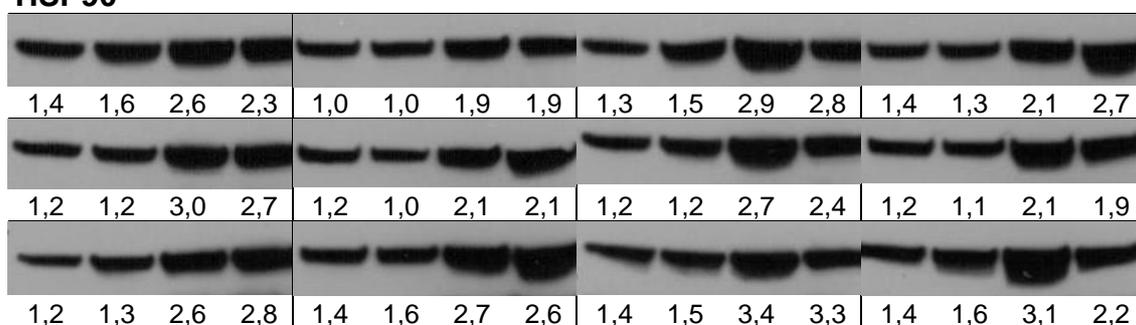
Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an HSP90/70

Hitzeschockproteine sind am Auf- und Abbau von Proteinen beteiligt, die essenziell für beispielsweise Zellzyklus und Zellüberleben sind. Sie sind befähigt, Zellen vor der Apoptose zu schützen²⁹.

Set-up I (24 h vor IR)

A) 30 min post-IR				B) 24 h post-IR			
A549		SNB19		A549		SNB19	
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922

HSP90



HSP70

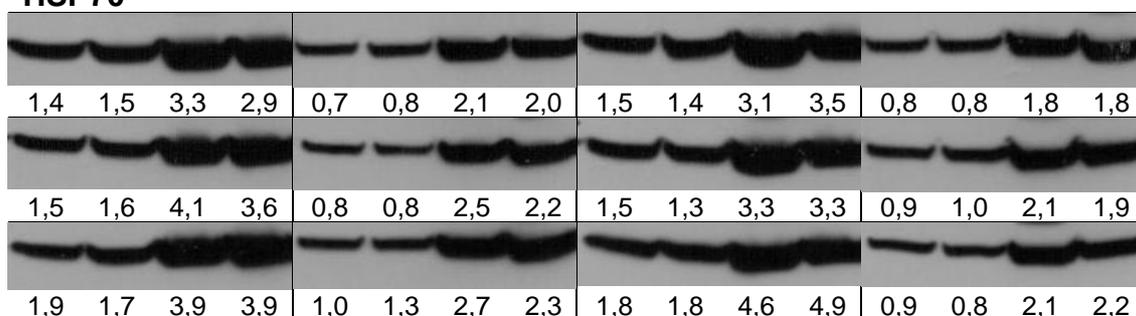


Tabelle 8 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von HSP90/70 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Die Behandlung mit dem MEK-Inhibitor führte sowohl 30 Minuten als auch 24 h nach Bestrahlung zu keiner Veränderung des HSP90 Levels. Nach Zugabe des HSP-Inhibitors hingegen kam es zu beiden Zeitpunkten und in beiden Zelllinien zu einer Hochregulation des HSP90. Dieselbe Tendenz zeigten die Zellen unter Anwendung der beiden Inhibitoren kombiniert.

Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an der PI3K/pAkt-Signalkaskade

PI3K p110 α

Die PI3-Kinase ist ein Übermittler von Signalen und sorgt für die Phosphorylierung des PIP₂ zu PIP₃³⁸.

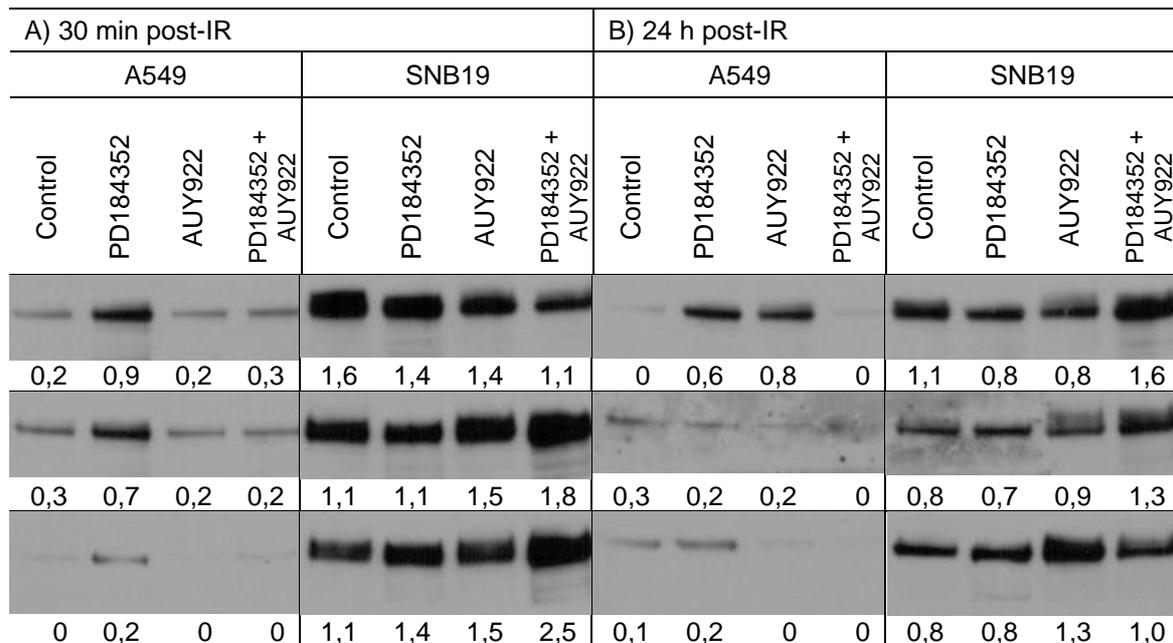


Tabelle 9 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von PI3K p110 α in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Die Expression der Kinase PI3K fiel bei SNB19 stärker aus als bei A549-Zellen. In den 30 Minuten nach Bestrahlung gewonnenen Proben der A549 Zellen schien es durch PD allein zu einer Erhöhung der Expression (s. 0 und 2 Gy) zu kommen. Nach 24 Stunden zeigte sich durch PD oder AUY in der unbestrahlten A549-Probe eine erhöhte Expression. In anderen Versuchen trat diese Hochregulation auch in 2 und 8 Gy-Proben ein. 24 Stunden nach Bestrahlung wiesen mit AUY und PD+AUY behandelte SNB19-Zellen eine höhere Expression des Proteins auf während PD allein eine diskrete Verminderung auslöste

pAkt

Das Protein Akt, auch genannt Protein Kinase B, ist ein Schlüsselmediator des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges und wird durch PIP₃ phosphoryliert/aktiviert. Es gewährleistet für die Zelle grundlegende Eigenschaften wie Proliferation, Migration und Zellüberleben³⁸.

A) 30 min post-IR					B) 24 h post-IR										
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0	0	0	0	0,8	1,0	0,2	0,2	0	0	0	0	1,1	1,6	1,4	1,4
0	0	0	0	1,4	1,7	0,5	0,4	0	0	0	0	1,0	1,4	0,5	0,6
0	0	0	0	1,2	1,3	0,2	0,3	0	0	0	0	0,8	1,3	0,9	0,4

Tabelle 10 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pAkt in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Das Signalprotein pAkt war in A549-Zellen nicht detektierbar. In SNB19-Zellen führte die Behandlung mit PD, zu beiden Zeitpunkten sichtbar, zu einer Erhöhung der Expression dieses Proteins. Unter alleiniger Zugabe des HSP90-Inhibitors kam es 30 Minuten nach Bestrahlung zu einer starken Verminderung der Expression des pAkt. Dieser Effekt wurde durch zusätzliche Gabe von PD nicht beeinflusst. 24 Stunden nach Bestrahlung lag hingegen in den unbestrahlten und mit 8 Gy bestrahlten Proben eine durch AUY bedingte geringe Erhöhung der Expression vor.

pmTOR

Das Protein mTOR kommt in den zwei verschiedenen Komplexen, mTORC1 und mTORC2 vor. Während mTORC1 durch Akt aktiviert wird und wiederum P70S6K phosphoryliert, wird mTORC2 von P70S6K gehemmt und phosphoryliert Akt⁵⁴.

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0,3	0,3	0,1	0,3	1,7	1,5	1,6	1,6	0,5	0,5	1,2	1,3	2,0	1,8	1,8	1,7
0,7	0,4	0,9	0,6	1,9	1,4	1,4	2,5	0,7	0,6	0,9	1,4	2,8	2,6	3,2	3,1
0,4	0,4	0,8	0,5	2,2	2,2	2,2	3,2	0,6	0,4	1,0	1,2	2,0	2,0	2,5	2,3

Tabelle 11 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pmTOR in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Ähnlich wie bei der PI3K- war die pmTOR-Expression in der *PTEN*-mutierten Zelllinie SNB19 deutlich ausgeprägter als in der Zelllinie A549. In den mit 2 Gy und 8 Gy bestrahlten Proben erschienen AUY- und PD+AUY-behandelte Zellen beider Entitäten mit erhöhter Expression des pmTOR.

Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Proteinen der Translation

pS6

Der HSP90-Klient S6 gilt als ein wichtiger Marker der Proliferation. Das Protein wird durch die P70S6K phosphoryliert⁵⁴.

A) 30 min post-IR				B) 24 h post-IR			
A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0,7	0,7	0	0	1,5	1,3	1,1	0,9
0,9	0,7	0	0	1,9	1,3	1,1	1,2
0,8	0,7	0	0	1,6	1,4	1,1	1,2
0,4	0,3	0	0	1,3	1,2	1,5	1,2

Tabelle 12 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pS6 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

In beiden Zelllinien zeigte der Inhibitor PD keine wesentliche Wirkung, lediglich eine geringe Minderung der Expressionen. Die A549-Zellen erwiesen sich als sensibler, sodass 30 Minuten nach Bestrahlung bei Behandlung mit AUY sowie PD+AUY eine Depletion des pS6-Proteins eintrat. Nach 24 h schienen sich in der Zelllinie A549 nur die unbestrahlten Zellen etwas von dieser Depletion erholt zu haben. Die Zelllinie SNB19 schien weniger beeinflussbar. Inhibition mit PD bedingte durchgehend eine leicht verringerte Expression und auch die Behandlung mit AUY oder PD+AUY zeigte sich 30 Minuten nach Bestrahlung nur eine moderate Abschwächung der pS6-Expression. Bereits nach 24 Stunden war die Expression wieder erhöht, leicht über den Kontrollwert hinaus.

p4E-BP1

Das den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E) bindende Protein 1 (4E-BP1) ist ein Substrat von mTOR. Phosphorylierung des Proteins führt zur Dissoziation von eIF4E, sodass die Translation fortschreiten kann⁵⁵.

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
1,4	1,1	1,0	1,0	0,7	0,5	0,6	0,3	1,5	1,0	1,3	0,8	0,8	0,3	0,6	0,5
1,6	1,3	1,4	1,1	0,9	0,5	0,8	0,5	1,7	0,5	0,8	0,8	0,5	0,2	0,6	0,7
1,6	1,0	1,1	1,1	0,7	0,5	0,9	0,9	1,8	1,6	1,7	1,5	1,3	1,0	1,5	1,5

Tabelle 13 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von p4E-BP1 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Die Expression von p4E-BP1 zeigte in beiden Zelllinien und zu beiden Zeitpunkten nach Bestrahlung sowohl durch PD als auch durch AUY eine Veränderung. Trotz der Auswaschung des MEK-Inhibitors bleibt die Expression des Proteins 24 h nach Bestrahlung reduziert. Dagegen war zu diesem Zeitpunkt die Expression des Proteins nach AUY-Behandlung beinahe normalisiert. Bei Kombination der Substanzen zeigten die behandelten Proben keinen zusätzlichen Effekt.

Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an der MAPK-Signalkaskade

Raf-1

Das Protoonkogen RAS ist Bestandteil des, für das Zellüberleben wichtigen, MAPK-Signalwegs und zuständig für die Phosphorylierung der Kinase Raf-1. Diese wiederum aktiviert durch Phosphorylierung MEK1 und MEK2⁴¹.

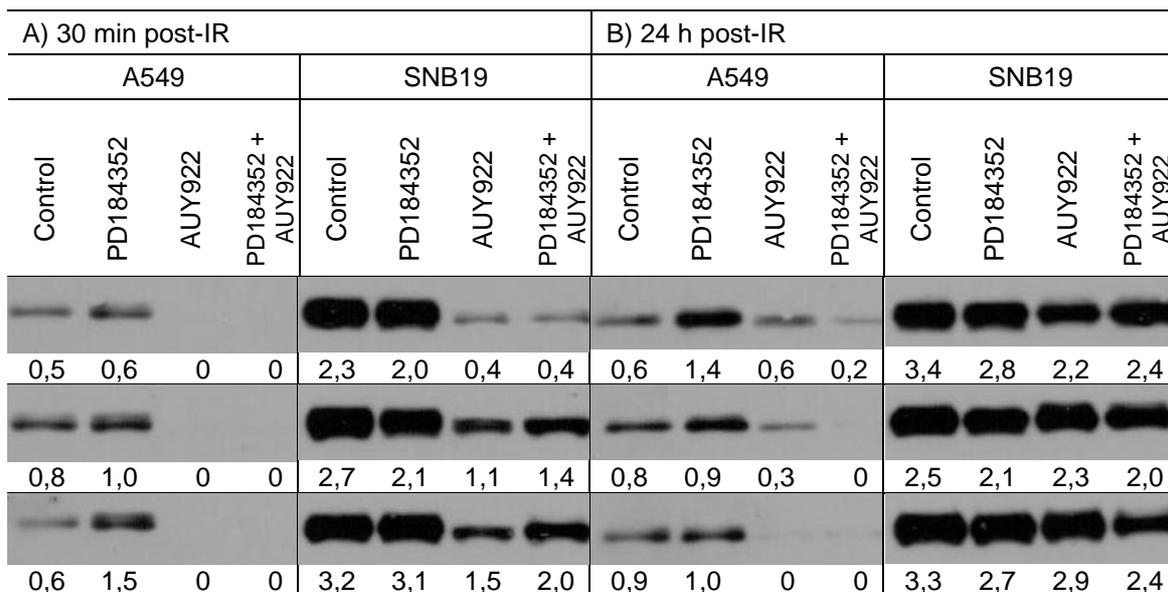


Tabelle 14 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Raf-1 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Raf-1 war in der Zelllinie SNB19 generell stärker exprimiert als in A549-Zellen. PD-Inhibition erhöhte in A549 die Expression des Raf-1, wohingegen bei gleicher Behandlung in SNB19 die Expression abfiel. Als HSP90-Klient fiel Raf-1 unter HSP90- und Kombinationsbehandlung voll (A549) bzw. stark (SNB19) aus. 30 Minuten nach Bestrahlung lag der Effekt deutlich ausgeprägter vor, während sich 24 Stunden nach Bestrahlung und Auswaschen der Inhibitoren schon ein deutlicher Rückgang des Ausfalls zeigte. Nach einer Bestrahlungsdosis von 2 und 8 Gy und Inhibition mit AUY oder PD+AUY zeigte sich die Raf-1 Expression in der Zelllinie A549 nach 24 Stunden deutlich eingeschränkt.

pMEK1/2

Die Kinasen MEK 1/2 sind der auf die Raf-Kinasen folgende Bestandteil des MAPK-Signalwegs und phosphorylieren das Protein ERK⁴¹.

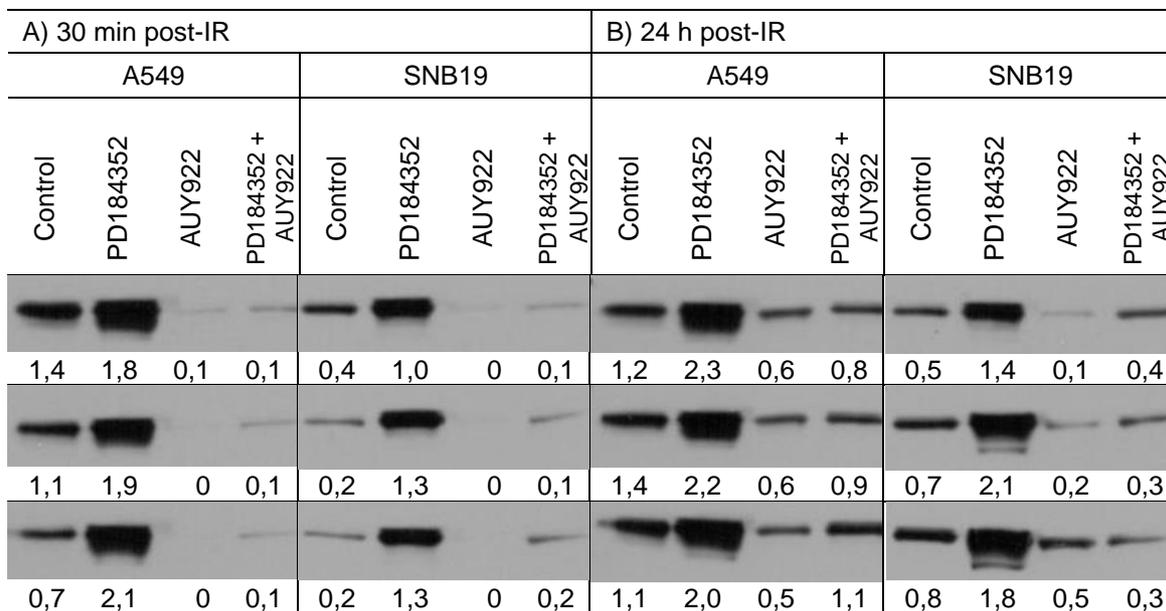


Tabelle 15 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pMEK1/2 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Beim Vergleich der Hintergrundexpressionen von MEK1/2 in beiden Zelllinien zeigt sich, dass die Zelllinie A549 eine grundlegend höhere Expression von pMEK1/2 aufweist. Bei Betrachtung von pMEK1/2 führte der Inhibitor PD zu einer starken Induktion des Proteins bei jeder Zelllinie und Bestrahlungsdosis. Als HSP90-Klient war von pMEK1/2, wie z.B. bei Raf-1 ähnlich, ein starker Abfall bei Zugabe von AUY oder PD+AUY zu erkennen. Nach 24 Stunden zeigten sich zu den 30-Minuten-Proben sehr ähnliche Muster, die Expressionen etwas stärker.

pERK1/2

Die Kinasen ERK1/2 werden im MAPK-Signalweg durch pMEK1/2 phosphoryliert. Sie haben Einfluss auf Translation, Proliferation, Zellzyklus und Migration der Zellen⁴³.

A) 30 min post-IR					B) 24 h post-IR										
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0,5	0,8	0,1	0	1,0	1,2	0,3	0,1	1,0	1,1	0,6	0,3	0,8	0,8	0,4	0,2
0,8	1,0	0,1	0	1,1	1,3	0,4	0,1	1,0	1,2	0,5	0,2	0,8	0,6	0,5	0,2
0,9	1,0	0,1	0	1,1	1,3	0,4	0	1,1	0,9	0,4	0,4	1,0	0,9	0,4	0,2

Tabelle 16 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pERK1/2 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Die Zelllinie SNB19 wies bei Betrachtung der pERK1/2-Expression eine deutlich höhere Hintergrundexpression als die Zelllinie A549 auf. Unter Set-up I führte PD allein in allen Proben nach 30 Minuten zu einer Hochregulation der pERK1/2 Expression. Bei Inhibition mit AUY und kombinierter Behandlung fiel 30 Minuten nach Bestrahlung die Expression in beiden Zelllinien deutlich ab. In der Zelllinie SNB19 blieb bei AUY-Inhibition allein die untere von zwei Banden, damit ein großer Teil der Expression, zurück. 24 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich keine deutliche Hochregulation durch PD allein. Die Herabregulation durch AUY und die kombinierte Behandlung fiel 24 Stunden nach Bestrahlung deutlich geringer aus.

Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Proteinen der DNA-Reparaturprozesse und Apoptose

Rad51

Bezüglich des Reparaturmechanismus der Homologen Rekombination (HR) wurde das Protein Rad51 untersucht²⁴.

A) 30 min post-IR				B) 24 h post-IR			
A549		SNB19		A549		SNB19	
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0,9	0,9	0	0	0,8	0,7	0	0
1,3	1,3	0,0	0,0	1,0	0,6	0,1	0,2
0,8	1,1	0	0	0,8	0,8	0,2	0,3
1,2	1,1	0,9	0,4	1,0	0,7	0,2	0,1
0,7	0,6	0,8	0,9	0,8	0,7	0,8	0,7
0,4	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	0	0

Tabelle 17 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Rad51 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

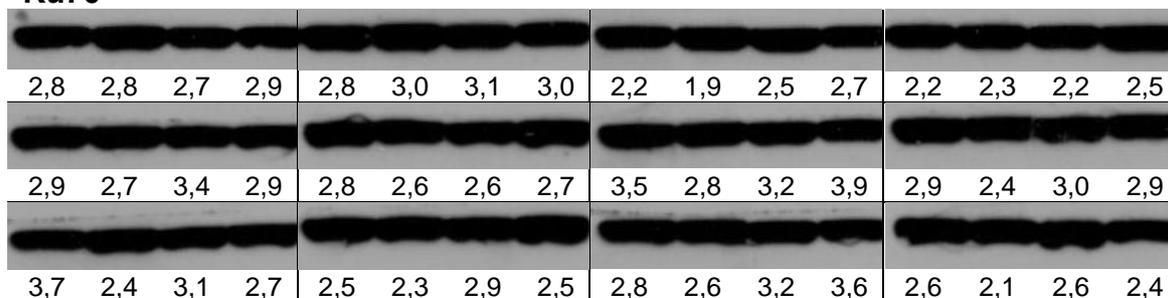
Auf die Expression von Rad51 hatte PD keinen Effekt. Unter Zugabe von AUY oder PD+AUY zeigte sich in den 30 Minuten nach Bestrahlung erstellten Proben ein kompletter Ausfall des Proteins in den A549-Zellen. Unter den gleichen Bedingungen entstand ein fast kompletter Ausfall des Rad51 in SNB19-Zellen, mit der Ausnahme leichter Rückstände in den 2 Gy und 8 Gy Proben. Nach 24 Stunden lag je nach Strahlendosis und Zelllinie schon wieder ein Rückgang der Wirkung von AUY und PD+AUY vor. In A549-Zellen war dieser Rückgang in unbestrahlten Proben und in mit 2 Gy bestrahlten Proben zu beobachten. In AUY-Proben fiel der Rückgang der Inhibition größer aus (AUY: 0,9, PD+AUY: 0,4). In SNB19-Zellen waren nach 24 Stunden die Banden aller Proben identisch zur

Kontrolle (Expression der Probe SNB19, 24 Stunden, 8 Gy, PD+AUY ist erniedrigt, so jedoch nicht konsistent detektierbar).

Die beiden Proteine Ku70 und Ku80 sind Bestandteile des NHEJ („non-homologous end joining“)²⁴.

A) 30 min post-IR				B) 24 h post-IR			
A549		SNB19		A549		SNB19	
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922

Ku70



Ku80

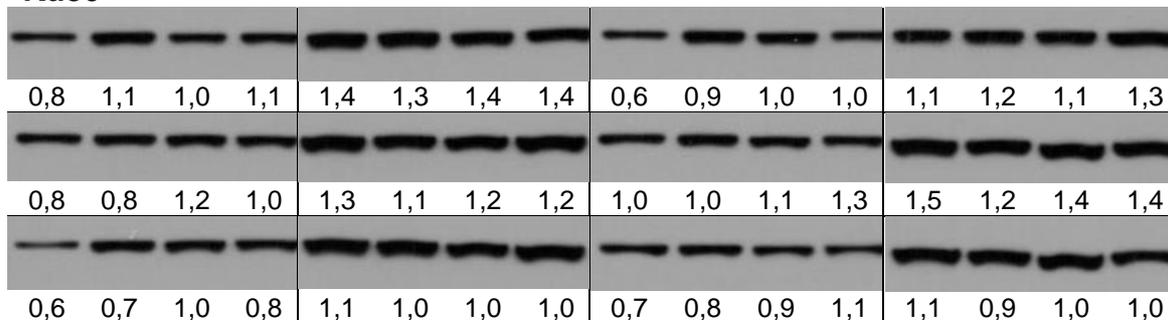


Tabelle 18 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Ku70 und Ku80 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up I 24 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

In den Expressionsmustern der Proteine Ku70 und Ku80 entstanden keine Effekte durch diverse Behandlungs- und Bestrahlungsmodalitäten.

4.1.3 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Induktion und Reparatur der DNA-Schäden

Aus den folgenden Graphen (Abb. 4.2. und 4.3.) kann die γ H2AX-Verteilung der untersuchten Zellen entnommen werden. Mit den gestrichelten Linien durch den γ H2AX-Modalwert der 8 Gy-Kontrollprobe (behandelt mit DMSO, fixiert 30 Minuten nach IR) kann leicht ein Vergleich im Reparaturverhalten der verschieden behandelten Proben angestellt werden. Typischerweise kommt es im zeitlichen Vergleich 24 Stunden nach Bestrahlung zu einer Linksverschiebung der Kurven, da sich die DNA-Schäden in der Zwischenzeit reparieren können. Angetragene Werte an den Kurven sind jeweils geometrische Mittelwerte (Geomeans) der Kurve.

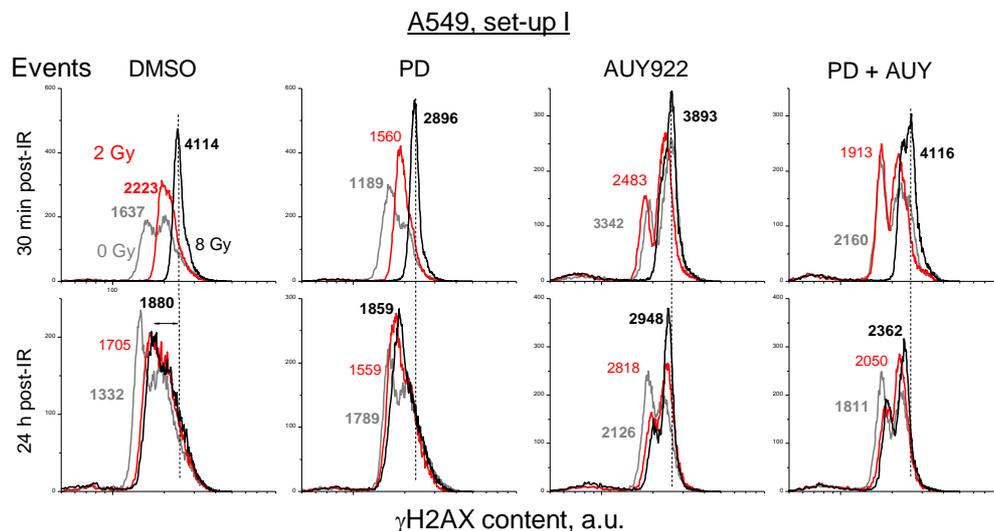


Abb. 4.2. γ H2AX-Verteilung der mit DMSO und Inhibitor behandelten A549 Proben eines repräsentativen Versuchs unter Set-up I. Fixierungen der Proben erfolgten 30 Minuten und 24 Stunden nach Bestrahlung. Die vertikale gestrichelte Linie verläuft durch den Modalwert der 8 Gy-Kontrollprobe, die nach 30 Minuten fixiert wurde. Angetragene Werte an den Kurven sind Geomeans. Die hellgrauen Kurven repräsentieren die unbestrahlten Proben, rote Kurven die mit 2 Gy bestrahlten Proben und schwarze Kurven die mit 8 Gy bestrahlten Proben.

Im Set-up I kam es bei den Lungenkarzinom-Zellen (Abb. 4.2.) unter Zugabe von PD, bezogen auf die Kontrolle, zu einer geringeren Anzahl von DSB und basierend auf den 24-Stunden-Werten zeigt sich eine geringe Verzögerung bzw. Einschränkung der Reparatur (relativer Anteil der nicht reparierten DNA-Schäden steigt von 0,4 auf 0,5, siehe Abb. 4.5.). Unter AUY zeichnete sich verglichen mit der DMSO Kontrolle eine Zunahme von Schäden bei 0 Gy und 2 Gy, aber eine Senkung bei 8 Gy ab. Mit einem Anteil von ca. 60% (siehe Abb. 4.5.) war das

Ausmaß der nicht reparierten DNA-Schäden verglichen mit den anderen Modalitäten am höchsten und auch das Reparaturverhalten zeigte sich am stärksten beeinträchtigt (siehe Abb. 4.2.). Die Kombination aus beiden Inhibitoren ging verglichen mit den AUY-Werten mit weniger Schäden bei 0 Gy und 2 Gy einher, während die Defekte bei 8 Gy auf DMSO-Niveau waren. Anhand der 24-Stunden-Werte zeigte sich eine Verzögerung der Reparatur, wobei eine geringere Anzahl von Schäden verblieben war und die Verlangsamung der Reparatur weniger stark ausfiel.

Bei den SNB19-Zellen mit MEK-Inhibition sanken die Werte geringfügig (s. Abb. 4.3.) und der Anteil von nicht reparierten Schäden stieg von 0,3 aus der Kontrolle auf 0,5 (s. Abb. 4.5.). Die erfasste Anzahl an Schäden stieg bei AUY-Behandlung sehr stark an, bei 0 Gy um den Faktor 2,6, bei 2 Gy um den Faktor 2,3 und bei 8 Gy um den Faktor 1,5 (bezogen auf DMSO-Werte aus Abb. 4.3.). Mit einem Beheben von lediglich knapp 20% der Schäden war die Reparatur stark eingeschränkt. Die Untersuchung der mit beiden Inhibitoren versehenen und bestrahlten Proben zeigte ebenfalls eine schlechte Reparatur in den Zellen, jedoch war das Ausmaß der Schäden (s. Abb. 4.3.) sowie die Zahl der nicht reparierten Schäden (s. Abb. 4.5.) geringer. Die Schäden waren verglichen mit den Kontrollwerten jeweils um den Faktor 2,45 bei 0 Gy, 2,1 bei 2 Gy und 1,35 bei 8 Gy erhöht.

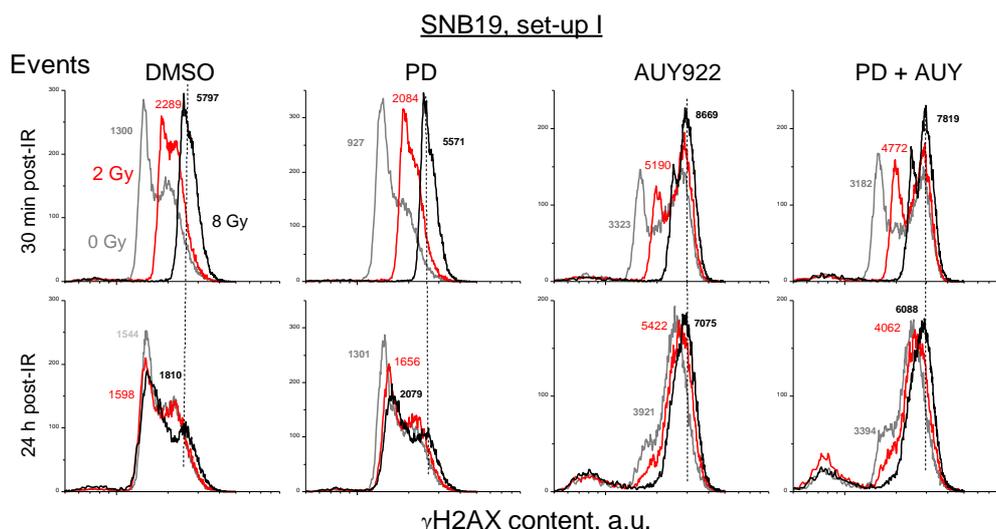


Abb. 4.3. γH2AX-Verteilung der mit DMSO und Inhibitor behandelten SNB19-Proben eines repräsentativen Versuchs unter Set-up I. Fixierungen der Proben erfolgten 30 Minuten und 24 Stunden nach Bestrahlung. Die vertikale gestrichelte Linie verläuft durch den Modalwert der 8 Gy-Kontrollprobe, die nach 30 Minuten fixiert wurde. Angetragene Werte an den Kurven sind Geomeans. Die hellgrauen Kurven repräsentieren die unbestrahlten Proben, rote Kurven die mit 2 Gy bestrahlten Proben und schwarze Kurven die mit 8 Gy bestrahlten Proben.

Aus den folgenden Darstellungen (Abb. 4.4., linke Spalte) geht hervor, dass die Lungenkarzinom- und Glioblastomzellen sich in Versuchen nach Set-up I tendenziell gleich verhielten, jedoch im Gesichtspunkt der Quantität unterschieden. Die DNA-Schadenswerte unter Behandlung mit AUY waren am höchsten, absteigend folgten darauf die Kombination, die Kontrollbehandlung und schließlich die MEK-Inhibition. Anhand der Gegenüberstellung der Anteile von nicht reparierten DNA-Schäden (Abb. 4.5.) sieht man anhand der Steigung der gestrichelten Geraden, die interpoliert durch die gemittelten Punkte verläuft, dass die Zelllinien eine grundverschiedene Befähigung zur Schadensreparatur aufwiesen.

Abbildung 4.4. enthält die normierte Darstellung der γ H2AX-Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Versuchen. Normiert wurde jeweils auf die unbestrahlte, nach 30 Minuten fixierte DMSO-Probe (sie wurde auf den Wert 1

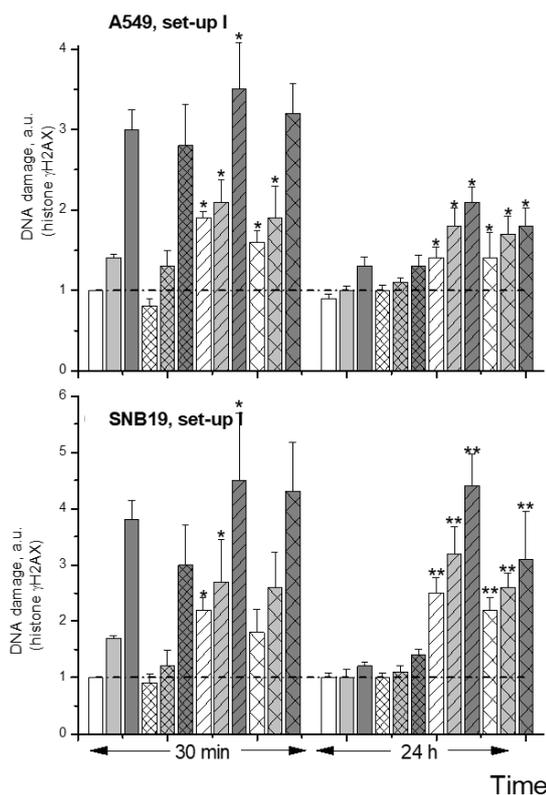


Abb. 4.4. Normierte Darstellung der γ H2AX-Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Versuchen unter Set-up I. Einbezogen sind Daten aus beiden Zelllinien unter Set-up I. Genormt wurde jeweils auf die unbestrahlte, nach 30 Minuten fixierte DMSO-Probe und dieser Wert gleich 1 gesetzt. Für einen erleichterten Vergleich verläuft eine gestrichelte Linie durch den Norm-Schadenswert der unbestrahlten und unbehandelten Kontrollprobe. Die Säulen zeigen den jeweiligen Mittelwert aller Versuche, die Balken die Standardabweichung. Bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe (n=3) konnten durch die diversen Behandlungsmodalitäten signifikante Änderungen der γ H2AX-Mittelwerte nachgewiesen werden (*: Signifikanzniveau von 5% bzw. $p < 0,05$, **: Signifikanzniveau von 1% bzw. $p < 0,01$).

gesetzt). Für einen erleichterten Vergleich verläuft eine gestrichelte Linie durch den Norm-Schadenswert der unbestrahlten und unbehandelten Kontrollprobe. Eine andere Möglichkeit zur Darstellung des Reparaturverhaltens ist in Abb. 4.5. abgebildet. Dort dargestellt ist die relative Menge nicht reparierter DNA-Schäden bei einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy.

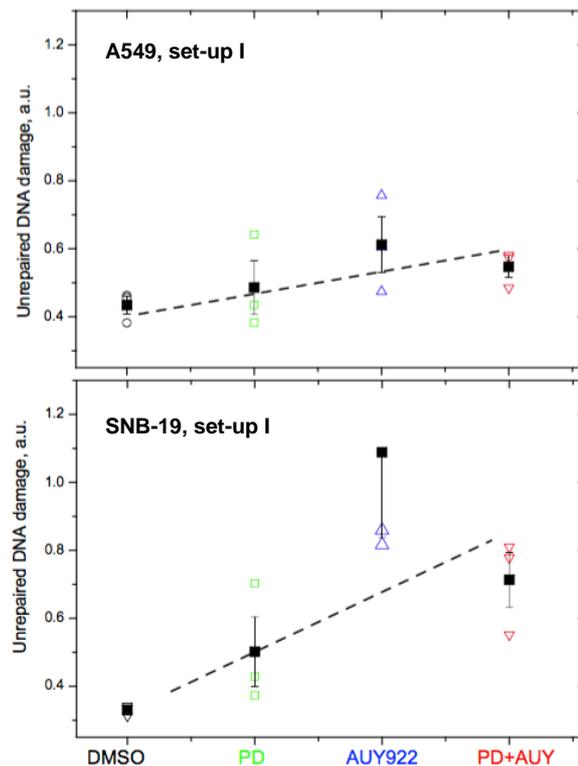


Abb. 4.5. Verbildlichung der relativen Menge nicht reparierter DNA-Schäden unter Set-up I. Die Werte sind zusammengesetzt aus je drei unabhängigen Versuchen des jeweiligen Set-ups.

$$\text{Nicht reparierter Schaden der DNA} = \frac{\text{Geomean } 8 \text{ Gy}, 24\text{h}}{\text{Geomean } 8 \text{ Gy}, 30\text{h}}$$

Je größer die Steigung einer angetragenen Geraden in dieser Abbildung (Abb. 4.5.), desto größer die Beeinträchtigung der Reparaturmechanismen und desto größer die Anzahl verbliebenen DNA-Schäden nach 24 Stunden.

4.1.4 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf Zellzyklusverteilungen

Wie in 3.2.5 erläutert, wird in der Durchflusszytometrie neben den DNA-Schäden auch die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen untersucht. In diesem Set-up I wurden die Zellen 24 Stunden vor Bestrahlung mit den Substanzen

behandelt, diese jedoch 30 Minuten vor Bestrahlung wieder entfernt. Fixiert wurden Proben 30 Minuten und 24 Stunden nach Bestrahlung.

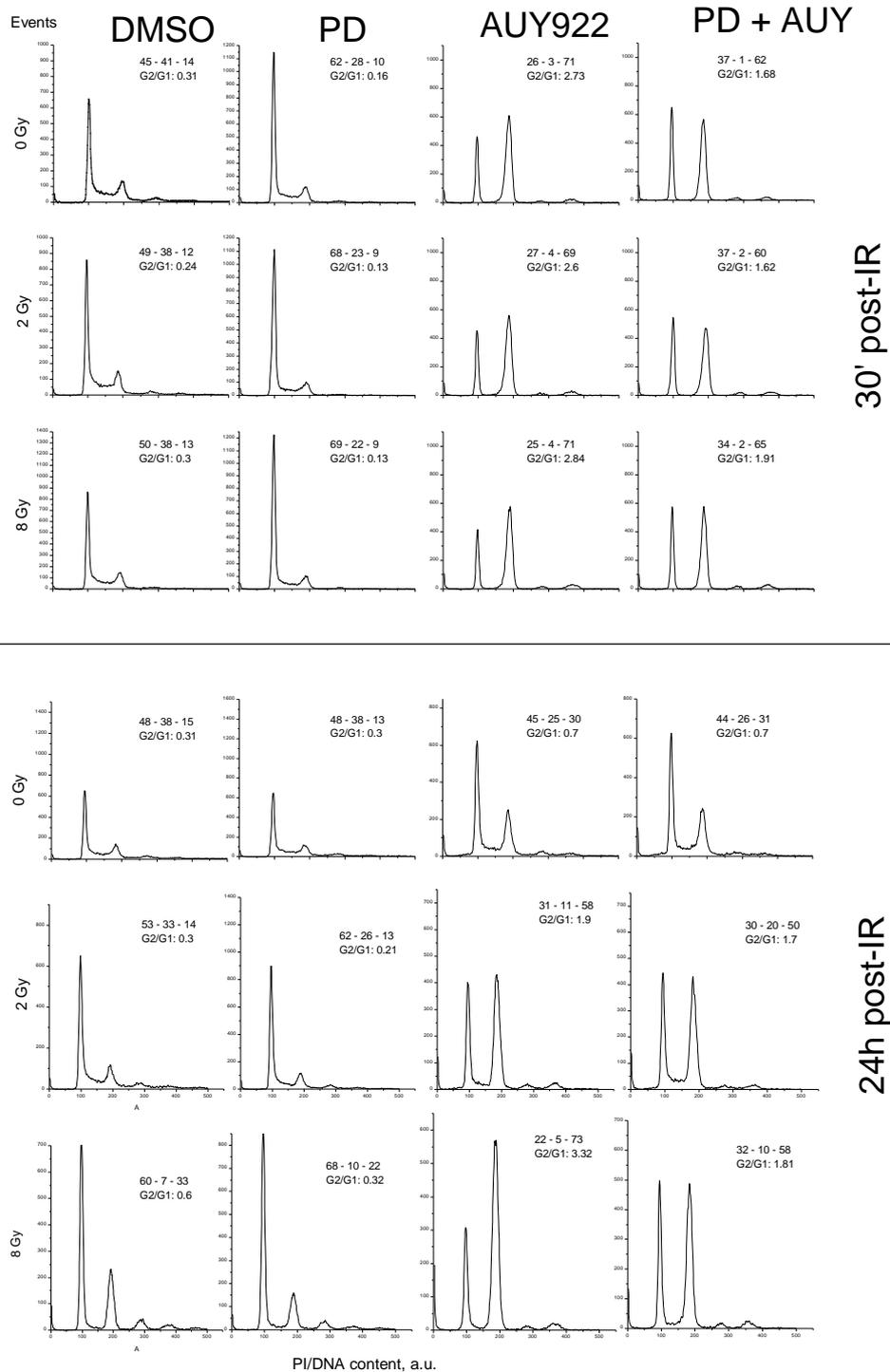


Abb. 4.6. Zellzyklus-Verteilung aus einem repräsentativen Versuch nach Set-up I mit der Zelllinie A549, dargestellt in Histogrammen. Proben wurden nach dem Schema aus 3.2.5 erstellt und nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten (obere Hälfte) oder 24 Stunden (untere Hälfte) fixiert. Nebenstehende Zahlen geben den prozentualen Anteil der G1, S, oder G2/M-Phase an (Anordnung: G1 - S - G2/M). Darunter aufgeführt ist der G2/G1-Quotient als weitere Vergleichsvariable.

Bei der Lungenkarzinomlinie ergaben sich bei den 30-Minuten-Werten (s. Abb. 4.7.) spezifische Antworten für die Substanzen, jedoch evozierten in diesem Zeitraum unterschiedliche Strahlendosen noch keine Unterschiede. In der DMSO-behandelten Kontrolle befanden sich die Zellen größtenteils in G1- und S-Phase. Unter PD ließ sich ein geringer G1-Block auf Kosten der G2- und vor allem S-Phase erkennen. Bei Behandlung mit dem Hemmstoff AUY kam es zu einem starken G2/M-Arrest und starker Depletion der S-Phase. Die Kombination der beiden Inhibitoren resultierte in einem schwächeren G2/M-Arrest. Trotz des verminderten Arrests kam es gleichermaßen zu einer S-Phase-Depletion wie bei alleiniger HSP90-Inhibition.

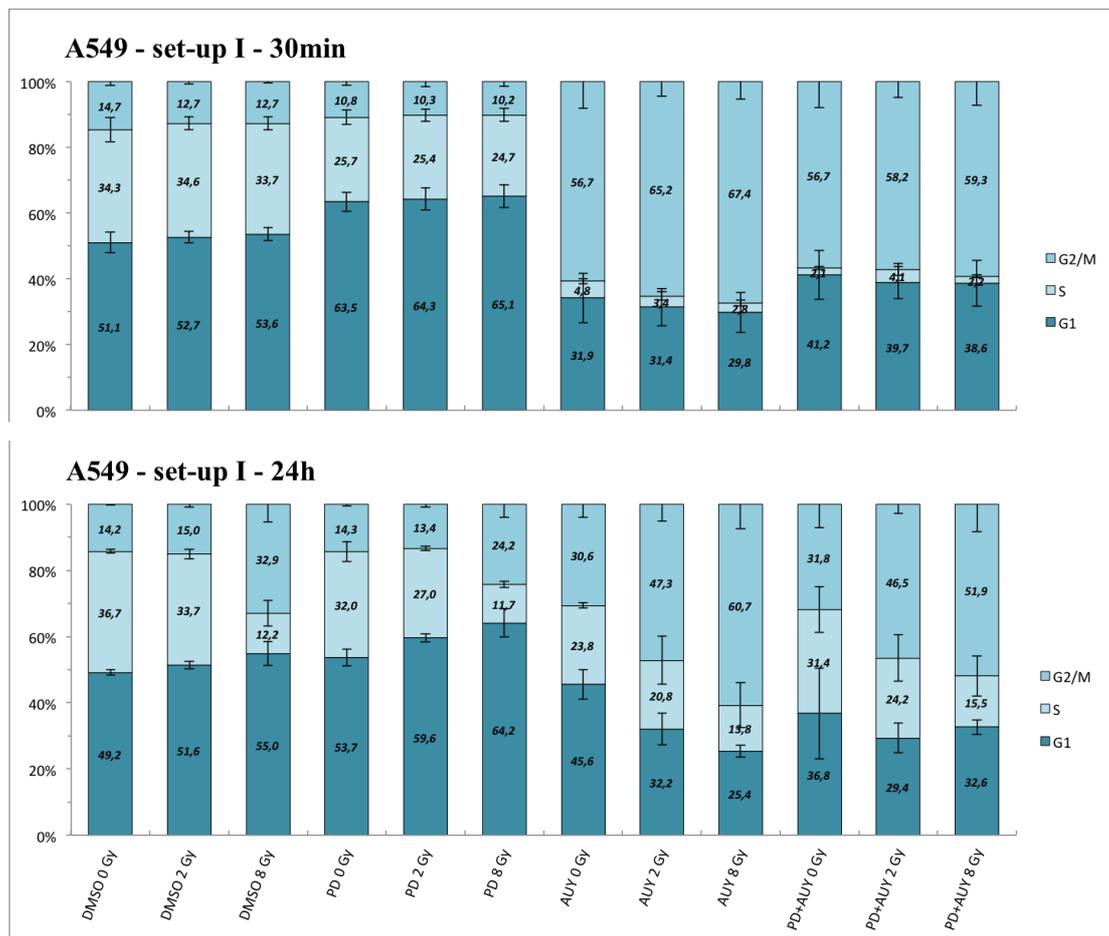


Abb. 4.7. Gemittelte Zellzyklus-Verteilung aus jeweils drei Versuchen mit der Zelllinie A549 unter Set-up I. Proben wurden nach dem Schema aus 2.2.5 erstellt und nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten (obere Hälfte) oder 24 Stunden (untere Hälfte) fixiert.

Mit DMSO behandelte A549-Zellen zeigten 24 Stunden nach Bestrahlung (s. Abb. 4.7.) weiterhin keinen Effekt, außer bei der mit 8 Gy bestrahlten Probe, wo sich der Anteil der Zellen in S-Phase größtenteils auf G1- und besonders G2-Phase umverteilte. Bei der unbestrahlten PD-Probe ging der zugewachsene G1-Anteil in die S-Phase zurück, sodass kein Unterschied mehr zu den unbehandelten Proben erkennbar war. Die mit 2 Gy bestrahlten und mit PD behandelten Proben zeigten dieselbe Tendenz bei einer geringeren Abnahme des Anteils an G1-Phase und mit 8 Gy bestrahlte Proben wiesen nur eine ausgesprochen geringe Abnahme des G1-Anteils auf, wobei sich Zellen von der S- auf die G2-Phase umverteilten. In den mit AUY behandelten Proben ließ sich nach 24 Stunden unter gleichermaßen erhöhten Anteilen von G1- und S-Phase ebenfalls ein dosisabhängiger Rückgang von G2/M-Arrest und S-Phasen-Depletion feststellen. Der Rückgang war umso stärker, je geringer die applizierte Strahlendosis war, wobei es bei 8 Gy zu einem nur sehr geringen Rückgang kam. Ein gleiches Verhalten gab es auch in den Proben, die mit der Kombination aus beiden Hemmstoffen behandelt worden waren. Bei unbestrahlten Proben war jede Phase mit einem Drittel vertreten. Unter stetiger Abnahme des G1- und S-Phasen-Anteils stieg der Anteil der G2/M-Phase, je höher die Bestrahlungsdosis war, bis auf 50%.

Für die Glioblastomzelllinie galt analog zu dem Versuch mit dem Lungenkarzinom, dass jede Substanz die oben angeführten Effekte zeigte, jedoch bei den 30-Minuten-Proben (s. Abb. 4.9.) noch keine Unterschiede durch verschiedene Bestrahlungsdosen auftraten.

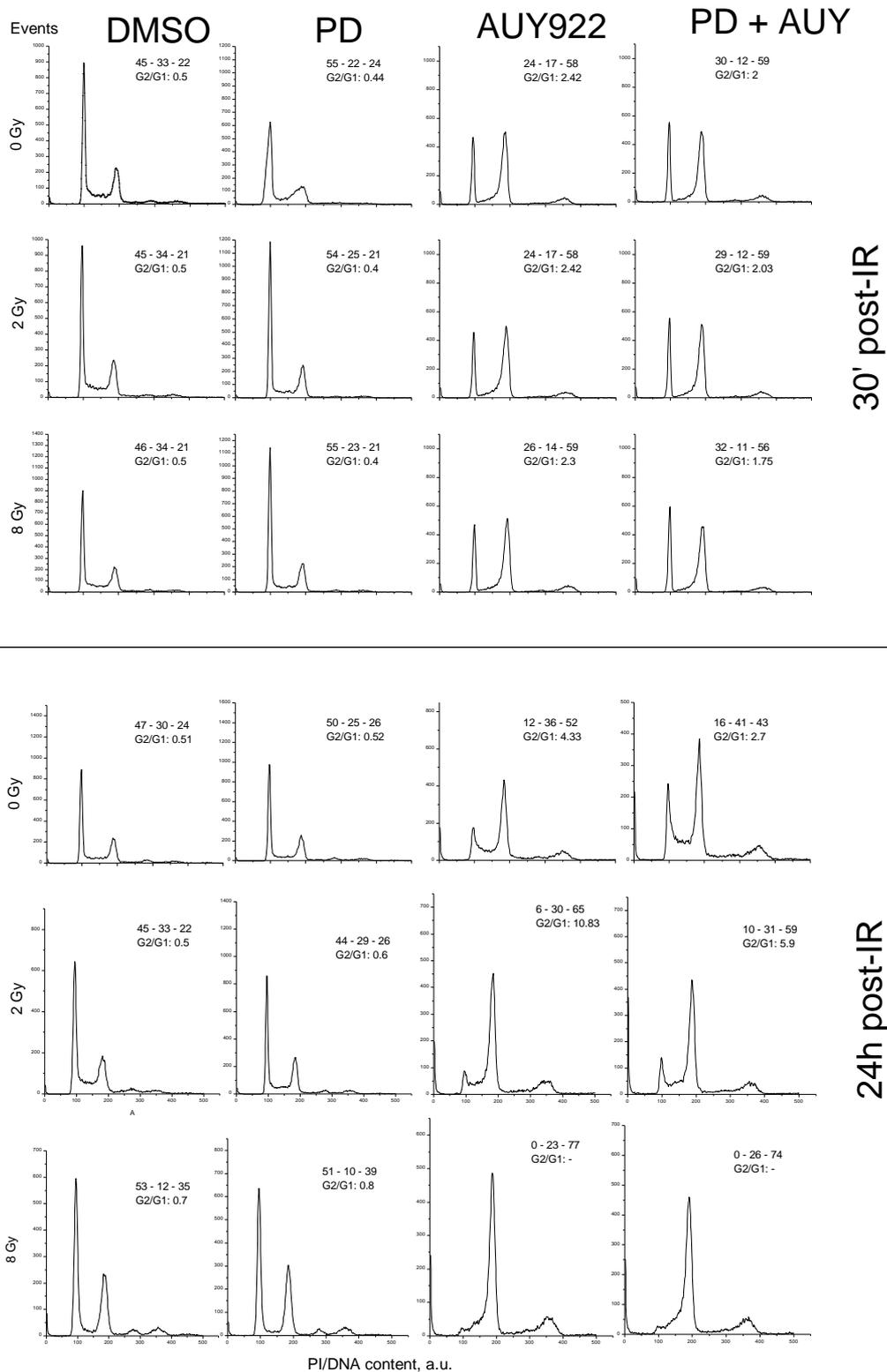


Abb. 4.8. Zellzyklus-Verteilung aus einem repräsentativen Versuch nach Set-up I mit der Zelllinie SNB19, dargestellt in Histogrammen. Proben wurden nach dem Schema aus 3.2.5 erstellt und nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten (obere Hälfte) oder 24 Stunden (untere Hälfte) fixiert. Nebenstehende Zahlen geben den prozentualen Anteil der G1, S, oder G2/M-Phase an (Anordnung: G1 - S - G2/M). Darunter aufgeführt ist der G2/G1-Quotient als weitere Vergleichsvariable.

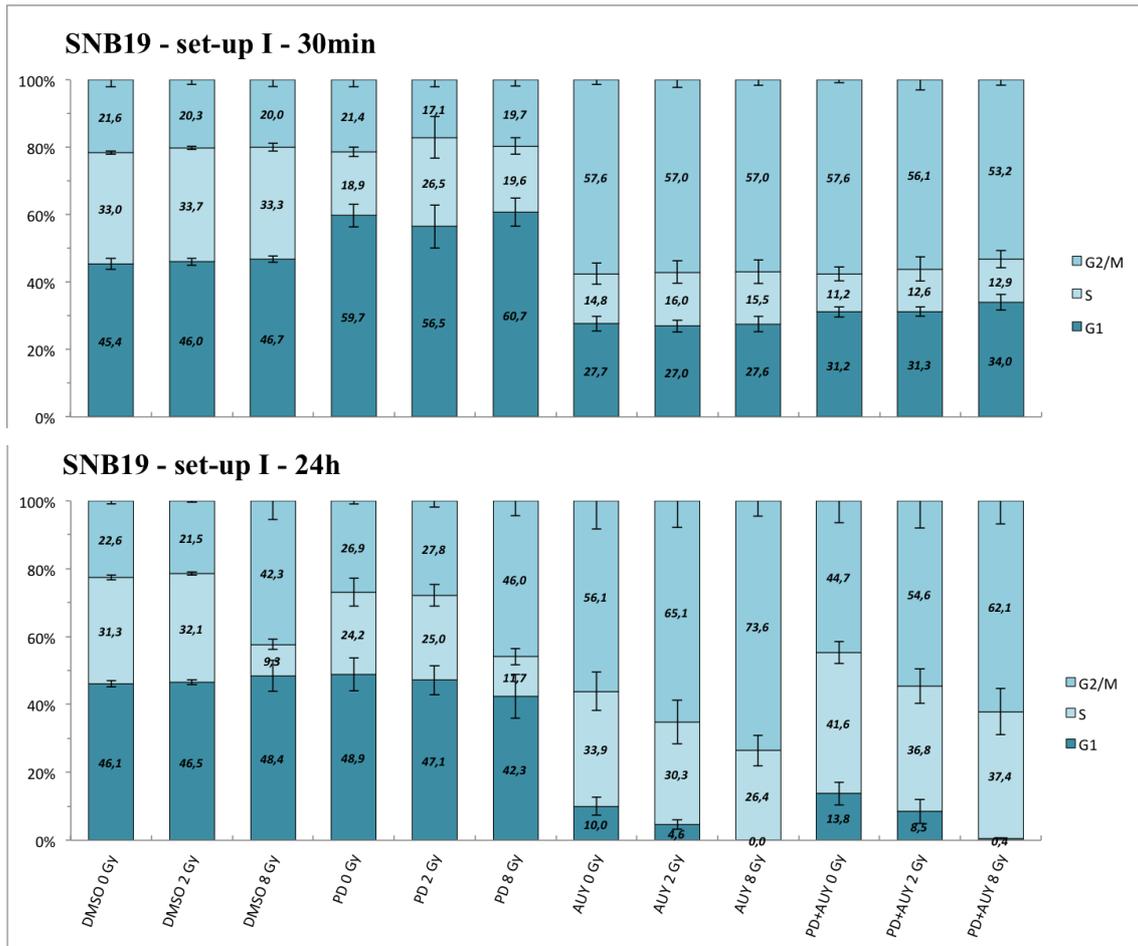


Abb. 4.9. Gemittelte Zellzyklus-Verteilung aus jeweils drei Versuchen mit der Zelllinie SNB19 unter Set-up I. Proben wurden nach dem Schema aus 2.2.5 erstellt und nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten (obere Hälfte) oder 24 Stunden (untere Hälfte) fixiert.

DMSO-behandelte Zellen waren fast zur Hälfte in der G1-Phase befindlich, ein Drittel ist in der S-Phase und die restlichen Zellen befanden sich in der G2-Phase. Durch PD kam es bei einem gesenkten S-Phasen-Anteil zu einer Erhöhung des Anteils in der G1-Phase. AUY sorgte für einen Arrest in der G2/M-Phase, wobei es im Gegensatz zum Versuch mit der Zelllinie A549 hier zu keiner S-Phasen-Depletion kam. Verglichen mit der alleinigen AUY-Behandlung war bei Kombinationsbehandlung der Abfall des G1-Phasen-Anteils etwas schwächer, wobei die S-Phase noch weiter verringert wurde. Der Anteil, den die G2-Phase einnahm, entsprach dem bei AUY-Behandlung.

Nach 24 Stunden (s. Abb. 4.9.) glich das Verhalten der Kontrolle dem Ergebnis der anderen Zelllinie, da die 0 Gy- und 2 Gy-Werte unverändert blieben und es

nur bei Bestrahlung mit 8 Gy zu einer Veränderung kam. Dort ging mit erhöhter G1- und G2-Phase ein gesenkter S-Phasen-Anteil einher. Unter PD Behandlung hatten die unbestrahlten Zellen nach 24 Stunden eine ähnliche Zellzyklus-Verteilung wie die 30-Minuten-Proben, wobei die Zellen in G1-Phase ein wenig geringer, diejenigen in der G2- und S-Phase etwas stärker ausgeprägt waren. Bei den mit 2 Gy und PD-Inhibitor behandelten Proben war im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen der Effekt auf G1- und S-Phase leicht verstärkt, während der Anteil der G2-Phase unverändert blieb. Bei einer Dosis von 8 Gy lag mit 12% nur noch ein kleiner Teil von Zellen in der S-Phase vor, wobei der Anteil von Zellen in der G2-Phase größer wurde. Im repräsentativen Versuch (s. Abb. 4.8.) widersprach der gesteigerte Wert der G1-Phase dem aus drei Versuchen gemittelten, erniedrigten Wert (s. Abb. 4.9.). Bei AUY-Zugabe zeigte sich mit Steigerung der Bestrahlungsdosis sukzessive eine Verminderung der G1-Phase, die bei 8 Gy schließlich in einer Depletion endete. Ebenso nahm der Anteil der S-Phase kontinuierlich, wenn auch nicht so stark wie die G1-Phase ab, wohingegen sich die G2-Phase mit steigender Dosis erhöhte. Bei der kombinierten Behandlung betrug der G1-Anteil bei 0 Gy ca. ein Fünftel, bei 2 Gy ein Zehntel und wurde als Folge der Bestrahlung mit 8 Gy vollkommen ausgelöscht. Der Wert war anfangs etwas höher als bei alleiniger HSP90-Inhibition, doch trat bei Anwendung von 8 Gy ebenso eine Depletion der G1-Phase ein. Die S-Phase unterlag genauso einem kontinuierlichen Abfall und zugleich gab es eine starke Erhöhung der G2-Phase, in der sich 24 Stunden nach Bestrahlung mit 8 Gy rund 60% der Zellen befanden.

4.2 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung bei Set-up II

4.2.1 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an klonogenen Überlebenskurven

Bei Set-up II wurden die Zellen kurz vor Bestrahlung mit den Substanzen behandelt sowie nach Bestrahlung bis zu 24 Stunden in Kontakt mit diesen belassen. Beide Zelllinien zeigten dabei ein anderes Verhalten als bei Behandlung nach Set-up I (s. Abb. 4.1.) und untereinander (s. Abb. 4.10.).

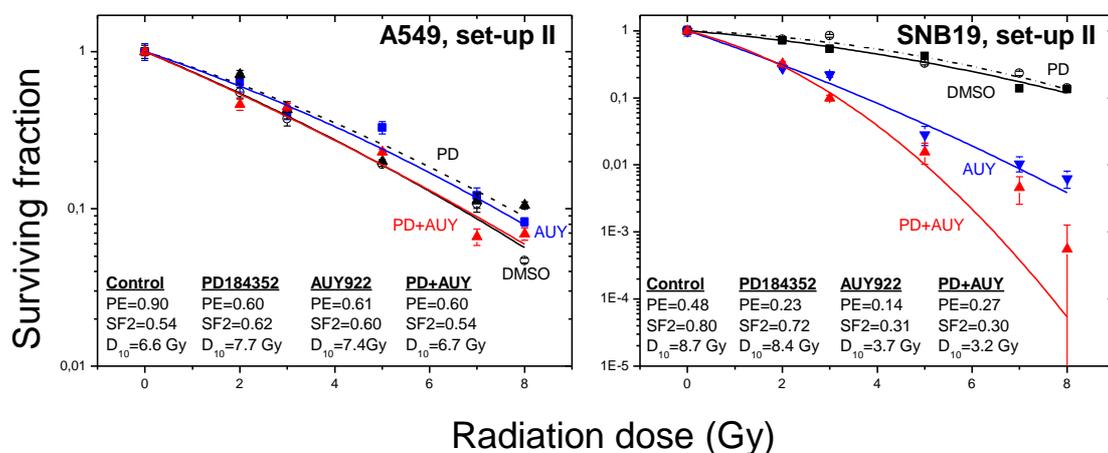


Abb. 4.10. Klonogene Überlebenskurven nach Set-up II. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Versuch aus mindestens drei unabhängigen Versuchen pro Zelllinie. Die linke Grafik ist ein Versuch mit der Zelllinie A549 und die rechte Grafik ein Versuch mit der Zelllinie SNB19. Die Zellen wurden entsprechend Set-up II erst 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren behandelt. Die Daten wurden nach dem linearquadratischen Modell angefitet. DMSO-Behandlung dient als Vehikel-Kontrolle. SD ist durch Balken gekennzeichnet.

Die Lungenkarzinomlinie wies unter diesem Versuchsaufbau keine Veränderung der Strahlenempfindlichkeit durch die verwendeten Substanzen auf (s. Abb. 4.10, links). Der SF2-Wert wurde durch die einzelnen Inhibitoren nicht wesentlich verändert, wobei auch die Kombinationsbehandlung zu einem gleichen Wert wie in DMSO-behandelten Zellen führte (s. Tabelle 19). Der D₁₀-Wert verhielt sich sehr ähnlich. Unter Betrachtung der Plattiereffizienz (PE) fiel auf, dass PD (0,9 zu 0,6) wie AUJ (0,9 auf 0,6) zu einem Abfall der PE-Werte führte. Im Mittel fiel die zytostatische Wirkung durch AUJ (0,5) stärker aus als durch PD (0,6). Die Kombination der Inhibitoren (PE=0,4) war nochmals wirksamer im Senken der PE (s. Tabelle 19). Weiterhin sank bei MEK-Inhibition der bei allen anderen Behandlungen gleichbleibende IF₁₀-Wert leicht (1,0 auf 0,9, s. Tabelle 19).

Bei den Glioblastom-Zellen (s. Abb. 4.10., rechts) trat durch PD allein ebenso kein strahlensensibilisierender Effekt auf, wohingegen AUY stark strahlensensibilisierend wirkte. Im Vergleich zur alleinigen AUY-Anwendung zeigte sich bei Behandlung mit der Kombination aus PD+AUY eine erhöhte Strahlensensibilität. Anhand der PE (s. Tabelle 19) trat eine Senkung durch die Inhibitoren ein, die allerdings bei kombinierter Behandlung nicht stärker als bei alleiniger MEK-Inhibition ausfiel. Dabei war AUY diesbezüglich wie in vorherigen Versuchen die effektvollere Substanz. Unter HSP90-Inhibition sanken D₁₀- und SF2-Wert drastisch, daher war der IF₁₀-Wert stark erhöht. Eine kombinierte Hemmung von MEK und HSP90 führte abgesehen von der Auswirkung auf die PE zur Verstärkung der AUY-Wirkung und somit der Strahlensensibilisierung.

Zelllinie	Behandlung	Plating efficiency	SF2	D10 [Gy]	IF ₁₀
A549	DMSO	0,80±0,06	0,68±0,10	7,63±0,64	1,00
	PD	0,60±0,08*	0,71±0,07	8,47±0,87	0,91±0,05
	AUY	0,49±0,09*	0,60±0,01	7,77±0,63	1,00±0,14
	PD+AUY	0,39±0,11*	0,58±0,05	7,30±0,31	1,04±0,06
SNB 19	DMSO	0,28±0,10	0,74±0,03	7,80±0,46	1,00
	PD	0,16±0,04*	0,77±0,03	7,67±0,55	1,02±0,07
	AUY	0,10±0,03*	0,40±0,05*	4,33±0,35*	1,84±0,26*
	PD+AUY	0,15±0,06*	0,33±0,02*	3,63±0,22*	2,18±0,27*

Tabelle 19 Mittelwerte (± SE) aus drei unabhängigen Koloniebildungstests, Zellen wurden entsprechend Set-up II ab 1 h vor Bestrahlung 24 h mit den Inhibitoren behandelt. SF2: Zellüberleben nach 2 Gy; D₁₀: Strahlendosis, um die klonogene Überlebensrate auf 10% zu reduzieren, IF₁₀: Wachstumsinhibitionsfaktor, PD: PD184352, AUY: NVP-AUY922. Bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe (n=3) konnten durch die diversen Behandlungsmodalitäten signifikante Änderungen (Signifikanzniveau von 5% bzw. p < 0,05) der Parameter des Zellüberlebens nachgewiesen werden, diese sind per Stern gekennzeichnet (*).

4.2.2 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Signalwegen

Um den Unterschied in der Strahlenantwort der beiden Zelllinien bei Behandlung nach zwei verschiedenen Set-ups zu erkennen, wurden die Expressionen einiger Proteine ermittelt, um in der Lage zu sein einen Vergleich herbeizuführen.

Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an HSP90/70

Hitzeschockproteine sind beteiligt am Auf- und Abbau von Proteinen, die essenziell für beispielsweise Zellzyklus und Zellüberleben sind. Sie sind befähigt, Zellen vor der Apoptose zu schützen²⁹.

Set-up II (Inkubation 1 h vor IR)

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
HSP90															
0,6	0,6	1,0	1,0	0,5	0,5	0,7	0,6	0,8	0,6	1,1	1,1	0,4	0,5	1,1	1,1
0,6	0,6	1,0	1,1	0,6	0,6	0,7	0,8	0,6	0,7	1,4	1,3	0,6	0,6	1,2	1,3
0,8	0,7	0,9	0,9	0,6	0,7	0,9	0,9	0,6	0,6	0,9	1,1	0,7	0,9	1,7	1,3
HSP70															
0,9	0,9	0,9	1,0	0,5	0,5	0,5	0,4	1,1	1,0	2,0	1,7	0,6	0,6	1,2	1,3
0,7	0,8	0,9	0,9	0,3	0,5	0,4	0,5	0,8	0,9	1,9	2,1	0,6	0,7	1,4	1,2
1,0	0,9	0,9	0,9	0,5	0,7	0,6	0,6	1,0	0,9	1,4	1,5	0,7	0,8	1,3	1,4

Tabelle 20 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von HSP70/90 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den

Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Nach 30 Minuten war bei keiner der beiden Zelllinien eine Beeinflussung durch einen Inhibitor feststellbar. Auch 24 Stunden nach Bestrahlung sorgte der Inhibitor PD für keine Veränderung in der Expression der Chaperone. Eine Hemmung mit AUY führte 24 Stunden nach Bestrahlung zu einer Hochregulation der beiden Proteine, wobei PD in der Kombination keinen Einfluss auf die Erhöhung der Expression nahm. Die Expression der beiden Proteine unter alleiniger Anwesenheit von AUY entsprach der bei kombinierter Behandlung.

Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an der PI3K/pAkt-Signalkaskade

PI3K p110 α

Die PI3-Kinase ist ein Übermittler von Signalen und sorgt für die Phosphorylierung des PIP2 zu PIP3³⁸.

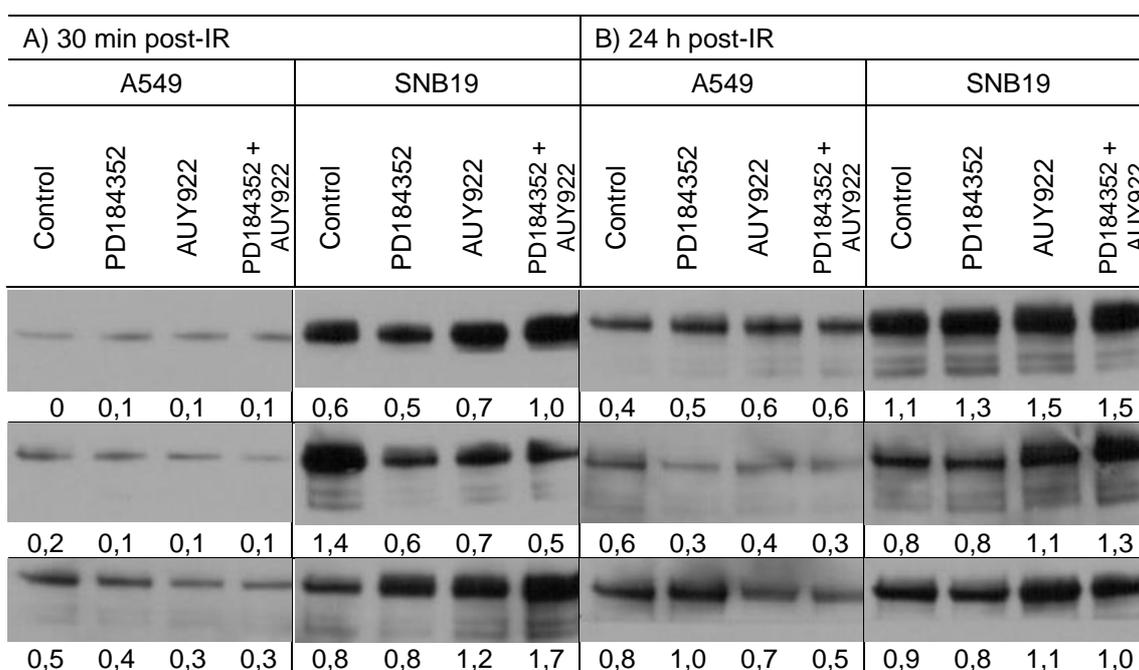


Tabelle 21 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von PI3K p110 α in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Weder die Bestrahlung noch die Zugabe von Inhibitoren veränderten die Expression der PI3K wesentlich. 30 Minuten nach Bestrahlung ergaben sich in Zelllinie A549 bei insgesamt schwacher Expression keine Unterschiede. In SNB19-Zellen zeigten die mit AUY und PD+AUY behandelten und mit 8 Gy bestrahlten Proben eine nicht signifikant erhöhte Expression. 24 Stunden nach Behandlung trat bei A549-Zellen bei unverändert geringer Expression der PI3K keine wesentliche Beeinflussung auf. In SNB19-Zellen bedingten AUY allein und in Kombination 24 Stunden nach Bestrahlung eine leichte Erhöhung.

pAkt

Das Protein Akt, auch genannt Protein Kinase B, ist ein Schlüsselmediator des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges und wird durch PIP3 phosphoryliert/aktiviert. Es gewährleistet für die Zelle grundlegende Eigenschaften wie Proliferation, Migration und Zellüberleben³⁸.

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0	0	0	0	0,4	0,4	0,4	0,3	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0
0	0	0	0	1,0	0,5	0,4	0,5	0	0	0	0	0,4	0,4	0	0
0	0	0	0	0,3	0,3	0,3	0,2	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0

Tabelle 22 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pAkt in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Die Expression des Signalproteins pAkt zeigte sich 30 Minuten nach Bestrahlung unverändert. Das Protein pAkt war nicht in der Zelllinie A549 nachzuweisen, wobei dieser Sachverhalt typisch für *PTEN*-wildtypische Zellen ist. In den 24 Stunden-Proben konnte in den Zellen der Linie SNB19 keine Veränderung der Expression durch PD festgestellt werden. Zum selben Zeitpunkt zeigte sich unter kombinierter Inhibition mit PD+AUY wie unter alleiniger Inhibition mit AUY ein kompletter Ausfall der pAkt-Expression.

pmTOR

Das Protein mTOR kommt in den zwei verschiedenen Komplexen, mTORC1 und mTORC2 vor. Während mTORC1 durch Akt aktiviert wird und wiederum P70S6K phosphoryliert, wird mTORC2 von P70S6K gehemmt und phosphoryliert Akt⁵⁴.

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0,2	0,2	0,2	0,3	0,5	0,2	0,7	0,8	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2
0,5	0,3	0,4	0,2	0,9	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,3	0,6	0,3	0,3	0,5
0,5	0,6	1,0	0,9	0,4	0,8	0,8	0,5	0,1	0,2	0,4	0,9	0,7	0,5	0,6	0,3

Tabelle 23 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pmTOR in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Die Inhibitoren nahmen nach 30 Minuten noch keinen Einfluss auf das Protein pmTOR. Zelllinie SNB19 wies eine höhere Expression des pmTOR-Proteins als Zelllinie A549 auf. PD allein veränderte die Expression des pmTOR zu keinem Zeitpunkt und unter keiner Behandlung sichtbar.

Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Proteinen der Translation

pS6

Das Protein S6 gilt als ein wichtiger Marker der Proliferation und ist ein Klient des HSP90. Das Protein S6 wird durch die P70S6K phosphoryliert⁵⁴.

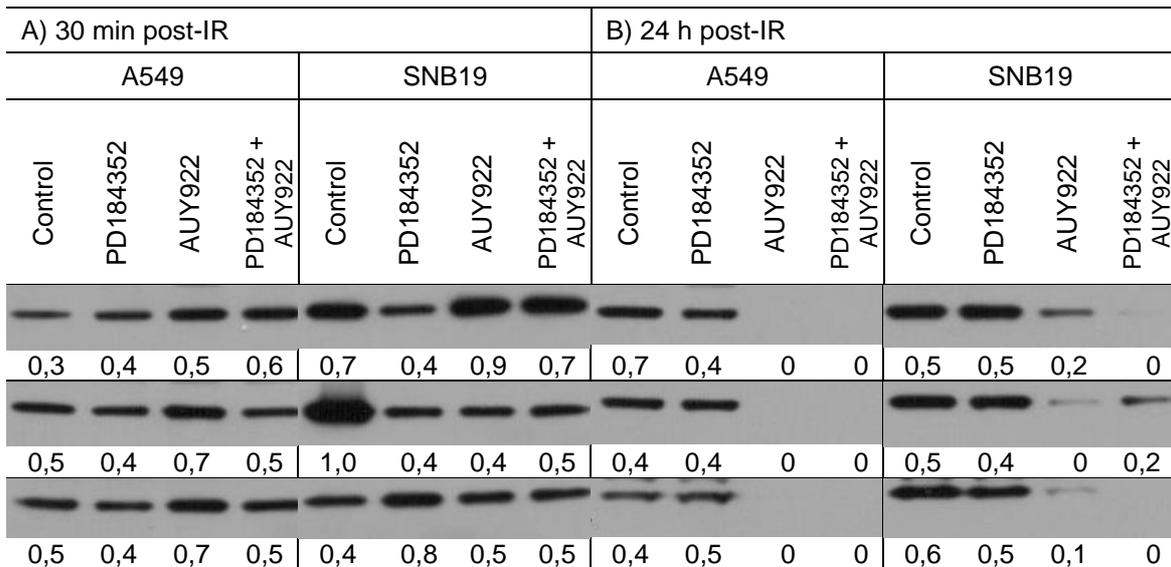


Tabelle 24 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pS6 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Der Regulator der Translations-Maschinerie pS6 unterlag 30 Minuten nach Behandlung noch keiner Veränderung. 24 Stunden nach Inhibition mit PD trat in Zelllinie A549, hier nur in unbestrahlten Zellen, eine geringe Minderung ein. AUY allein und die Kombination von AUY mit PD sorgten für einen vollen Ausfall des Proteins. In Zellen der Linie SNB19 bedingte PD 24 Stunden nach Bestrahlung keinen Effekt. AUY allein und die Kombination von AUY mit PD senkten auch in SNB19-Zellen die Expression sehr stark, aber vermittelten keinen gänzlichen Ausfall. Der Effekt war schwächer als in der Zelllinie A549.

p4E-BP1

Das den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E) bindende Protein 1 (4E-BP1) ist ein Substrat von mTOR. Phosphorylierung des Proteins führt zur Dissoziation von eIF4E, sodass die Translation fortschreiten kann⁵⁵.

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
1,2	1,1	1,2	1,1	0,8	0,8	0,7	0,7	1,1	0,6	0,7	0,6	0,4	0,3	0,6	0,7
1,3	1,9	2,0	2,2	0,7	1,3	1,3	1,4	1,0	0,7	0,8	0,6	0,7	0,5	0,7	0,5
2,3	1,9	1,7	1,8	1,4	1,9	1,7	1,7	1,1	0,9	0,7	0,9	1,3	1,1	1,3	1,1

Tabelle 25 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von p4E-BP1 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Bei Betrachtung des Proteins p4E-BP1 manifestierte sich 30 Minuten nach Bestrahlung noch kein wesentlicher Einfluss auf das Expressionsmuster. Direkt nach Bestrahlung (nach 30 Minuten gewonnene Proben) schien das Protein in beiden Zelllinien, bis auf in den 8 Gy A549-Proben, heraufreguliert zu werden, das Ausmaß korrelierend mit der Dosis.

Bei den 24 Stunden nach Bestrahlung angefertigten A549-Proben sank die Expression von p4E-BP1 nach allen unterschiedlichen Inhibitor-Behandlungen. Bei SNB19 senkte PD allein die Expression des Proteins, AUY allein zeigte keine signifikante Änderung der Expression und die Kombination beider Substanzen bedingte in den 2 und 8 Gy-Proben eine Verminderung der Expression.

Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an der MAPK-Signalkaskade

Raf-1

In dem für das Zellüberleben wichtigen MAPK-Signalweg ist das RAS-Protein zuständig für die Phosphorylierung der Kinase Raf-1. Diese wiederum aktiviert durch Phosphorylierung MEK1 und MEK2⁴¹.

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0	0,1	0,1	0,1	0,4	0,2	0,7	0,8	0,3	0,2	0	0	0,6	0,7	0,2	0,2
0,1	0,2	0,2	0,1	1,2	0,5	0,4	0,4	0,2	0,5	0,2	0,1	0,8	0,6	0,2	0,4
0,2	0,1	0,3	0,2	0,4	0,6	0,5	0,4	0,1	0,1	0	0	0,4	0,3	0,1	0

Tabelle 26 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Raf-1 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Das Protein Raf-1 wurde 30 Minuten nach Bestrahlung in Zelllinie SNB19 durch AUY und die Kombination in unbestrahlten Proben hochreguliert. In beiden Zelllinien zeigte sich kein konstanter Effekt nach kurzzeitiger Einwirkdauer. Das Protein schien in Zellen der Linie A549 schwächer exprimiert. Nach 24 Stunden zeigte PD keinen Effekt an beiden Zelllinien, auch unabhängig von den angewendeten Strahlendosen. Als HSP90-Klient fiel bei Behandlung mit AUY und PD+AUY die Expression des Proteins stark ab, unabhängig ob mit AUY allein oder kombiniert behandelt wurde.

pMEK1/2

Die Kinasen MEK 1/2 sind der auf die Raf-Kinasen folgende Bestandteil des MAPK-Signalwegs und phosphorylieren das Protein ERK⁴¹.

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0,5	1,1	0,6	1,0	0,4	1,1	0,3	1,0	0,7	1,6	0	0,4	0,8	1,5	0	0
0,4	1,4	0,8	1,5	0,6	1,4	0,6	1,3	0,8	1,9	0	0,9	0,7	1,8	0	0,1
0,8	1,8	0,7	1,6	0,5	1,2	0,4	1,3	0,9	2,0	0	0,4	1,2	2,3	0,1	0,3

Tabelle 27 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pMEK1/2 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Die Kinase pMEK1/2 zeigte bereits nach kurzer Anwesenheit des MEK-Inhibitors eine Änderung der Expression. In den 30 Minuten nach Bestrahlung angefertigten Proben bedingte die Behandlung mit PD in beiden Zelllinien und unter allen Strahlendosen gleichermaßen eine Hochregulation von pMEK1/2. Ebenso kam es in beiden Zelllinien, von AUY scheinbar nicht beeinflusst, auch bei Kombinationsbehandlung zu starker, ungefähr gleich großer, Erhöhung der Expression.

Nach 24 Stunden war in beiden Zelllinien durch alleinige PD-Behandlung weiterhin eine erhöhte Menge des Proteins nachweisbar. Unter AUY-Modalität hingegen war zu diesem Zeitpunkt in beiden Zellarten pMEK1/2 nicht nachweisbar. Die Anwendung der Kombination erweist sich diesbezüglich effektiver in SNB19 als in A549. In Zelllinie A549 blieb 24 Stunden nach

Bestrahlung, bestrahlt mit 2 Gy und behandelt mit PD+AUUY die meiste Protein-Expression zurück, was nicht konsistent in weiteren Versuchen war.

pERK

Die Kinasen ERK1/2 werden im MAPK-Signalweg durch pMEK1/2 phosphoryliert. Sie haben Einfluss auf Translation, Proliferation, Zellzyklus und Migration der Zellen⁴³.

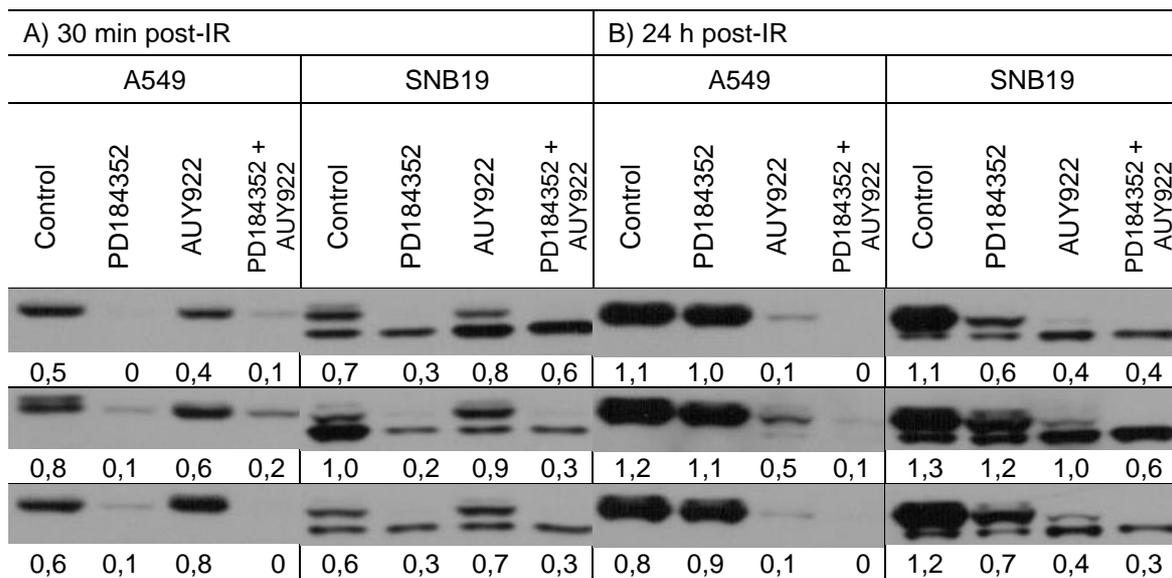


Tabelle 28 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pERK in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

In der Untersuchung dieses Proteins zeigten Zellen der Linie A549 eine Bande, während die Linie SNB19 zwei Banden aufwies. In den 30 Minuten nach Bestrahlung erstellten Proben der Zelllinie A549 verursachten PD und PD+AUUY einen totalen Ausfall des pERK, wohingegen es unter alleiniger AUUY-Inhibition noch keine Auswirkung gab. In SNB19-Zellen offenbarte sich die gleiche Tendenz, wobei mit der unteren Bande ein Teil der Expression unter Behandlung mit PD und PD+AUUY vorhanden blieb. In dieser Zelllinie gab es also eine Abschwächung und keinen Ausfall wie in A549-Zellen. AUUY zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die 30 Minuten nach Bestrahlung angefertigten Proben der Linie SNB19.

Nach 24 Stunden enthielten A549-Zellen nach Behandlung mit PD und DMSO eine gleiche Menge des pERK1/2. Aus HSP90-Inhibition allein resultierte eine starke Minderung der Expression des pERK und nach kombinierter Behandlung mit PD+AUY waren keine Banden mehr sichtbar. In Zelllinie SNB19 waren 24 Stunden nach Bestrahlung die Proteinlevel des pERK in mit DMSO- und PD-behandelten Zellen weiterhin vermindert. Unter Einfluss von AUY und PD+AUY blieb die Expression stärker aus. Unter Kombination von PD+AUY trat nach 24 Stunden die größte Minderung des pERK auf.

Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Proteinen der DNA-Reparaturprozesse und Apoptose

Rad51

Bezüglich des Reparaturmechanismus der Homologen Rekombination (HR) wurde das Protein Rad51 untersucht²⁴.

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922
0,6	0,6	0,8	0,7	0,5	0,6	0,4	0,3	1,3	1,1	0,2	0,1	1,0	0,8	0,3	0,2
0,1	0,5	0,4	0,5	0,3	0,4	0,3	0,4	1,0	0,5	0	0,1	0,8	0,7	0,2	0,1
0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5	0,4	0,3	0,9	0,8	0	0	1,2	1,1	0,7	0,3

Tabelle 29 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Rad51 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

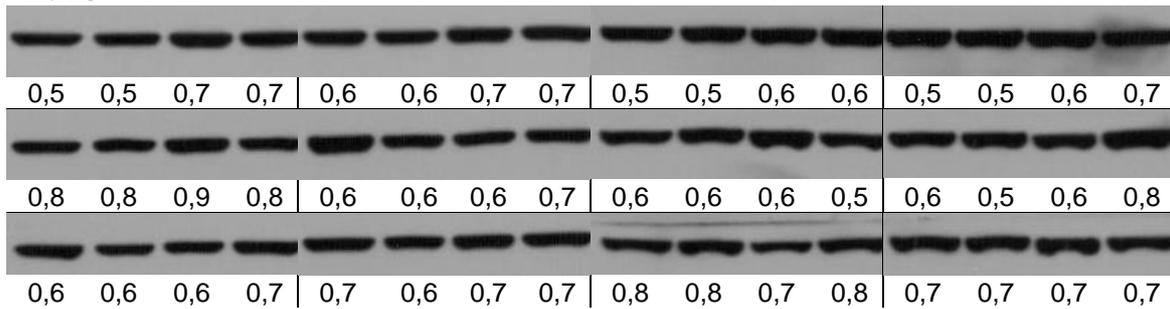
Für Rad51 waren 30 Minuten nach Bestrahlung keine Unterschiede zu erkennen, die konstant in den weiteren Versuchen reproduzierbar waren. Nach 24 Stunden zeigte sich die jeweilige Expression beider Zelllinien unter MEK-Inhibition geschwächt. A549-Zellen wiesen 24 Stunden nach Behandlung mit AUY, auch

nach Kombinationstherapie keine Expression von Rad51 mehr auf. In Zelllinie SNB19 war bei diesen beiden Modalitäten der Umfang der Expressionen ebenso deutlich, nur etwas weniger, geschwächt.

Die beiden DNA-Reparaturproteine Ku70 und Ku80 sind Bestandteile des NHEJ („non-homologous end joining“)²⁴.

A) 30 min post-IR								B) 24 h post-IR							
A549				SNB19				A549				SNB19			
Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922	Control	PD184352	AUY922	PD184352 + AUY922

Ku70



Ku80

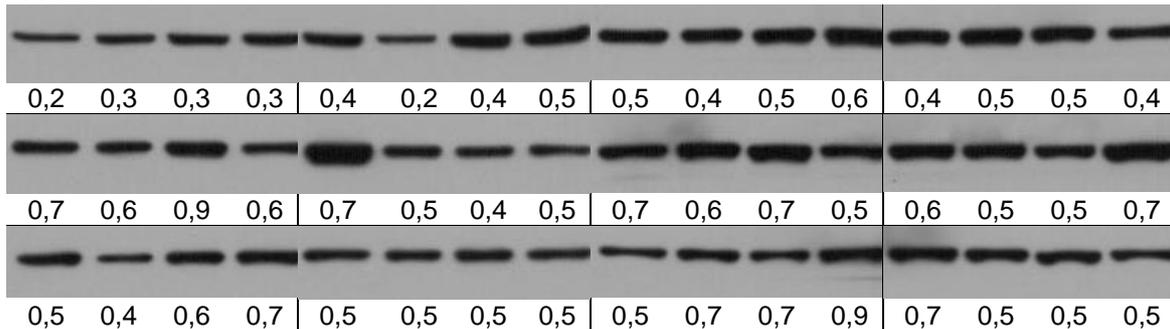


Tabelle 30 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Ku70/Ku80 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II. Angewendete Strahlendosen - Zeile 1: 0 Gy, Zeile 2: 2 Gy, Zeile 3: 8 Gy. Die Zellen wurden gemäß Set-up II 1 h vor Bestrahlung mit den Inhibitoren versehen, als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO. Die Proteinbanden wurden auf die Intensität der β -Aktin-Bande normalisiert, der darunterliegende Wert gibt das entsprechende Verhältnis an. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Im Expressionsverhalten der Proteine Ku70 und Ku80 entstanden keine Unterschiede durch diverse Behandlungs- und Bestrahlungsmodalitäten. Der

Abfall der Ku80-Expression einer SNB19-Probe (30 Minuten, 0 Gy, PD) stand nicht im Einklang mit dem Ergebnis der weiteren Versuche, einem gleichbleibenden Wert. Der erhöhte Kontrollwert der mit 2 Gy bestrahlten DMSO-Probe war einer übermäßigen Beladung geschuldet.

4.2.3 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung an Induktion und Reparatur der DNA-Schäden

Nachgewiesen über den γ H2AX-Marker kam es nach 30 Minuten in der Zelllinie A549 bei Zugabe des Inhibitors PD besonders bei unbestrahlten Zellen zu einer geringen Erhöhung der DNA-Schäden (s. Abb. 4.11.). Unter AUY-Behandlung zeigten die Proben bis auf eine leichte Erhöhung des 2 Gy-Wertes keine wesentlichen Veränderungen. Bei kombinierter Behandlung war die jeweilige Anzahl der Schäden tendenziell niedriger, wobei hier ebenso keine signifikante Veränderung vorlag. Insgesamt lagen nach sehr kurzer Einwirkungszeit noch keine wirklichen Effekte durch die Inhibitoren vor.

Nach 24 Stunden zeigte sich anhand des Rückgangs in den DNA-Schäden bei 2 Gy und 8 Gy, dass PD-behandelte Zellen die Schäden nach Bestrahlung besser reparieren als die Kontrolle (s. Abb. 4.11., Linksverschiebung der Kurven in der unteren Reihe). Verglichen mit dem Wert der Kontrolle war der Anteil der nach 24 Stunden nicht reparierten DNA-Schäden in AUY- und PD+AUY-behandelten Zellen um 25% (s. Werte der Abb. 4.11., nicht reparierter Anteil für DMSO-Proben 0,4 [8 Gy: 1172/2740], 0,5 für AUY-Proben [8 Gy: 1357/2792] und 0,5 für PD+AUY-Proben [8 Gy: 1437/2705]) erhöht. Damit wiesen die Zellen bei diesen Behandlungsarten nach 24 Stunden mehr Schäden auf, beide 0 Gy-Proben (AUY und PD+AUY) wiesen eine höhere Anzahl von Schäden als in den 30-Minuten-Werten auf.

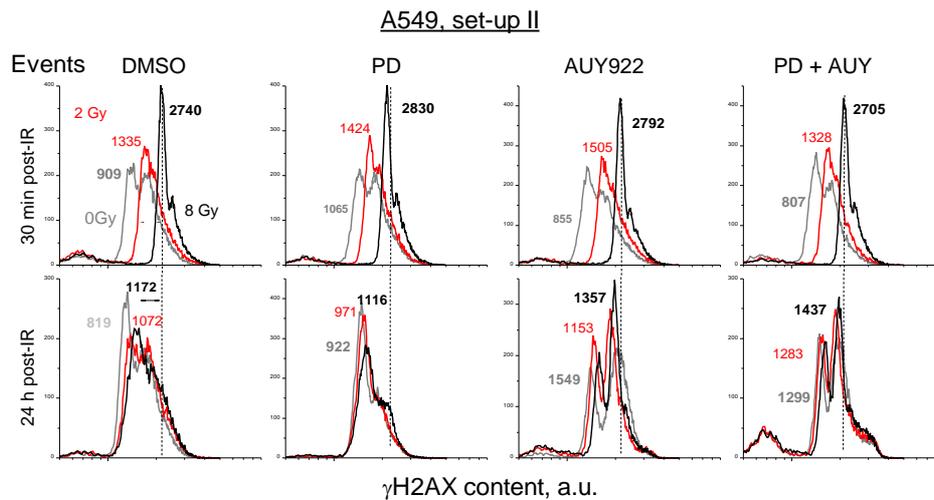


Abb. 4.11. γ H2AX-Verteilung der mit DMSO und Inhibitor behandelten A549-Proben eines repräsentativen Versuchs unter Set-up II. Fixierungen der Proben erfolgten 30 Minuten und 24 Stunden nach Bestrahlung. Die vertikale gestrichelte Linie verläuft durch den Modalwert der 8 Gy-Kontrollprobe, die nach 30 Minuten fixiert wurde. Angetragene Werte an den Kurven sind Geomeans. Die hellgrauen Kurven repräsentieren die unbestrahlten Proben, rote Kurven die mit 2 Gy bestrahlten Proben und schwarze Kurven die mit 8 Gy bestrahlten Proben.

Die Glioblastomzelllinie SNB19 zeigte bei PD-Behandlung in den 30-Minuten-Proben eine Erhöhung der DNA-Schäden. Nach 24 Stunden wiesen die PD-behandelten Zellen allerdings weniger Schäden als die Kontrollgruppe auf, was sich auch mit dem Wert der nicht reparierten DNA-Schäden zeigte, der bei DMSO 0,4 und bei PD 0,3 betrug. Unter Inhibition mit AUY traten insgesamt weniger Schäden auf, die nach 24 h zu etwa 30% repariert worden waren (bezogen auf 8 Gy Proben). Bei der Kombinationsbehandlung waren in den 30-Minuten-Proben die Schäden bei 0 Gy und 2 Gy ebenfalls niedriger als in der Kontrolle, der Schadenswert bei 8 Gy war jedoch vergleichbar groß. In den kombiniert behandelten Zellen waren nach 24 Stunden circa 64% (s. Abb. 4.12.: $4334/6809=0.64$) der DNA-Schäden nicht repariert verblieben, wohingegen es bei alleiniger AUY-Behandlung ca. 73% waren. Auffällig war erneut, dass sowohl bei AUY- als auch bei PD+AUY-Behandlung erst nach 24 Stunden (s. Abb. 4.12., Werte an den Graphen der unteren Reihe) ein toxischer Effekt sichtbar wurde, indem die 0 Gy- und 2 Gy-Werte der Schäden nach 24 Stunden über die 30 Minuten-Werte gestiegen waren.

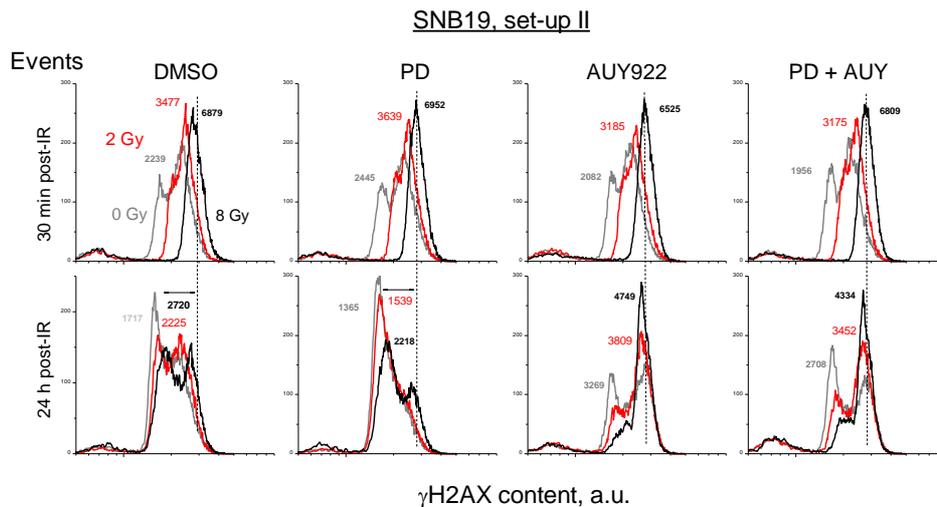


Abb. 4.12. γ H2AX-Verteilung der mit DMSO und Inhibitor behandelten SNB19 Proben eines repräsentativen Versuchs unter Set-up II. Fixierungen der Proben erfolgten 30 Minuten und 24 Stunden nach Bestrahlung. Die vertikale gestrichelte Linie verläuft durch den Modalwert der 8 Gy-Kontrollprobe, die nach 30 Minuten fixiert wurde. Angetragene Werte an den Kurven sind Geomeans. Die hellgrauen Kurven repräsentieren die unbestrahlten Proben, rote Kurven die mit 2 Gy bestrahlten Proben und schwarze Kurven die mit 8 Gy bestrahlten Proben.

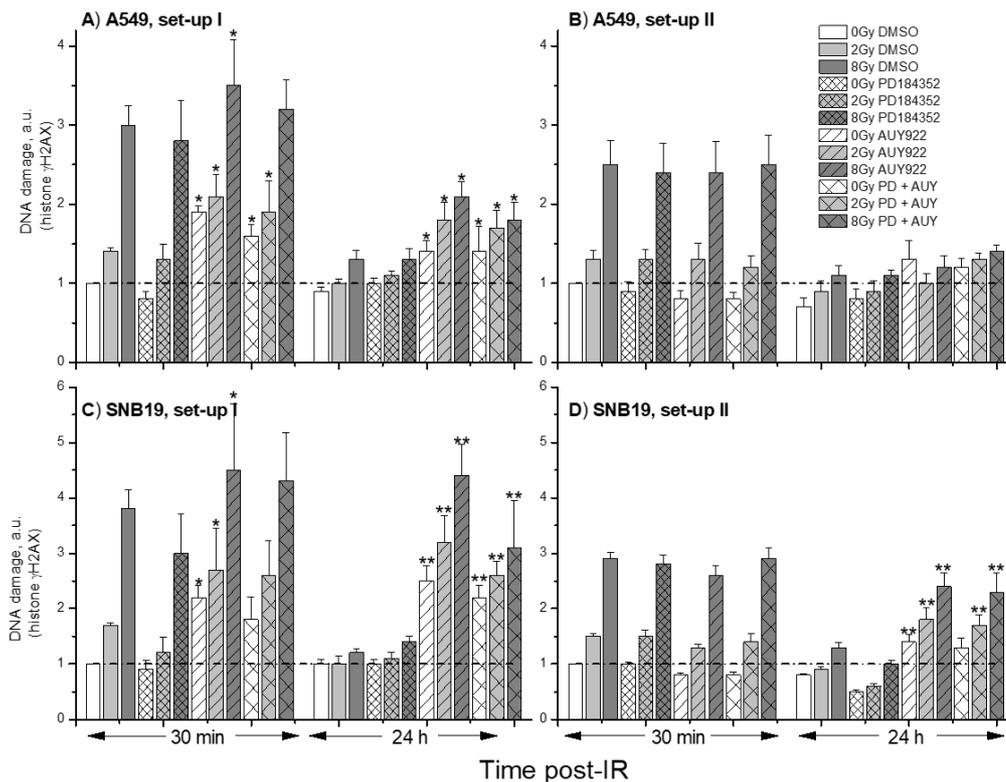


Abb. 4.13. Normierte Darstellung der γ H2AX-Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Versuchen unter Set-up II. Einbezogen sind Daten aus beiden Zelllinien und Set-ups. Genormt wurde jeweils auf die unbestrahlte, nach 30 Minuten fixierte DMSO-Probe und dieser Wert gleich 1 gesetzt. Für einen erleichterten Vergleich verläuft eine gestrichelte Linie durch den Norm-Schadenswert der unbestrahlten und unbehandelten Kontrollprobe. Die Säulen zeigen den jeweiligen Mittelwert aller Versuche, die Balken die Standardabweichung. Bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe ($n=3$) konnten durch die diversen Behandlungsmodalitäten signifikante Änderungen der γ H2AX-Mittelwerte nachgewiesen werden (*: Signifikanzniveau von 5% bzw. $p < 0,05$, **: Signifikanzniveau von 1% bzw. $p < 0,01$).

Wie für Set-up I sind mit Abbildung 4.13. einmal die gemittelten Schadenswerte aus drei Versuchen normiert dargestellt und mit Abbildung 4.14. die nicht reparierten DNA-Schäden jedes repräsentativen Versuchs abgebildet. Für die nach 30 Minuten fixierten Proben beider Zelllinien galt, dass die Schadenswerte unter Inhibitoren noch kaum von der Kontrolle abwichen (s. Abb. 4.13.). Nach 24 Stunden zeigte die MEK-Inhibition in den A549-Zellen keinen signifikanten Effekt für die Reparatur. AUY und die Kombination aus den beiden Hemmstoffen führten zu einem Anstieg des Schadens, besonders in den unbestrahlten Proben. Des Weiteren ließen diese beiden Modalitäten mit einem Anteil von ca. 50% verglichen mit den 40% der Kontrolle mehr unreparierte DNA-Schäden zurück (s. Abb. 4.14.). In den 24 h-Proben der SNB19-Zellen zeigte sich ein proliferativer Effekt durch PD, der Anteil nicht reparierter DNA-Schäden sank von 40% in der Kontrolle auf 30% (s. Abb. 4.14.). Bei vergleichbaren Ausgangswerten der Kontrolle beider Zelllinien zeigte die HSP90-Inhibition im Glioblastom eine größere Auswirkung. Bei Behandlung allein mit AUY oder mit PD gekoppelt stiegen die Schadenswerte der 0 Gy- und 2 Gy-Proben nach 24 h signifikant (s. Abb. 4.13.).

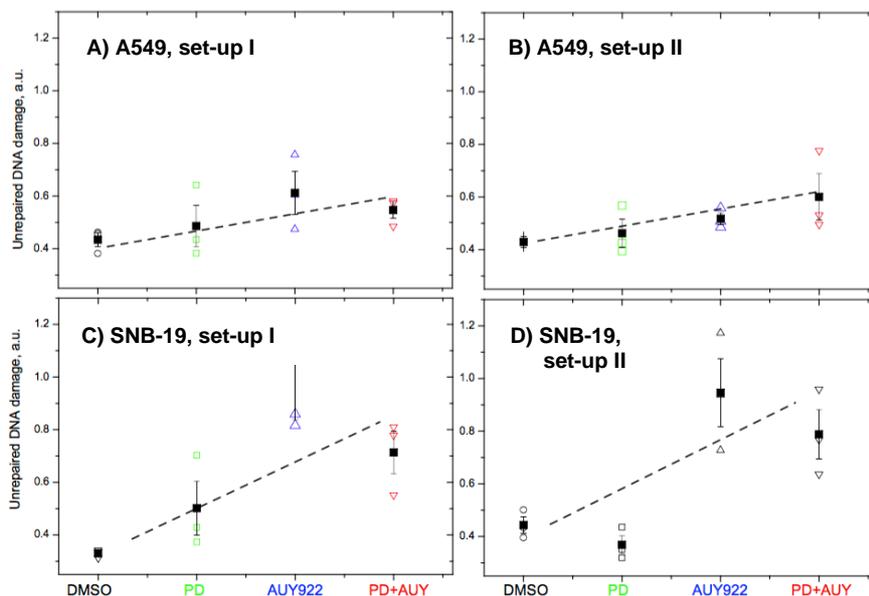


Abb. 4.14. Verbirdlichung der relativen Menge nicht reparierter DNA-Schäden mit direkter Gegenüberstellung aller Modalitäten. Die Werte sind zusammengesetzt aus je drei unabhängigen Versuchen des jeweiligen Set-ups (A-D).

$$\text{Nicht reparierter Schaden der DNA} = \frac{\text{Geomean } 8 \text{ Gy}, 24\text{h}}{\text{Geomean } 8 \text{ Gy}, 30\text{r}}$$

Die Schäden wurden unter AUY zu circa 75% nicht repariert. Die Kombinationsbehandlung schwächte die Effekte der Hemmstoffe ab und zeigte eine leicht bessere Reparatur (60% nicht repariert) als sie bei alleiniger HSP90-Inhibition stattfand (s. Abb. 4.14.).

4.2.4 Effekte der MEK/HSP90-Inhibition und Bestrahlung auf Zellzyklusverteilungen

Nach dem Behandlungs-/Bestrahlungszeitplan von Set-up II zeigten sich die 30-Minuten-Werte beider Zelllinien noch nicht durch die verschiedenen Substanzen beeinträchtigt (s. Abb. 4.15. und Abb. 4.17.). Alle Phasen hatten bei den 30 Minuten nach Bestrahlung angefertigten Proben der beiden Zelllinien immer die gleiche Verteilung, unabhängig davon, ob zuvor mit DMSO, PD, AUY oder der Kombination behandelt worden war. Bei A549 befand sich die Hälfte der Zellen in der G1-Phase, ein Drittel in der S-Phase und ca. 15% in der G2/M-Phase (s. Abb. 4.14. und 4.15.). Bei SNB19 befand sich im Mittel etwas mehr als ein Viertel der Zellen in der G1-Phase, die Hälfte in der S-Phase und der Rest, ca. 20%, in der G2/M-Phase (s. Abb. 4.17.).

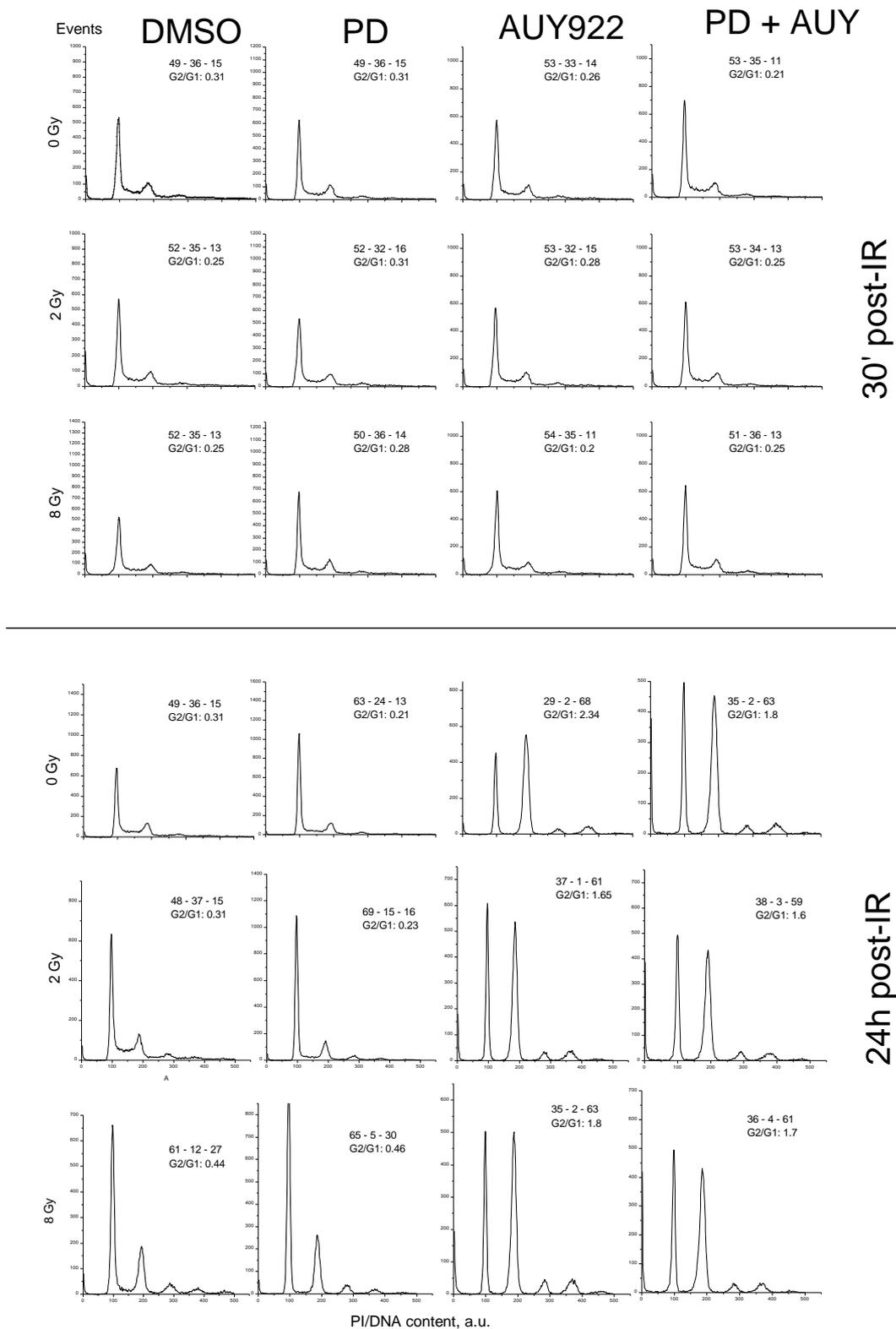


Abb. 4.15. Zellzyklus-Verteilung aus einem repräsentativen Versuch nach Set-up II mit der Zelllinie A549, dargestellt in Histogrammen. Proben wurden nach dem Schema aus 3.2.5 erstellt und nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten (obere Hälfte) oder 24 Stunden (untere Hälfte) fixiert. Nebenstehende Zahlen geben den prozentualen Anteil der G1, S, oder G2/M-Phase an (Anordnung: G1 - S - G2/M). Darunter aufgeführt ist der G2/G1-Quotient als weitere Vergleichsvariable.

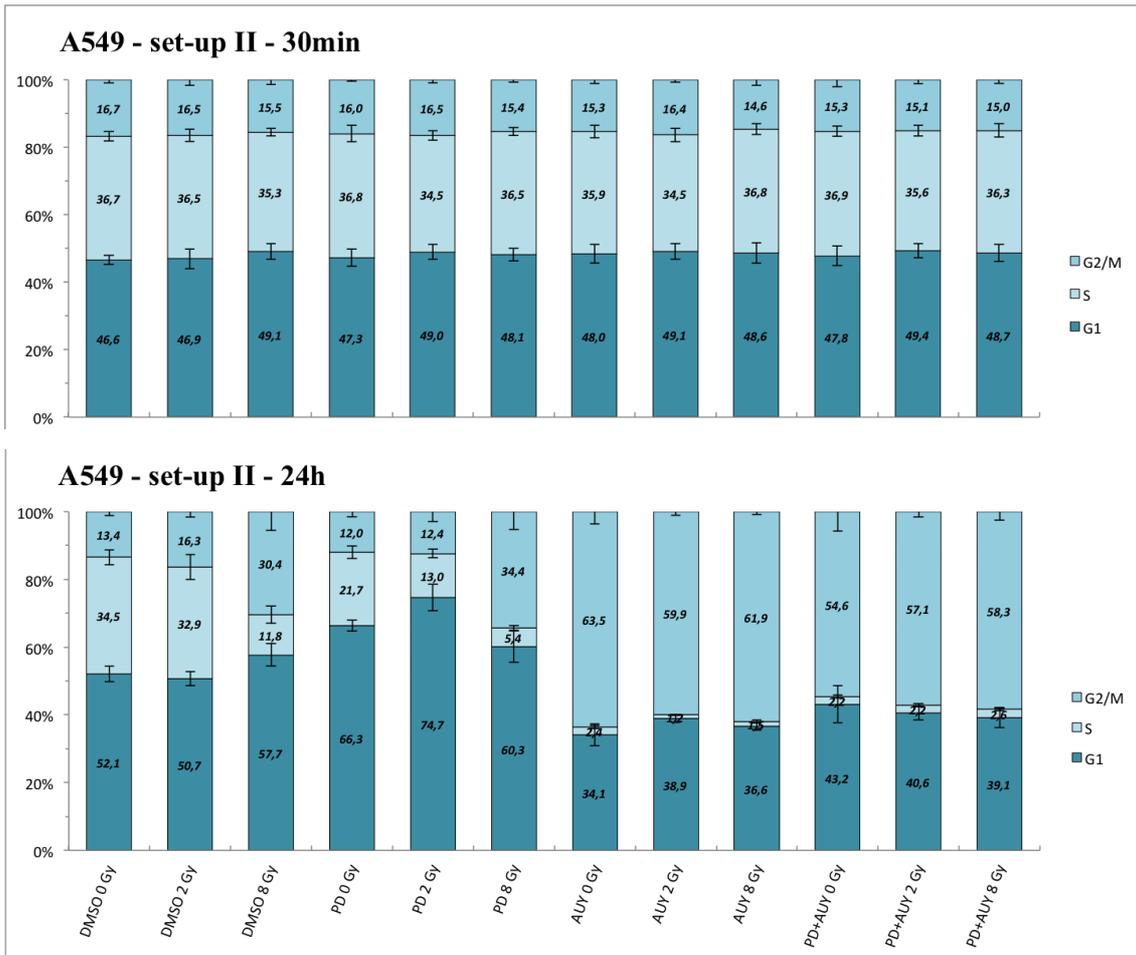


Abb. 4.16. Gemittelte Zellzyklus-Verteilung aus jeweils drei Versuchen mit der Zelllinie A549 unter Set-up II. Proben wurden nach dem Schema aus 2.2.5 erstellt und nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten (obere Hälfte) oder 24 Stunden (untere Hälfte) fixiert.

24 Stunden nach Bestrahlung lag in der Kontrolle der Lungenkarzinomlinie (s. Abb. 4.16.), bei unbestrahlter und mit 2 Gy bestrahlter DMSO-Behandlung, weiterhin eine Phasenaufteilung wie in den 30 Minuten-Werten vor. In der mit 8 Gy bestrahlten DMSO-Probe nahmen die G1- und G2/M-Phase bei einer Abnahme der S-Phase zu. Durch die Behandlung mit dem MEK-Inhibitor war bei den unbestrahlten Proben verglichen mit der Kontrolle die G1-Phase stark auf einen Anteil von zwei Drittel erhöht, während sich die S-Phase auf ca. ein Viertel und die G2/M-Phase auf durchschnittlich 12% Zellzyklusanteil beschränkte. Bei einer Strahlendosis von 2 Gy erhöhte sich in Kombination mit dem MEK-Inhibitor der G1-Phasen-Anteil weiter, während G2/M- und S-Phase vermindert wurden. Entgegen der vorherigen Tendenz bedingte eine Bestrahlung mit 8 Gy einen Abfall der G1-Phase, sowie eine weitere Verschmälerung des S-Phasen-Anteils

auf 5% und ein Anwachsen der G2-Phase auf 30%. Unter Behandlung mit AUY ergaben die 24-Stunden-Aufteilungen einen für den Hemmstoff klassischen G2/M-Arrest unter S-Phase-Depletion. Die kombinierte Behandlung aus beiden Inhibitoren sorgte für eine ähnliche Tendenz wie bei alleiniger AUY-Behandlung, wobei der Anteil der G1-Phase größer und die G2/M Phase etwas geringer ausgeprägt war.

Auch die gemäß des Behandlungs-/Bestrahlungszeitplans des Set-up II nach 30 Minuten angefertigten SNB19-Proben zeigten keine Änderungen (s. Abb. 4.17. und 4.18.) in ihrer Zellzyklusverteilung.

Die Zellzyklus-Verteilung der Glioblastomzelllinie 24 Stunden nach Bestrahlung war in der unbestrahlten Kontrolle im Durchschnitt 43%-34%-23% (G1-S-G2/M, s. Abb. 4.18.). Nach Bestrahlung der Kontrolle mit 2 Gy sanken die Anteile von G1- und G2-Phase leicht und der Anteil der S-Phase stieg auf durchschnittlich fast 40%. Bei 8 Gy erreichte die G2-Phase einen Anteil von über 50%, während sich der Anteil an der G1-Phase weiter verkleinerte und die S-Phase stark abnahm. Während unter Behandlung mit dem MEK-Inhibitor allein der Anteil der G1-Phase mit Erhöhung der Dosis konstant leicht zurückging, nahm der Anteil der S-Phase, bevor er unter 8 Gy stark abnahm, bei Bestrahlung mit 2 Gy leicht zu. Es zeichnete sich insgesamt ein dosisabhängig zunehmender G2/M-Phasen-Arrest ab, sowohl unter der Behandlung mit AUY allein als auch unter Kombination von AUY und PD.

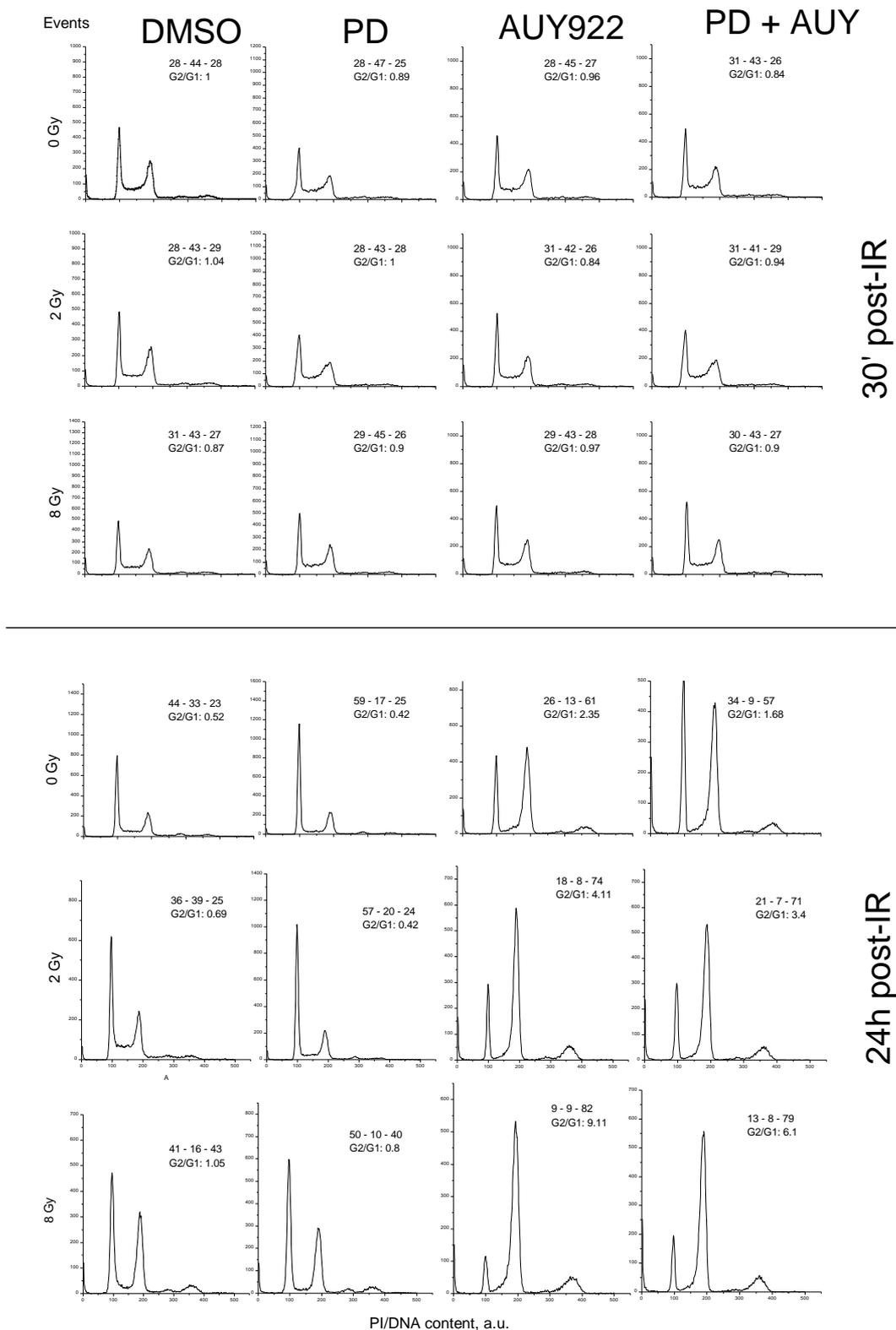


Abb. 4.17. Zellzyklus-Verteilung aus einem repräsentativen Versuch nach Set-up II mit der Zelllinie SNB19, dargestellt in Histogrammen. Proben wurden nach dem Schema aus 3.2.5 erstellt und nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten (obere Hälfte) oder 24 Stunden (untere Hälfte) fixiert. Nebenstehende Zahlen geben den prozentualen Anteil der G1, S, oder G2/M-Phase an (Anordnung: G1 - S - G2/M). Darunter aufgeführt ist der G2/G1-Quotient als weitere Vergleichsvariable.

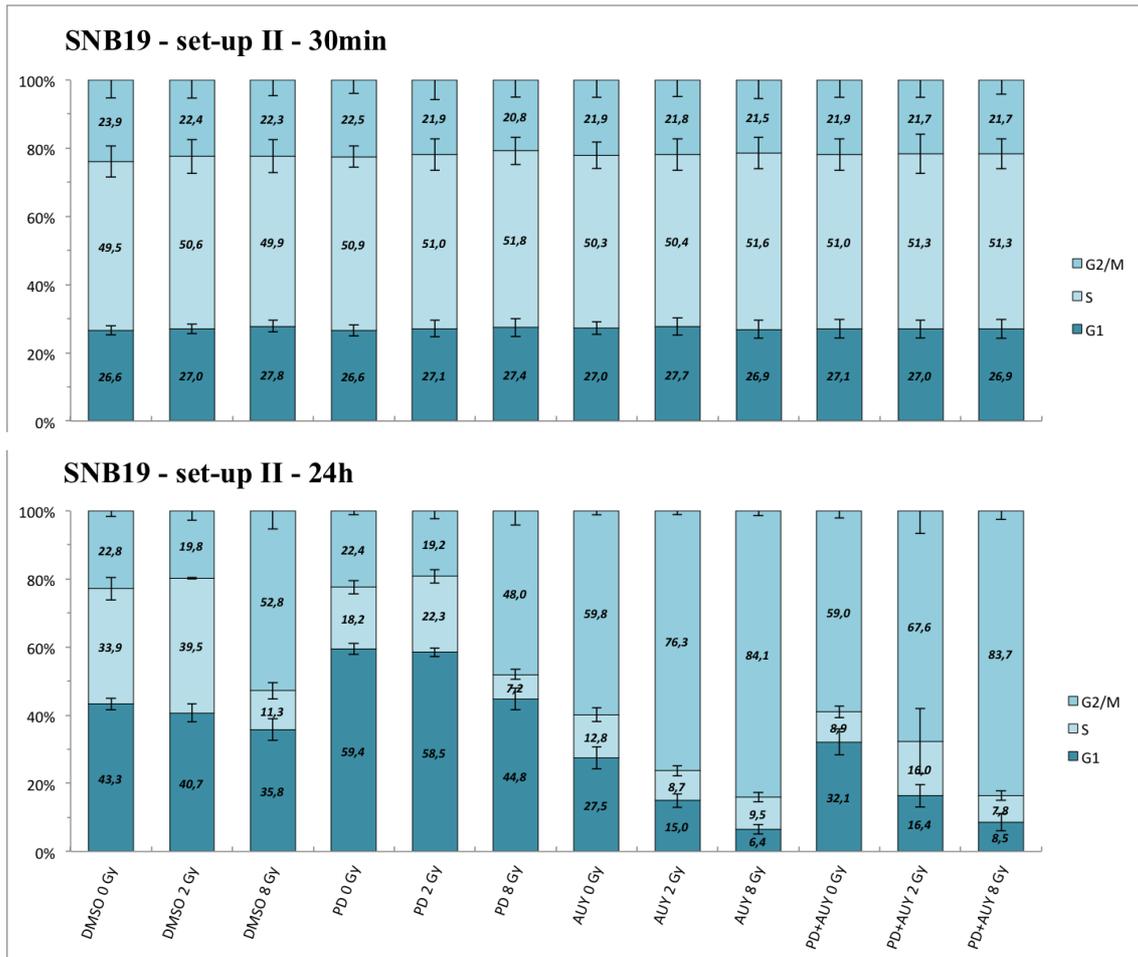


Abb. 4.18. Gemittelte Zellzyklus-Verteilung aus jeweils drei Versuchen mit der Zelllinie SNB19 unter Set-up II. Proben wurden nach dem Schema aus 2.2.5 erstellt und nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten (obere Hälfte) oder 24 Stunden (untere Hälfte) fixiert.

Unter Verwendung von AUY kam es zu einem ausgeprägten G2/M-Arrest, während die S-Phase stark vermindert war. Im Gegensatz zum gleichbleibenden Anteil der S-Phase nahm, mit steigender Dosis, die G1-Phase unter den Anteil der S-Phase ab und die G2/M-Phase bis auf über 80% zu. Die Behandlung mit der Kombination der Inhibitoren verursachte bei relativ gleichbleibendem Anteil der S-Phase eine Senkung des G1-Anteils von 32% bei 0 Gy auf 9% bei 8 Gy. Der Anteil der G2/M-Phase stieg durch die Kombination von AUY+PD von 57% (0 Gy) über 71% (2 Gy) auf 79% bei der Bestrahlungsdosis von 8 Gy an. Damit blieb bei kombinierter Behandlung mit AUY+PD der G2/M-Anteil immer etwas unter dem Anteil, der unter alleiniger AUY-Behandlung auftrat und andersherum blieb der G1-Anteil etwas über dem Anteil, der bei alleiniger Behandlung mit AUY auftrat.

5. Diskussion

Seit den 80er Jahren macht sich die Onkologie die Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie zunutze⁵⁶, dabei zeigt sich in vielen Tumorentitäten eine deutliche Überlegenheit der Radiochemotherapie gegenüber der alleinigen Radiotherapie⁵⁷. Die Effektivität der Radiochemotherapie hängt neben vielen weiteren Faktoren vom Behandlungszeitpunkt mit den Substanzen ab. Bei kombinierter Behandlung mit Gemcitabin und Gefitinib zeigt sich beispielsweise die Behandlung in dieser Reihenfolge effektiver bezüglich der Wachstumsinhibition als die Behandlung in umgedrehter Reihenfolge⁵⁷.

Diese Arbeit untersucht zwei verbundene Fragestellungen, (1) ob die Hochregulation von pERK und pAKT, die durch MEK-Inhibition ausgelöst wird, durch eine begleitende HSP90-Inhibition verhindert werden kann und (2) ob die MEK-Inhibition die Radiosensibilisierung durch den HSP90 Inhibitor NVP-AUY922 in zwei Tumorzelllinien, Lungenkarzinom A549 und Glioblastom SNB19, verstärken kann.

Um zu untersuchen, inwiefern der Behandlungs-/Bestrahlungsplan eine Rolle bei der Therapie von Tumoren spielt, sind in dieser Arbeit zwei Abläufe verglichen worden. Abhängig vom Behandlungsplan bedingte der MEK-Inhibitor PD184352 eine verstärkte Radiosensibilisierung durch NVP-AUY922 bei Behandlung der Glioblastom-Zelllinie SNB19 oder einen zytostatischen Effekt auf beide Zelllinien. Diese Effekte durch den MEK-Inhibitor zeigten sich bei Zugabe beider Inhibitoren zu SNB19-Zellen unmittelbar vor Bestrahlung mit anschließend weiterer 24 stündiger Inkubation (Set-up II, siehe Abbildung 5.1D). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Behandlung der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 mit dem gleichen Set-up (II) keinerlei strahlensensibilisierende Wirkung, weder durch die Zugabe der einzelnen Inhibitoren noch durch deren Kombination (Abbildung Abb. 5.1C).

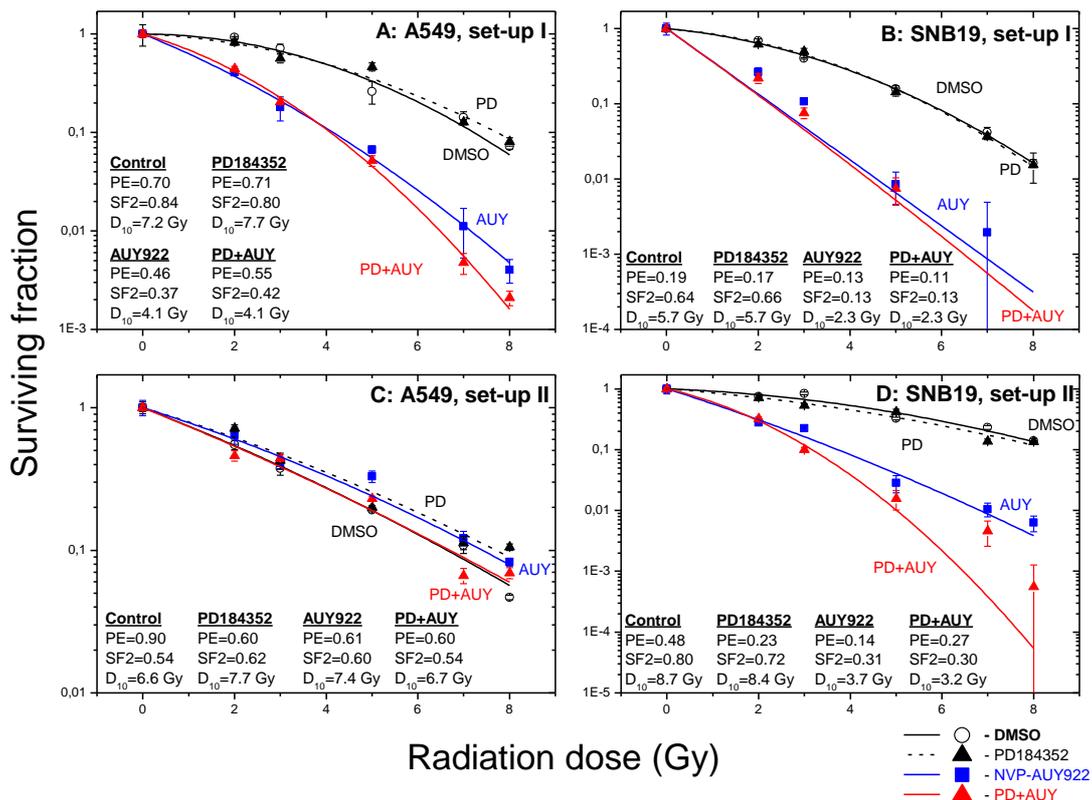


Abb. 5.1. Gegenüberstellung der klonogenen Überlebenskurven aus Set-up I und II. Überleben der Tumor-Zelllinien A549 (A, C) und SNB19 (B, D), die mit PD184352 und/oder NVP-AUY922 behandelt wurden. Die bestrahlten Zellen wurden bei Set-up I (A, B) sofort ausgesät, bei Set-up II (C, D) 24 Stunden nach Bestrahlung. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Versuch pro Zelllinie und Set-up. Die Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Versuchen gewonnen und nach dem linearquadratischen Modell angefitet. DMSO-Behandlung dient als Vehikel-Kontrolle. SD ist durch Balken gekennzeichnet.

Das Ausbleiben einer Radiosensibilisierung durch NVP-AUY922 in A549 Zellen unter diesem Behandlungsschema (Set-up II), obgleich es zu einer Depletion von pMEK1/2, pERK1/2 und pS6 kommt, wurde bereits in einer Publikation aus unserem Labor beschrieben⁴⁹. Gleichzeitig kommt es unter dieser Konstellation, beide Inhibitoren einzeln verwendet, zu einer Verminderung der PE-Werte um 30-50% im Vergleich zur Kontrolle, was eine zytostatische Wirkweise unter diesem Behandlungsschema aufzeigt. Zusätzlich zeigten auch Werte der SF2 und D₁₀, dass MEK-Inhibitor PD184352 unter Behandlungsschema Set-up II die NVP-AUY922 abhängige Radiosensibilisierung der Glioblastomzelllinie SNB19 signifikant verstärkt (s. Tabelle 7). Im Unterschied zu Set-up II äußerten sich bei einer Langzeitbehandlung mit MEK-Inhibitor PD184352 vor Bestrahlung, entsprechend Set-up I, weder zytostatischer Effekt noch eine Verstärkung der Radiosensibilisierung durch NVP-AUY922 (s. Abb. 5.1A, B).

Um den Hintergrund für diese in Abhängigkeit des Behandlungsplanes auftretende Radiosensibilisierung oder zytostatischen Effekte von PD184352 zu erörtern, untersuchten wir Expressionen einiger Schlüsselproteine der MAPK- und PI3K-Signalwege, Induktion und Reparatur von DNA-Schäden und Zellzyklusverteilungen. Die beobachteten Unterschiede in der Zellantwort auf die zwei verschiedenen Bestrahlungs-/Behandlungspläne dieser Arbeit können in einem vereinfachten Modell zusammengefasst werden (Abb. 5.2.). Das Modell berücksichtigt die Expression der Markerproteine des MAPK- und PI3K-Signalwegs, die sich abhängig von der Inkubationszeit mit dem Inhibitor vor Bestrahlung zeigten.

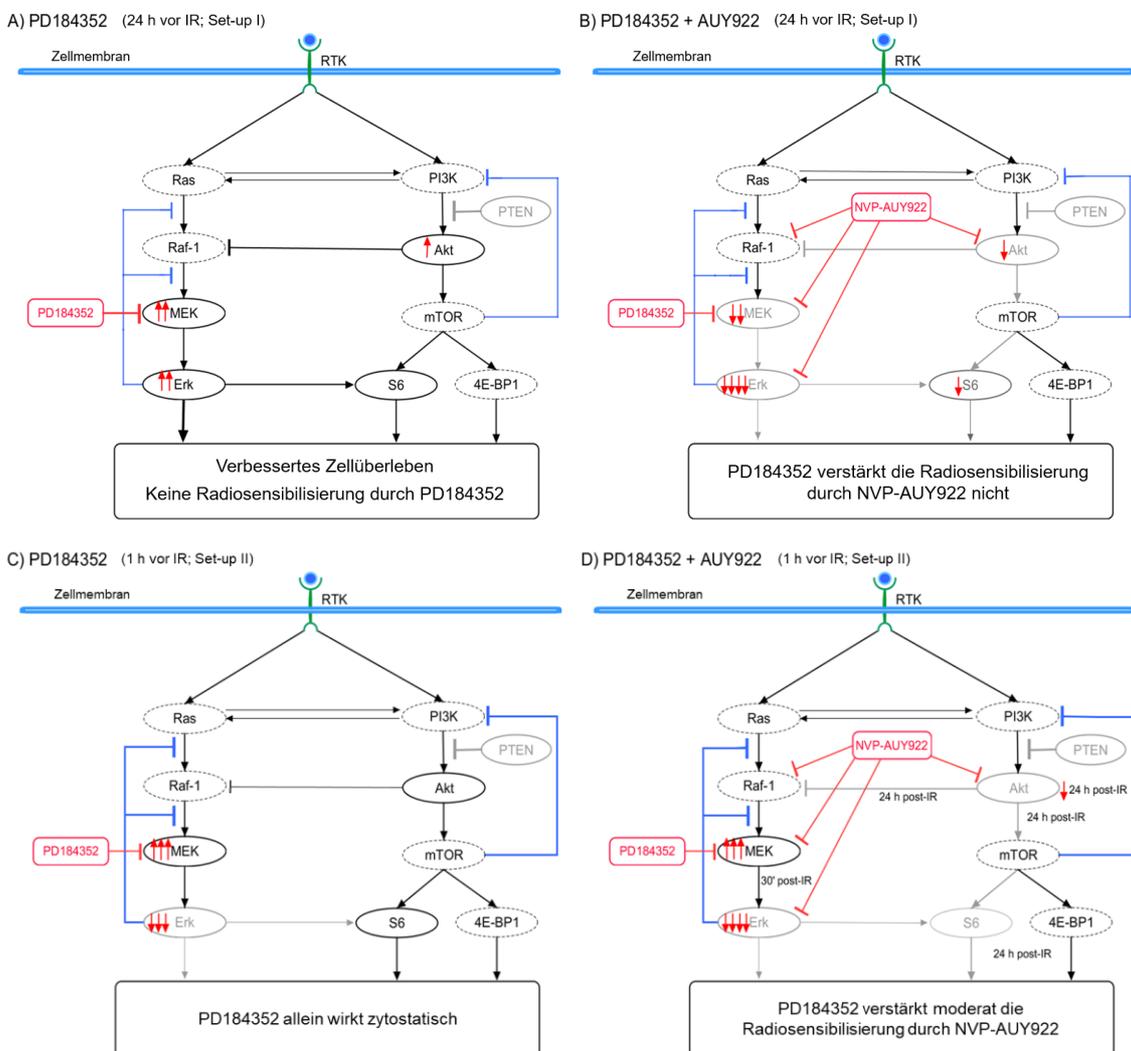


Abbildung 5.2. Vereinfachte Darstellung der Veränderungen innerhalb der Signalwege, die für die unterschiedlichen Antworten der Zelllinie SNB19 auf die verschiedenen Inhibitor-Konstellationen bei den beiden Behandlungsschemas verantwortlich sind. Inkubation der Zellen mit PD184352 24 h vor Bestrahlung ("IR") (A) führt zu einer Reaktivierung der MAPK- und PI3K-Signalwege zum Zeitpunkt der

Bestrahlung, wahrscheinlich aufgrund der Hemmung der negativen Rückkopplung, die typischerweise durch Protein S6 vermittelt wird. Langzeitinkubation mit PD184352 **(B)** erbrachte keine Erhöhung der Radiosensibilisierung durch NVP-AUY922. Die Kurzzeitinkubation (Set-up II) mit PD184352 **(C)** führte, während eine starke pMEK Hochregulation stattfand, zum Zeitpunkt der Bestrahlung zu einer pERK Depletion. Gleichzeitig kam es unter dieser Konstellation nicht zu einer Hochregulation der pAkt. Die Kurzzeitinkubation mit beiden Inhibitoren führte zu einer Verstärkung der Strahlensensibilisierung des HSP90 Inhibitors **(D)**. Größe der Proteinamen/Symbole und die Dicke der Linien zeigen Hoch- und Herunterregulation. Verändert aus Grabenbauer, F. et al., *Oncotarget* 2018;9(100):37379-37392 Figure 6 [CC BY 3.0]

Überraschenderweise führte die Langzeitinkubation mit PD184352 zu einer Hochregulation von pERK1/2 (s. Tabelle 16). Die Aktivierung von pERK1/2 weist auf eine Unterbrechung des negativen Rückkopplungsmechanismus, der für eine Herabregulation der MAPK-Signaltransduktion zuständig ist, hin, sodass eine paradoxe Reaktion in Richtung Zellüberleben stattfindet⁵⁸. Zusätzlich beobachteten wir unter MEK-Inhibition mit PD184352 in Set-up I eine Hochregulation der pAKT. Die aktivierte Form der AKT-Kinase ist bekannt als Schlüsselmediator des Zellüberlebens, indem sie die Apoptose über diverse Mechanismen hemmt⁵⁹, so beispielsweise das Aufrechterhalten der mitochondrialen Integrität, Phosphorylierung und Deaktivierung der proapoptotischen Mediatoren BAD, Caspase 9⁶⁰. BAD hält die Funktion von Bcl-2 und Bcl-xL aufrecht und hemmt die Apoptose überwiegend auf mitochondrialer Ebene mit Unterdrückung der Cytochrom-C Freisetzung⁶¹. Die Hochregulation der PI3K- und MAPK-Signalwege zum Zeitpunkt der Bestrahlung ist eine mögliche Ursache für die ausbleibende Radiosensibilisierung durch PD184352 unter Set-up I (Langzeitvorbehandlung, Abb. 5.1A, B) und das Ausbleiben eines erhöhten Zelltodes in Anwesenheit beider Substanzen verglichen mit der alleinigen NVP-AUY922 Behandlung.

Im Gegensatz zu Set-up I, der Kurzzeit-Vorbehandlung (1 h) mit PD184352, ergab die Behandlung unter Set-up II eine Depletion der phosphorylierten Form von ERK1/2 (s. Tabelle 28). Zusätzlich blieb die Hochregulation der pAKT aus, wenn die Zellen mit PD184352 allein oder kombiniert behandelt worden waren (s. Tabelle 22). Zusammenfassend zeigte Set-up II gegenüber Set-up I den Vorteil, dass die reaktive Hochregulation von pERK1/2 und pAKT in Anwesenheit von PD184352 verhindert wurde. Daher können beide Proteine als wichtige Marker der Strahlensensibilität angesehen werden.

Eine weitere kritische Determinante des strahlen-induzierten Zelltodes ist die Induktion und Reparatur von DNA-DSB, in dieser Arbeit gemessen anhand der Expression des Histons γ H2AX (s. Abb. 4.4.). Wir fanden heraus, dass die Kinetik der DNA-Schadensreparatur in den beiden Behandlungsprotokollen und den beiden Zelllinien maßgeblich voneinander abwich. In nach Set-up I mit PD184352 vorbehandelten Proben war der initiale DNA-Schaden sehr ähnlich dem DNA-Schaden der unbehandelten Probe und der DNA-Schaden hatte sich innerhalb von 24 Stunden repariert. Darüber hinaus war der DNA-Schaden in den Proben, die mit beiden Substanzen behandelt worden waren, deutlich niedriger als nach der Behandlung mit NVP-AUY922 allein. Im Kontrast dazu zeigte die Behandlung mit der Kombination der Inhibitoren unter Set-up II viele restliche DNA-Schäden bis zu 24 h nach Bestrahlung, die Menge an Schäden in SNB19-Zellen zeigte sich dabei vergleichbar hoch wie Schäden bei Behandlung mit NVP-AUY922 allein. Parallel erholten sich die DNA-Schäden der Proben der Zelllinie A549 bei kombinierter Inhibition fast auf Kontrollniveau.

Der Unterschied in den Strahlenantworten der behandelten Tumorzellen auf verschiedene Behandlungs-/Bestrahlungspläne kann auch teilweise in den Zellzyklusverteilungen gesehen werden. Nach Behandlung unter Set-up I, 24-stündige Behandlung mit Inhibitoren vor Bestrahlung, verblieben viele Zellen in der G1-Phase (s. Abb. 4.7., 4.9.), welche als strahlenresistenteste Phase der Zellzyklus gilt. Interessanterweise führte die kombinierte Inhibition unter Set-up II zu einem starken G2/M-Block 24 h nach Bestrahlung (s. Abb. 4.16., 4.18.). Da die beiden untersuchten Tumorzelllinien einen unterschiedlichen Mutationsstatus von *PTEN* und *p53* aufweisen (mut *PTEN* und mut *p53* in SNB19 vs. wt *PTEN* und wt *p53* in A549), können wir nicht darauf schließen, ob der strahlensensibilisierende Effekt durch PD184352 in Verbindung mit dem Mutationsstatus von *PTEN*- und *p53* steht. Zusätzlich weisen die Beiden Zelllinien einen unterschiedlichen *kRas*-Mutationsstatus auf (mut *kRas* in A549 vs. wt *kRas* SNB19). Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen mit anderen Zelllinien sinnvoll, um weitere Anwendungen der radiosensibilisierenden Wirkung von PD184352 in Kombination mit NVP-AUY922 zu erproben⁶³.

6. Zusammenfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die radiosensibilisierende Wirkung des MEK-Inhibitors PD184352 bei Kombination mit dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 an der Lungenkarzinomzelllinie A549 und Glioblastomzelllinie SNB19 und die vorbeschriebene Bedeutsamkeit verschiedener Behandlungszeitpläne zu untersuchen^{57,62}. Behandlung erfolgte nach zwei Zeitplänen, Set-up I und Set-up II, die sich in Dauer der Inkubation mit Inhibitor/en vor/nach Bestrahlung, sowie An- und Abwesenheit der Inhibitoren zum Zeitpunkt der Bestrahlung unterschieden (s. Abb. 2.1.). Angewandte Methoden waren Western Blot, Koloniebildungstest und FACS mit Untersuchung von DNA-Schäden/-Reparatur und Zellzyklusverteilung. Die kombinierte Anwendung der beiden Inhibitoren bewirkte eine erhöhte Radiosensibilität in SNB19-Tumorzellen, denen erst kurz vor Bestrahlung die MEK- und HSP90-Inhibitoren zugegeben wurden (= Set-up II). Das Kombinieren der Inhibitoren hemmte zelllinien-spezifisch proliferative Feedbackmechanismen, die bei getrennter Nutzung der Inhibitoren auftraten. So wurde eine reaktive Hochregulation der Signalproteine des PI3K-Weges (insb. pAKT) verhindert, sowie Proteine des MAPK-Weges (insb. pERK) herunterreguliert. 24 Stunden nach Bestrahlung zeigte sich, dass die kombinierte Inhibition einen starken Arrest der Zellen in der G2/M-Phase und eine verzögerte DNA-Schadensreparatur bewirkte. Eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit den Signalweginhibitoren PD184352 und NVP-AUY922 vor Bestrahlung (= Set-up I) vermochte nicht, die radiosensibilisierende Wirkung des HSP90-Inhibitors zu verstärken. Mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis sind die Hochregulation der MAPK- und PI3K-Signalwege, ein G1-Arrest während Strahlenexposition und beinahe unveränderte DNA-Schäden. Die alleinige Behandlung mit dem MEK-Inhibitor zeigte einen zytostatischen Effekt mit Auslösen eines starken G1-Arrests, eine radiosensibilisierende Wirkung blieb in allen hier untersuchten Modalitäten aus. Derzeit werden weitere MEK-Inhibitoren in Phase I und II Studien beforscht (www.clinicaltrials.gov). Unsere In-vitro-Daten unterstreichen die Tatsache, dass das therapeutische Fenster für die Behandlung mit MEK-Hemmern sorgfältig definiert werden muss und eine Kombination von verschiedenen Inhibitoren in Betracht gezogen werden sollte⁶³.

7. Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis

7.1 Literaturverzeichnis

1. World Health Organisation, Cancer Today. Trachea, bronchus and lung. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers> (zuletzt abgerufen am 01.01.2021).
2. Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Lungenkrebs/lungenkrebs_node.html (zuletzt abgerufen am 01.01.2021).
3. Herbst, R. S. et al. Molecular Origins of Cancer: Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **359**, 1367–1380 (2008).
4. Koh, P. K. et al. Targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC). Clinical developments and rationale for the combination with thoracic radiotherapy. *Cancer treatment reviews* **38**, 626–640 (2012).
5. Rieber, J. et al. Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) for Medically Inoperable Lung Metastases-A Pooled Analysis of the German Working Group "Stereotactic Radiotherapy". *Lung Cancer* **97**, 51-58 (2016).
6. Vansteenkiste, J. et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* **24 (Supplement 6)**, vi89-98 (2013).
7. Zhou, C. et al. BEYOND: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Phase III Study of First-Line Carboplatin/Paclitaxel Plus Bevacizumab or Placebo in Chinese Patients With Advanced or Recurrent Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **33**, 2197–2204 (2015).
8. Yang, J. C. et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6). Analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *The Lancet Oncology* **16**, 141–151 (2015).
9. Besse, B. et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer. Non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* **25**, 1475–1484 (2014).
10. Glas, M. et al. Zerebrale Tumoren - Gliome. *Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, ecomed MEDIZIN* (2007).
11. Stupp, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *Cancer/Radiothérapie* **9**, 196–197 (2005).
12. Drappatz, J. et al. Therapeutic strategies for inhibiting invasion in glioblastoma. *Expert Review of Neurotherapeutics* **9**, 519–534 (2009).
13. Hiddemann, W. et al. Die Onkologie: Teil 1. Abb. 8. 25. *Springer* (2010).
14. Kizaka-Kondoh, S. et al. Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Science* **94**, 1021–1028 (2003).
15. Pawlik, T. M. et al. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **59**, 928–942 (2004).

16. Herrmann, T. et al. *Klinische Strahlenbiologie: Kurz und bündig*, 20 ff. *Elsevier* (2006).
17. Hoegger H. et al. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 910–916 (2008).
18. Bretones, G. et al. Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1849**, 506–516 (2015).
19. Malumbres, M. et al. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* **30**, 630–641 (2005).
20. Daniel, P. *Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren* (2002).
21. Sudakin, V. et al. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Molecular Biology of the Cell* **6**, 185–197 (1995).
22. Yamaguchi, M. et al. Structure of an APC3-APC16 complex. Insights into assembly of the anaphase-promoting complex/cyclosome. *Journal of molecular biology* **427**, 1748–1764 (2015).
23. Lehman, J. A. et al. Integration of DNA damage and repair with murine double-minute 2 (Mdm2) in tumorigenesis. *International journal of molecular sciences* **13**, 16373–16386 (2012).
24. Lord, C. J. et al. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* **481**, 287–294 (2012).
25. Mocquet, V. et al. Sequential recruitment of the repair factors during NER: the role of XPG in initiating the resynthesis step. *EMBO Journal* **27**, 155–167 (2008).
26. Lopez-Contreras, A. J. et al. Signalling DNA Damage. *Intech* (2012). <https://www.intechopen.com/books/protein-phosphorylation-in-human-health/signalling-dna-damage> (zuletzt abgerufen am 01.01.2021).
27. Symington, L. S. et al. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual review of genetics* **45**, 247–271 (2011).
28. Schipler, A. et al. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic acids research* **41**, 7589–7605 (2013).
29. Clare, D. K. et al. ATP-driven molecular chaperone machines. *Biopolymers* **99**, 846–859 (2013).
30. Jhaveri, K. et al. Ganetespib: Research and clinical development. *OncoTargets and therapy* **8**, 1849–1858 (2015).
31. Zhang, H. et al. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *Journal of molecular medicine* **82**, 488–499 (2004).
32. Picard, D. HSP90 Interactors (zuletzt abgerufen am 01.01.2021). <https://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>.
33. Whitesell, L. et al. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature reviews. Cancer* **5**, 761–772 (2005).
34. Kampinga, H. H. et al. The HSP70 chaperone machinery. J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 579–592 (2010).
35. Jego, G. et al. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters* **332**, 275–285 (2013).

36. Neel, N. F. et al. The RalGEF-Ral Effector Signaling Network. The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery. *Genes & Cancer* **2**, 275–287 (2011).
37. Ji, H. et al. Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models. *Cancer Research* **67**, 4933–4939 (2007).
38. Castellano, E. et al. RAS Interaction with PI3K. More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & cancer* **2**, 261–274 (2011).
39. Beeram, M. et al. Raf: A strategic target for therapeutic development against cancer. *Journal of Clinical Oncology* **23** (27), 6771–6790 (2005).
40. Turke, A. B. et al. MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer Research* **72**, 3228–3237 (2012).
41. Friday, B. B. et al. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy. *Clinical Cancer Research* **14**, 342–346 (2008).
42. Roskoski, R. RAF protein-serine/threonine kinases. Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **399**, 313–317 (2010).
43. Jokinen, E. et al. MEK and PI3K inhibition in solid tumors: rationale and evidence to date. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* **7**, 170–180 (2015).
44. Samatar, A. A. et al. Targeting RAS-ERK signalling in cancer. Promises and challenges. *Nature Reviews. Drug Discovery* **13**, 928–942 (2014).
45. Mao, Z. et al. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair* **7**, 1765–1771 (2008).
46. Sebolt-Leopold, J. S. et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature Medicine* **5**, 810-6. (1999).
47. Ohren, J. F. et al. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**, 1192–1197 (2004).
48. Stingl, L. et al. Novel HSP90 inhibitors, NVP-AUY922 and NVP-BEP800, radiosensitise tumour cells through cell-cycle impairment, increased DNA damage and repair protraction. *British Journal of Cancer* **102**, 1578–1591 (2010).
49. Niewidok, N. et al. Hsp90 Inhibitors NVP-AUY922 and NVP-BEP800 May Exert a Significant Radiosensitization on Tumor Cells along with a Cell Type-Specific Cytotoxicity. *Translational Oncology* **5**, 356-IN16 (2012).
50. Dunn, G. P. et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes & Development* **26**, 756–784 (2012).
51. Davis, M. E. Glioblastoma. Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing* **20**, S2-8 (2016).
52. Brenner, D. J. The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction. *Seminars in Radiation Oncology* **18**, 234–239 (2008).
53. Kellerer, A. M. et al. The theory of dual radiation action. *Current Topics in Radiation Research*. **8**, 85–158. (1972).
54. Shaw, R. J. et al. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424–430 (2006).

55. Qin, X. et al. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell Cycle* **15**, 781–786 (2016).
56. Nyati, M.K. et al. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nature Reviews Cancer* **6**, 876–885 (2006).
57. Chun, P.Y. et al. Synergistic effects of gemcitabine and gefitinib in the treatment of head and neck carcinoma. *Cancer Research* **66**, 981–988 (2006).
58. Samatar, A.A. et al. Targeting RAS-ERK signalling in cancer. Promises and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* **13**, 928–942 (2014).
59. Marte, B. et al. PKB/Akt. Connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 355–358 (1997).
60. Elkholi, R. et al. Putting the pieces together. How is the mitochondrial pathway of apoptosis regulated in cancer and chemotherapy? *Cancer & Metabolism* **2**, 16 (2014).
61. Zhou, H. et al. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *The Journal of Cell Biology* **151**, 483–494 (2000).
62. Kuger, S. et al. Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. *Translational Oncology* **6**, 169–179 (2013).
63. Grabenbauer, F. et al. MEK-inhibitor PD184352 enhances the radiosensitizing effect of the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922: the role of cell type and drug-irradiation schedule. *Oncotarget* **9**, 37379-37392 (2018).

7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.2.1 Abbildungen

Abb. 2.1. Abbildung der mitochondrial vermittelten Apoptose als Antwort auf strahleninduzierten DNA-Schäden.....	10
Abb. 2.2. Darstellung des Zellüberlebens nach Bestrahlung, exemplarisch für die Unterschiede in der Strahlensensibilität abhängig von der jeweiligen Zellzyklusphase.	11
Abb. 2.3. Darstellung des Zyklus der Zellteilung.	12
Abb. 2.4. Darstellung der unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen von der Art des Insultes bis hin zu den für die Reparatur benötigten Proteinen	14
Abb. 2.5. Darstellung der Reparaturmechanismen, die für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zuständig sind.....	15
Abb. 2.6. Darstellung des Aufbaus von HSP90.....	17
Abb. 2.7. Darstellung der Interaktion zwischen MAPK- und PI3K-Signalweg.	18
Abb. 2.8. Abbildung der Signalkaskade des MAPK-Weges.	19
Abb. 2.9. Darstellung klonogener Überlebenskurven der Zelllinien A549 (links) und SNB19 (rechts)	20
Abb. 2.10. Darstellung der bei gemeinsamer HSP90-Inhibition und Bestrahlung auftretenden Interaktionen in den Signalwegen der Zelllinien A549 (A) und SNB19 (B).....	21
Abb. 3.1. Übersicht über den Ablauf der beiden Set-ups.	30
Abb. 4.1. Klonogene Überlebenskurven nach Set-up I.....	39
Abb. 4.2. γ H2AX-Verteilung der mit DMSO und Inhibitor behandelten A549 Proben eines repräsentativen Versuchs unter Set-up I.	52
Abb. 4.3. γ H2AX-Verteilung der mit DMSO und Inhibitor behandelten SNB19-Proben eines repräsentativen Versuchs unter Set-up I.	53
Abb. 4.4. Normierte Darstellung der γ H2AX-Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Versuchen unter Set-up I.	54
Abb. 4.5. Verbildlichung der relativen Menge nicht reparierter DNA-Schäden unter Set-up I.	55
Abb. 4.6. Zellzyklus-Verteilung aus einem repräsentativen Versuch nach Set-up I mit der Zelllinie A549, dargestellt in Histogrammen.	56
Abb. 4.7. Gemittelte Zellzyklus-Verteilung aus jeweils drei Versuchen mit der Zelllinie A549 unter Set-up I.....	57
Abb. 4.8. Zellzyklus-Verteilung aus einem repräsentativen Versuch nach Set-up I mit der Zelllinie SNB19, dargestellt in Histogrammen.	59

Abb. 4.9. Gemittelte Zellzyklus-Verteilung aus jeweils drei Versuchen mit der Zelllinie SNB19. unter Set-up I.....	60
Abb. 4.10. Klonogene Überlebenskurven nach Set-up II.....	62
Abb. 4.11. γ H2AX-Verteilung der mit DMSO und Inhibitor behandelten A549-Proben eines repräsentativen Versuchs unter Set-up II.	77
Abb. 4.12. γ H2AX-Verteilung der mit DMSO und Inhibitor behandelten SNB19 Proben eines repräsentativen Versuchs unter Set-up II.	78
Abb. 4.13. Normierte Darstellung der γ H2AX-Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Versuchen unter Set-up II.	78
Abb. 4.14. Verbildlichung der relativen Menge nicht reparierter DNA-Schäden mit direkter Gegenüberstellung aller Modalitäten.....	79
Abb. 4.15. Zellzyklus-Verteilung aus einem repräsentativen Versuch nach Set-up II mit der Zelllinie A549, dargestellt in Histogrammen.	81
Abb. 4.16. Gemittelte Zellzyklus-Verteilung aus jeweils drei Versuchen mit der Zelllinie A549 unter Set-up II.....	82
Abb. 4.17. Zellzyklus-Verteilung aus einem repräsentativen Versuch nach Set-up II mit der Zelllinie SNB19, dargestellt in Histogrammen.	84
Abb. 4.18. Gemittelte Zellzyklus-Verteilung aus jeweils drei Versuchen mit der Zelllinie SNB19 unter Set-up II.....	85
Abb. 5.1. Gegenüberstellung der klonogenen Überlebenskurven aus Set-up I und II.....	87
Abb. 5.2. Vereinfachte Darstellung der Veränderungen innerhalb der Signalwege, die für die unterschiedlichen Antworten der Zelllinie SNB19 auf die verschiedenen Inhibitor-Konstellationen bei den beiden Behandlungsschemas verantwortlich sind.....	88

7.2.2 Tabellen

Tabelle 1 Verbildlichung des genetischen Status der Zelllinien A549 und SNB19 in ausgewählten Tumorsuppressorgenen.....	24
Tabelle 2 Darstellung der pro Petrischale ausgesäten Zellen für die Zelllinie A549 (linke Zahl) und SNB19 (rechte Zahl).	31
Tabelle 3 Exemplarisch für die Auswertung eines Kolonietests die Darstellung von sechs Petrischalen.	32
Tabelle 4 Beladungsmuster der Gele.	34
Tabelle 5 Informationen zu den primären Antikörpern.....	35-36
Tabelle 6 Veranschaulichung der erstellten Proben.	37
Tabelle 7 Mittelwerte (\pm SE) aus vier unabhängigen Koloniebildungstests, Zellen wurden entsprechend Set-up I 24 h lang vor Bestrahlung mit den Inhibitoren behandelt.	40
Tabelle 8 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von HSP90/70 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	41
Tabelle 9 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von PI3K p110 α in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	42
Tabelle 10 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pAkt in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	43
Tabelle 11 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pmTOR in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	44
Tabelle 12 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pS6 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	45
Tabelle 13 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von p4E-BP1 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	46
Tabelle 14 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Raf-1 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	47
Tabelle 15 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pMEK1/2 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	48
Tabelle 16 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pERK1/2 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	49

Tabelle 17 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Rad51 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	50
Tabelle 18 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Ku70 und Ku80 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up I.	51
Tabelle 19 Mittelwerte (\pm SE) aus drei unabhängigen Koloniebildungstests, Zellen wurden entsprechend Set-up II ab 1 h vor Bestrahlung 24 h mit den Inhibitoren behandelt.	63
Tabelle 20 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von HSP70/90 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	64
Tabelle 21 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von PI3K p110 α in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	66
Tabelle 22 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pAkt in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	67
Tabelle 23 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pmTOR in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	68
Tabelle 24 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pS6 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	69
Tabelle 25 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von p4E-BP1 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	70
Tabelle 26 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Raf-1 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	71
Tabelle 27 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pMEK1/2 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	72
Tabelle 28 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von pERK in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	73
Tabelle 29 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Rad51 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	74
Tabelle 30 Repräsentative Detektionen der Western Blot Untersuchung von Ku70/Ku80 in Zelllinien A549 und SNB19, 30 Minuten und 24 h nach Bestrahlung, Set-up II.	75

8. Publikationsliste

8.1. Wissenschaftliche Publikationen

Grabenbauer, F. et al. MEK-inhibitor PD184352 enhances the radiosensitizing effect of the Hsp90 inhibitor NVP-AUY922: the role of cell type and drug-irradiation schedule. *Oncotarget* **9**, 37379-37392 (2018).

8.2 Wissenschaftliche Poster

Grabenbauer, F. et al. Radiation response of tumor cell lines after combined MEK and HSP90 inhibition by PD184352 and NVP-AUY922: the role of drug-irradiation schedule, Kongressbeitrag DEGRO 2015, Hamburg.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Radiosensibilisierung humaner Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten durch den MEK-Inhibitor PD184352 allein oder in Kombination mit dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY922: Einfluss der Behandlungsschemas**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Würzburg, den _____

Felix Grabenbauer

Danksagung

Der größte Dank gebührt Herrn Professor Dr. M. Flentje, der es für mich ermöglichte, einen ersten Fuß in das wissenschaftliche Arbeiten zu setzen und ein gesamtes Jahr im Würzburger Labor für Strahlenbiologie Forschung zu betreiben.

Frau Professor Dr. T. Djuzenova danke ich sehr für die rege Betreuung und die vielen freundlichen Gespräche, die mir stets eine willkommene Anregung waren. Der Baustein der Betreuung war mir ein sehr wichtiger und hilfreicher.

Einen weiteren Dank möchte ich Frau Professor Dr. H. Stopper aussprechen. Ich danke Ihnen sehr, dass Sie sich dazu bereiterklärt haben, das Korreferat zu übernehmen und Ihre Zeit dafür aufbringen.

Ein besonderes Dankeschön gilt Astrid Katzer, die mich mit größter Geduld anlernte und mir uneingeschränkt eine immens wertvolle, verlässliche Hilfe war. Dir danke ich sehr herzlich für die viele Zeit, Arbeit und auch Freude.

Da es der Stunden im Labor viele gab, genoss ich nette Worte und Gespräche mit dem Team des Strahlenlabors und danke Vanessa Fiedler, Susanne Hartmann, Gisela Wohlleben, Caren Zöller und Fábio Ferreira.

Meiner Familie danke ich für diverse Karotten am Stiel und immer offene Kanäle, die es vermochten, Zielstrebigkeit zu beflügeln. Nichtsdestoweniger verlorene Worte waren doch nie verloren.