

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie
der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
des Onkologischen Zentrums

Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit von normalen humanen Fibroblasten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Johanna Heyde
aus Hamburg

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03. November 2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Cordula Petersen

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. B. Brandt

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG.....	5
2. EINLEITUNG	6
2.1. Strahlenfolgen am Normalgewebe	7
2.2. Nebenwirkung nach EGFR-Inhibition	8
2.3. Molekulare Mechanismen der Zellinaktivierung durch Bestrahlung	8
2.3.1. Mitotischer Zelltod	8
2.3.2. G1-Arrest	9
2.3.3. Apoptose	10
2.4. Molekulare Mechanismen der Zellinaktivierung durch EGFR-Inhibition	10
3. MATERIAL UND METHODEN	12
3.1. Zellkultur	12
3.2. Wachstumskurven	12
3.3. Inhibitoren	13
3.4. Bestrahlung	13
3.5. Bestimmung des G1-Arrestes	13
3.5.1. Fixierung	13
3.5.2. BrdU-Färbung	14
3.5.3. Flusszytometrie	15
3.5.4. Auswertung	16
3.6. H2AX- Foci-Präparation	16
3.7. Kolonietest	17
4. ERGEBNISSE	19
4.1. Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Zellproliferation	19
4.2. Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Zellzykluskinetik	20
4.3. Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Doppelstrangbruchreparatur	25
4.4. Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit	28
4.4.1. Einfluss einer BIBX-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit	29
4.4.2. Einfluss einer C225-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit	30
5. DISKUSSION	31
5.1. Generelle Frage	31
5.2. Zellwachstum	31
5.3. Zellzyklus	33
5.4. Doppelstrangbruchreparatur	38
5.5. Zellinaktivierung	39

5.6. Generelle Einordnung und Ausblick	40
6. ZUSAMMENFASSUNG	42
7. LITERATURVERZEICHNIS	43
8. DANKSAGUNG	49
9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	50

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Bei einer strahlentherapeutischen Behandlung von Tumoren werden zunehmend Kombinationstherapien eingesetzt. Dabei werden insbesondere große Hoffnungen auf Inhibitoren des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) gesetzt. Erste klinische Studien mit Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ergaben für eine kombinierte Behandlung mit Bestrahlung und EGFR-Inhibitoren einen deutlichen Anstieg der Heilungsrate.

Neben der Steigerung der Tumorkontrolle müssen aber auch immer die Effekte auf das Normalgewebe berücksichtigt werden. Nach der kombinierten Behandlung mit Bestrahlung und EGFR-Inhibitoren zeigt sich allerdings ebenfalls eine deutliche Zunahme der Nebenwirkungen. Die molekularen Ursachen hierfür sind noch weitgehend unbekannt.

Die vorliegende Arbeit untersucht, welche zelluläre Wirkung EGFR-Inhibitoren auf Normalzellen haben. Die Experimente wurden mit normalen humanen Fibroblasten durchgeführt, da diese als die wichtigsten Stützzellen der meisten Normalgewebe gelten. Dabei wurde sowohl die alleinige Wirkung dieser Inhibitoren als auch deren Wirkung in Kombination mit einer Bestrahlung untersucht. Zur Inhibition des EGFR wurde zum einen der monoklonale Antikörper Cetuximab (C225) sowie zum anderen der spezifische Hemmstoff BIBX verwendet, welcher auf die Tyrosinkinase des EGFR wirkt. Als primärer Endpunkt wurde das Zellüberleben bestimmt. Zusätzlich wurde die Wirkung auf die Proliferation und den permanenten G1-Arrest sowie die DNA-Doppelstrangbruchreparatur gemessen, womit die beiden entscheidenden Wege untersucht werden, die letztendlich das Zellüberleben von Fibroblasten bestimmen.

Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie wirkt sich eine EGFR-Inhibition auf die Proliferation aus?
2. Führt eine EGFR-Inhibition bei unbestrahlten Zellen zu einem permanenten G1-Arrest?
3. Welchen Einfluss hat eine EGFR-Inhibition auf den strahleninduzierten permanenten G1-Arrest?
4. Welchen Einfluss hat eine EGFR-Inhibition auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche?
5. Wie wirkt sich eine EGFR-Inhibition auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit aus?

2. EINLEITUNG

Die Strahlentherapie gehört in der Medizin neben der operativen Behandlung und der Chemotherapie zu den drei Säulen der etablierten therapeutischen Maßnahmen zur Behandlung von Tumorerkrankungen (Leischner 2007; Wannemacher et al. 2006).

Bei der konventionellen Strahlentherapie über sechs Wochen wird der Tumor fraktioniert mit Einzeldosen zwischen 1,8 und 2 Gy bestrahlt, wobei die Wochenenden ausgespart werden, so dass insgesamt eine Gesamtdosis von 54 bis 60 Gy erreicht wird. Um die Heilungsrate weiter zu steigern, werden zunehmend Modifikationen dieses Protokolls eingeführt. Eine Strategie ist es, die Strahlentherapie mit anderen Behandlungen wie der Chemotherapie zu kombinieren. Hierbei gewinnen neben den klassischen Chemotherapeutika zunehmend Substanzen an Bedeutung, die spezifisch in die besonderen Signal(transduktions)wege der Tumorzellen eingreifen (Krause et al. 2007).

Zu den neuen Therapieoptionen gehört der Einsatz von Inhibitoren der Wachstumsrezeptoren wie des EGF-Rezeptors („epidermal growth factor receptor“, EGFR) (Baumann et al. 2007). Dieser Rezeptor ist bei vielen Tumoren überexprimiert oder überaktiv (Dei Tos und Ellis 2005). Klinisch eingesetzte Substanzen sind z.B. Cetuximab bei kolorektalen Karzinomen und Hals- und Kopftumoren, sowie Gefitinib oder Erlotinib bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom. Aktuell ist eine kombinierte Strahlentherapie mit Gabe von Cetuximab bei lokal fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches indiziert. Die dazugehörige Phase-III-Studie zeigt für die Kombinationsbehandlung gegenüber alleiniger Bestrahlung sowohl einen Vorteil in der lokalregionalen Tumorkontrolle, als auch im Überleben der Patienten. Nebenwirkungen der Cetuximab-Behandlung traten zwar auf, aber ohne die radiogenen Nebenwirkungen zu verstärken (Bonner et al. 2006; Bonner et al. 2009).

Die Grundlage für diese neue Therapieform wurde mit zahlreichen experimentellen und präklinischen Untersuchungen geschaffen. Sowohl für Untersuchungen an Zellkulturen als auch an präklinischen Studien mit Xenografts zeigte sich nach EGFR-Inhibition eine ausgeprägte Wachstumshemmung. Von großer Bedeutung war vor allem die Beobachtung, dass für einzelne Tumorzelllinien durch eine EGFR-Inhibition eine Steigerung der Strahlenempfindlichkeit erreicht werden konnte (Baumann et al. 2007). Allerdings zeigte sich schnell, dass die Sensibilisierung nicht bei allen Tumorzelllinien

zu erreichen ist. So wurde für die Hemmung des EGFR mittels eines Tyrosinkinaseinhibitors gezeigt, dass eine Strahlensensibilisierung nur für Tumorzelllinien mit einer Mutation im KRAS-Gen möglich ist (Toulany et al. 2006).

Der Erfolg einer Tumorthherapie wird auch immer durch die Wirkung auf das Normalgewebe bestimmt, die natürlich nicht zu hoch ausfallen darf, so dass bei einer erfolgreichen Behandlung des Tumors der Patient eine ausreichende Lebensqualität behält. Für die Strahlentherapie bedeutet dies, dass die maximal einsetzbare Strahlendosis immer auch durch die Dosis bestimmt wird, welche für das ebenfalls bestrahlte Normalgewebe gerade noch tolerabel ist.

Es besteht die Hoffnung, mit Hilfe der neuen Kombinationstherapien dieses sogenannte Therapiefenster weiter zu öffnen, d.h. eine Steigerung der Tumorzellaktivierung zu erreichen, ohne das Normalgewebe weiter zu schädigen. Daher gilt es, ein erhöhtes Nebenwirkungspotenzial bei den neuen Kombinationsbehandlungen mit EGFR-Inhibitoren auszuschließen. Potentiell kann die Behandlung auch bei den Normalgeweben zu einer erhöhten Schädigung führen, da die EGF-Reptoren auch in normalen Zellen wie z.B. der Haut exprimiert werden. Es ist deshalb wichtig, nicht nur Tumorzellen sondern auch Normalgewebe auf eine Strahlensensibilisierung zu untersuchen, da solch eine Sensibilisierung möglicherweise klinisch mit einer erhöhten Nebenwirkungsrate einhergehen könnte. Das Ziel dieser experimentellen Arbeit war es daher, die Wirkung von EGFR-Inhibitoren auf die Strahlenreaktion von normalen humanen Fibroblasten zu bestimmen, welche als die wichtigsten Stützzellen der meisten Organe gelten.

2.1. Strahlenfolgen am Normalgewebe

Bei einer strahlentherapeutischen Behandlung von Tumoren wird aufgrund des zeitlichen Verlaufs zwischen einer frühen und einer späten Normalgewebsreaktion unterschieden (Herrmann et al. 2006; Wannemacher et al. 2006). Die zeitliche Grenze liegt bei 90 Tagen nach Bestrahlungsbeginn. Frühe Strahlenreaktionen sind zum Beispiel die radiogene Mukositis, Knochenmarksnekrosen, Zytopenien, Erytheme oder eine Dermatitis (Herrmann et al. 2006). Sie verlaufen in der Regel reversibel. Eine Strahlenmyelopathie, die radiogene Lungenfibrose, Linsentrübung und Teleangiektasien der Haut sind dagegen typische Spätschäden (Herrmann et al. 2006). Die Fibrose entsteht als Folge einer Bindegewebsvermehrung in der Lunge und kann ebenfalls an

inneren Organen oder der Haut auftreten. Sie ist irreversibel und progredient und daher dosislimitierend (Herrmann et al. 2006).

2.2. Nebenwirkung nach EGFR-Inhibition

Reaktionen des Normalgewebes sind nach dem klinischen Einsatz von EGFR-Inhibitoren bereits beschrieben worden. Als Akutreaktion wurden insbesondere dermatologische Nebenwirkungen beschrieben. Bei 60-80% der mit Cetuximab behandelten Patienten trat ab der ersten Woche ein akneartiger, abakterieller Ausschlag auf, der reversibel war und in den meisten Fällen nach vier Wochen abklang (Agero et al. 2006; Li und Perez-Soler 2009). Ebenfalls trat eine schwere aknoide Hautveränderung in einer Kasuistik eines Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom nach Behandlung mit Cetuximab auf (Kowalzik et al. 2004). Bei der Behandlung von Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) wurden neben den genannten dermatologischen Nebenwirkungen auch Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen erfasst (Herbst et al. 2003).

2.3. Molekulare Mechanismen der Zellinaktivierung durch Bestrahlung

Um die Wirkung einer Bestrahlung auf die Tumorzellen, aber auch auf die Normalzellen abzuschätzen, ist es wichtig, die zellulären Mechanismen der Zellinaktivierung durch Bestrahlung zu verstehen.

Bei einer Bestrahlung von Zellen gibt es potentiell drei verschiedene Wege der Inaktivierung: Den mitotischen Zelltod, die terminale Differenzierung und die strahleninduzierte Apoptose (Dikomey et al. 2003).

2.3.1. Mitotischer Zelltod

Eine Behandlung von Säugerzellen mit ionisierenden Strahlen führt zu einer Vielzahl an DNA-Schäden (Goodhead 1994). Dies sind vor allem Einzelstrangbrüche und Basenschäden sowie DNA-Doppelstrangbrüche. Der überwiegende Teil dieser DNA-Schäden kann über zelleigene Reparaturmechanismen erkannt und repariert werden. Allerdings besteht insbesondere für Doppelstrangbrüche das Risiko, dass einige wenige dieser Schäden falsch oder nicht repariert werden. Aus den Schäden können sich in proliferierenden Zellen letale Chromosomenaberrationen, wie die terminale oder interstitielle Deletion oder das dizentrische Chromosom entwickeln, die letztendlich

zum irreversiblen Verlust der Teilungsfähigkeit führen und in der Regel letal für die Zelle sind (Borgmann et al. 2004; Dikomey et al. 1998; Kasten-Pisula et al. 2005).

2.3.2. G1-Arrest

Eine Bestrahlung kann bei Säugerzellen unabhängig davon zu einem Arrest in einer Zellzyklusphase führen. Hierbei wird zwischen einem transienten und einem permanenten Arrest unterschieden. Es wird angenommen, dass der transiente Arrest dazu dient, die geschädigte DNA zu reparieren, bevor die Zelle anschließend wieder in die S-Phase eintreten kann (Kastan et al. 1991; Lane 1992), während der permanente Arrest eine irreversible Selektion der Zelle zum Ziel hat.

Ein permanenter Arrest ist nach Bestrahlung, insbesondere für die G1-Phase, bekannt und bei Fibroblasten besonders ausgeprägt (Di Leonardo et al. 1994). Der Arrest führt zu einer dauerhaften Arretierung der Zellen in der G1-Phase und stellt damit für Fibroblasten einen eigenständigen Inaktivierungsweg nach Bestrahlung dar. Es wurde untersucht, dass bei Fibroblasten nach Bestrahlung mit 3,5 Gy die eine Hälfte der Zellinaktivierung auf den G1-Arrest zurückzuführen ist, während für die andere Hälfte letale Chromosomenaberrationen verantwortlich sind (Borgmann et al. 2004).

Der molekulare Mechanismus des strahleninduzierten G1-Arrestes ist teilweise bekannt: Durch zahlreiche Stressoren, u.a. Strahlung, entstehen DNA-Schäden, an denen das Protein p53 gebunden wird. Dadurch verlängert sich die Halbwertszeit des p53 und die Bildung von weiteren Proteinen wird induziert. Das Protein p53 induziert die Synthese von p21, indem es als Transkriptionsfaktor fungiert. Dieses Protein ist wiederum essentiell für die Ausbildung des G1-Arrestes (Azzam et al. 2000), da es die Komplexe aus Cyclin E und cyclinabhängiger Kinase Cdk2 bindet und so die vollständige Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) verhindert. Erst wenn das Rb-Protein ausreichend phosphoryliert ist, wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt, der wiederum wichtige Enzyme induziert, die unerlässlich für den Eintritt der Zelle in die S-Phase sind (Wagener und Müller 2009). Wird die Phosphorylierung des Rb unterbunden und kein E2F freigesetzt, kommt es zu einem Arrest in der G1-Phase. Wird die Phosphorylierung dauerhaft unterdrückt, kann ein permanenter G1-Arrest entstehen. Für die Stabilisierung des permanenten G1-Arrestes scheint zusätzlich p27 von Bedeutung zu sein (Coffman und Studzinski 1999).

Es wird angenommen, dass der permanente G1-Arrest ein essentieller Schritt bei der

Einleitung einer terminalen Differenzierung bei Fibroblasten ist, da die Fibroblasten aus der G1-Phase in die G0-Phase und von dort irreversibel den Weg der Differenzierung antreten (Rodemann und Bamberg 1995). Dieser strahleninduzierten terminalen Differenzierung der Fibroblasten wird bei der Entstehung der Fibrose nach Bestrahlung eine wichtige Rolle zugeschrieben (Rodemann und Bamberg 1995).

2.3.3. Apoptose

Nach Bestrahlung kann es, vermittelt über p53, zur Initiierung eines programmierten Zelltodes (Apoptose) kommen (Kim et al. 2006). Diese Form der Zellinaktivierung ist allerdings nur bei hämatopoetischen Zellen wie beispielsweise den Lymphozyten von Bedeutung, wohingegen sie bei humanen Fibroblasten als primärer Zelltod nicht vorkommt (Dewey et al. 1995), sondern nur beim Abbau von ausdifferenzierten Fibroblasten am Ende ihrer Lebensspanne auftritt (Bayreuther et al. 1992).

2.4. Molekulare Mechanismen der Zellinaktivierung durch EGFR-Inhibition

In den letzten Jahren konnten erhebliche Kenntnisse über die Wirkung des epidermalen Wachstumsfaktors EGF erarbeitet werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, wie sich eine Blockierung des entsprechenden Rezeptors EGFR auswirken würde.

Der EGF-Rezeptor ist ein Wachstumsrezeptor, der eine extrazelluläre Bindungsstelle für Liganden und intrazellulär eine Tyrosinkinaseaktivität aufweist (Abb. 1). Nach Bindung des natürlichen Liganden EGF („epidermal growth factor“) oder anderer spezifischer Liganden wie TGF α („tumor growth factor α “) oder Amphiregulin kommt es zur Konformationsänderung und Dimerisierung des Rezeptors (Abb. 1). Die induzierte Nähe der Kinasedomänen führt zur Autophosphorylierung der Tyrosinkinase (Harari et al. 2007; Wagener und Müller 2009; Weinberg 2007). Über die Tyrosinkinaseaktivität wird die Expression einer Reihe von Faktoren veranlasst, was einerseits über den PI3K-Akt-Bad-Signalweg die Apoptose reguliert, andererseits über PI3K-Akt-GSK3- β und Ras-Raf-MAPK auf Cyclin D einwirkt und damit die Proliferation reguliert. Neben diesen Hauptwegen der EGFR-Signalkaskade gibt es weitere Wege sowie zahlreiche Querverbindungen ("cross talks") (Abb. 1). Beide Wege scheinen ebenfalls an der Regulation der DNA-Reparatur beteiligt zu sein (Golding et al. 2009; Toulany et al. 2006).

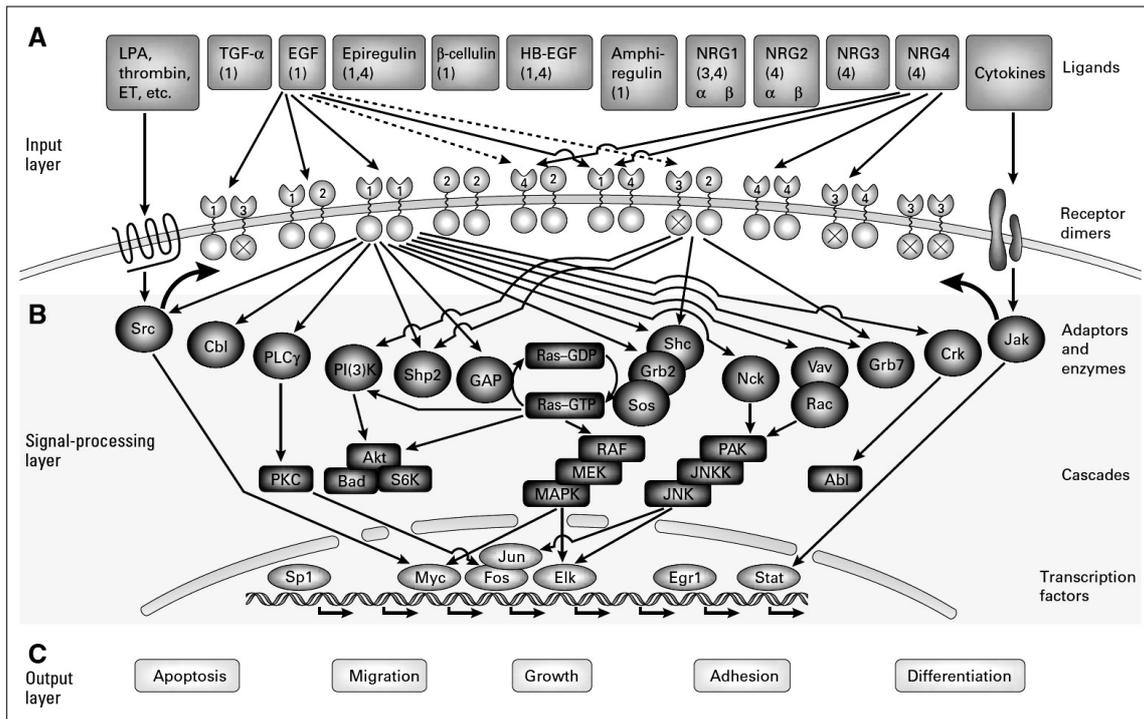


Abb. 1: Netzwerk der EGFR-abhängigen Signaltransduktionswege (Harari et al. 2007). A) EGFR-aktivierende Liganden; B) EGFR-ausgelöste Signalwege; C) EGFR-abhängige zelluläre Funktionen.

Eine Hemmung des EGF-Rezeptors kann über die genannten Signalwege die Proliferation der Zellen unterdrücken oder die Apoptose einleiten. Diese Eigenschaft wird zunehmend in der Onkologie zur Behandlung von Tumoren genutzt. Zur Hemmung der EGFR-Signalkaskade werden spezifische Antikörper wie Cetuximab (C225) oder spezifische Inhibitoren der Tyrosinkinase wie Gefitinib eingesetzt. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren sind niedermolekulare, membrangängige Substanzen, die intrazellulär die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase verhindern (Krause et al. 2007).

Die hier dargestellten Erkenntnisse über die Wirkung einer EGFR-Hemmung zeigen, dass sich diese Effekte nicht nur bei Tumorzellen auswirken, sondern auch bei normalen humanen Zellen. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, die Wirkung einer EGFR-Inhibition an normalen humanen Fibroblasten zu untersuchen. Dies sollte sowohl die alleinige Wirkung der EGFR-Inhibition als auch deren Wirkung in Kombination mit einer Bestrahlung beinhalten.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Zellkultur

Die Versuche wurden mit humanen Fibroblasten durchgeführt. Die Linie F124 wurde aus Biopsien kindlicher Vorhaut in der Dermatologie des Universitätsklinikums Hamburg gewonnen und für diese Versuche freundlicherweise zur Verfügung gestellt. (Pia Houdek TA, Zellbiologisches Labor, Hautklinik, Universitätsklinikum Eppendorf)

Die Anzucht der Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen mit Grundflächen von 25cm², 75cm² oder 175cm² (Sarstedt, Nümbrecht). Als Nährmedium fungierte 5ml, 15ml bzw. 35ml DMEM-Flüssigmedium (Gibco, Paisley, UK), welches 10% fetales Kälberserum (Biochrom 0513K Superior, Biochrom, Berlin), 2% L-Glutamin (Gibco, Paisley, UK) und 1% Antibiotikum PenStrep (Gibco, Paisley, UK) enthielt. Proliferation und Verbleib der Zellkultur bis zur Versuchsdurchführung erfolgten in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 10% CO₂. Die Zellen wurden einmal in der Woche umgesetzt. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erfolgte durch sogenanntes „Abtrypsinieren“. Nach Absaugen des Mediums wurde Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco; 0,5% Trypsin, 0,02% EDTA in Hank´s gepufferter Salzlösung, 0,2ml Lösung pro cm² Flaschenboden) zugegeben und nach einer Minute wieder abgesaugt. Anschließend wurden die Flaschen zur Intensivierung des Trypsins zwei Minuten im Wärmeschrank bei 37°C gehalten und nach der „Abkugelung“ der Zellen (sichtbar unter dem Mikroskop) in serumhaltigem Medium abgespült und in Suspension aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Coulter Counter, Coulter Electronics, Luton, UK).

3.2. Wachstumskurven

Für die Erstellung der Wachstumskurven wurden je nach Anzahl gewünschter Messpunkte jeweils zwei 25cm² Flaschen pro Messzeitpunkt und Zusatzsubstanz (BIBX oder C225 s.u.) mit 100.000 Zellen und 5ml Medium angesetzt. Es wurden 5µl des Inhibitors dazugegeben. Die Zellzählung (siehe unter Zellkultur) erfolgte täglich zum gleichen Zeitpunkt mit einer Varianz von höchstens 3 Stunden. Die Auswertung bzw. Darstellung erfolgte mit dem Prisma-Program.

3.3. Inhibitoren

Zur Hemmung des EGF-Rezeptors (EGFR) wurde der Inhibitor BIBX382BS (BIBX, Boehringer; freundlicherweise bezogen von Prof. M. Baumann, Dresden) in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt. BIBX zählt zu der Inhibitorengruppe „small molecules“ und hemmt die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR.

Des Weiteren wurde der Inhibitor C225 (freundlicherweise bezogen von Prof. M. Baumann, Dresden) eingesetzt. Die Infusionslösung heißt Erbitux mit dem Wirkstoff Cetuximab (Merck KGaA, Darmstadt) in einer Konzentration von 30nM. C225 ist ein Antikörper und bindet an die Ligandenbindungsstelle des EGFR.

3.4. Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit einer technischen Röntgenröhre (Gulmay RS225, UK) bei einer Röhrenspannung von 200kV und einer Röhrenstromstärke von 15mA unter Verwendung eines Filters von 5mm Cu zusätzlich zum Röhreneigenfilter von 0,8mm Be. Die Zellen wurden mit einer Dosisrate von 0,8 bis 2 Gy/min bei Raumtemperatur bestrahlt.

3.5. Bestimmung des G1-Arrestes

Der Anteil von Zellen, die in der G1-Phase des Zellzyklus permanent arretiert waren, wurde mit Hilfe der BrdU-Markierung und Flusszytometrie bestimmt. Durch kontinuierliche Inkubation mit Bromdesoxyuridin (BrdU) wurden die Zellen markiert, die in der Lage waren, in die S-Phase einzutreten. BrdU wird dabei an Stelle von Thymidin in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Zur BrdU-Markierung wurden Zellen mit BrdU (Serva, Heidelberg) sowie Cytidin (Sigma, St. Louis, USA; zur Verhinderung von Zellzyklusstörungen durch BrdU) in einer Endkonzentration von 0,8 μ g/ml bzw. 0,64 μ g/ml Zellmedium inkubiert. In der G1-Phase arretierte Zellen können kein BrdU einbauen und sind daher unmarkiert. Der BrdU-Gehalt der Zellen wurde nach Immunfluoreszenzfärbung und der DNA-Gehalt nach Fluoreszenzfärbung mit Propidiumjodid im Flusszytometer gemessen.

3.5.1. Fixierung

Die Zellen wurden 72 Stunden nach Restimulation und Zugabe des BrdU fixiert. Dazu wurden die Zellen nach Ablösen vom Flaschenboden mittels Trypsin in 10 ml

Medium aufgenommen und in Falconröhrchen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) überführt, bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstandes wurde das Pellet in zwei Durchgängen in 5ml PBS-Lösung (Phosphat-Puffer, pH 7,6) aufgenommen und erneut zentrifugiert, anschließend in 1ml PBS-Lösung resuspendiert und in 6ml 80% Ethanol (-20°C) auf einem Vortexer eingetropt. Bis zur Färbung und Messung wurde die Zellsuspension bei -20°C aufbewahrt.

3.5.2. BrdU-Färbung

Das in die DNA von S-Phasezellen eingebaute BrdU wurde durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Die fixierten Zellen wurden 8 Minuten bei 400g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Denaturierung der Zellen erfolgte eine Zugabe von 2ml HCl-Triton-Lösung (2N HCl+0,1% Triton-X-100) mit einer Inkubationzeit von 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Danach erfolgte eine zweimalige Waschung mit je 3ml Borat-Lösung (0,1M Borat) und eine Waschung mit 3ml PBS-Lösung (Phosphat-Puffer, pH 6,7). Um unspezifische Antigenstrukturen zu blockieren, wurden die Zellen mit 1ml PBT-Ziegen Serum [0,5 Vol.% Tween 20 (Sigma, St. Louis, USA), 0,5 Vol.% Ziegen Serum (Gibco, Paisley, UK) ad PBS] für 15 Minuten bei dunkler Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der erste zugegebene Antikörper gegen BrdU (monoklonaler Antikörper Maus-Anti-BrdU, 10mg/l ad PBT-Ziegen Serum) wurde jeweils mit 100µl hinzugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit belassen. Es folgte zweimaliges Waschen mit 3ml PBS. Zur Markierung des ersten Antikörpers mit einem Antikörper, der einen Fluoreszenzfarbstoff enthält, wurden die Zellen mit 100µl FITC-Antikörper (FITC-konjugierter monoklonaler Antikörper Anti-Maus-Immunoglobulin, 25µg/l ad PBT-Ziegen Serum) ebenfalls 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und danach zweimal mit 3ml PBS gewaschen.

Zur Fluoreszenzfärbung der DNA wurden die Zellen mit jeweils 0,5ml Propidiumjodid-Lösung (PI, 0,1% Propidiumjodid ad PBS) für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert und vor der FACS-Messung durch eine Nylon-Gaze mit der Porengröße von 53µm (Sefar, Rüslikon, Schweiz) filtriert. Die Zellsuspensionen blieben in der Färbelösung bis zur Messung im Kühlschrank bei 4°C.

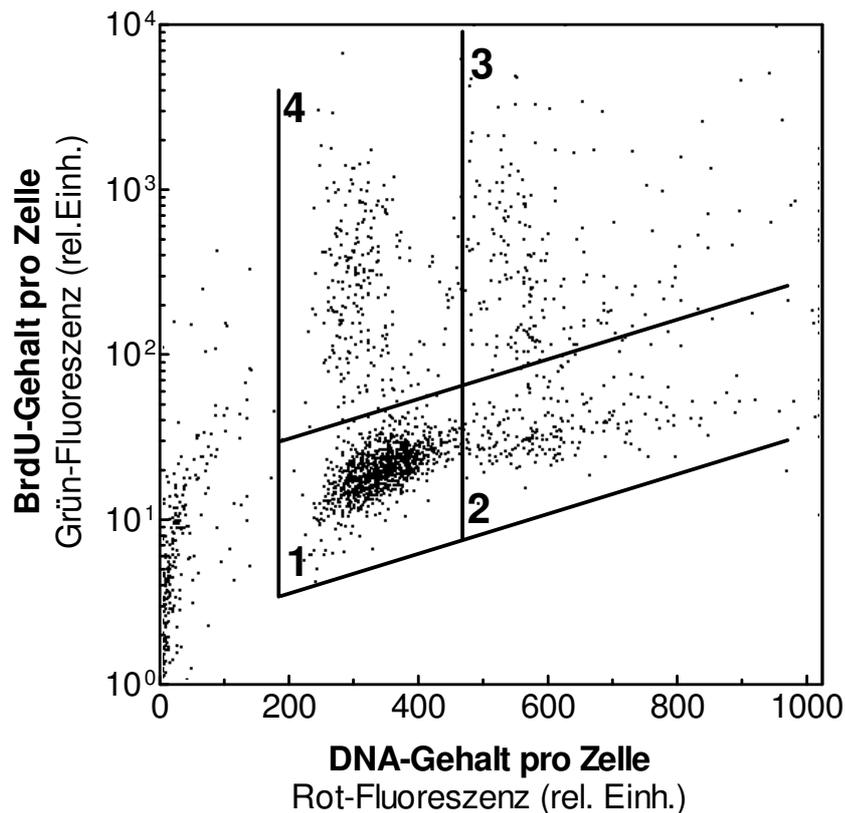


Abb. 2: Flusszytometrische Bestimmung des Anteils G1-arretierter Zellen. Die Zellen wurden für 72 Stunden in BrdU-haltigem Medium inkubiert und dann nach Fixierung der BrdU-Gehalt bzw. die DNA Menge mittels geeigneter Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen. In der Punktwolken-Darstellung entspricht jeder Punkt einer Zelle, wobei die FITC-Floureszenz dem BrdU-Gehalt und die Propidiumjodid-Floureszenz dem DNA-Gehalt entspricht. Der BrdU-Gehalt (Y-Achse) ist gegen den DNA-Gehalt (X-Achse) der Zelle aufgetragen. Zur Auswertung der Daten wurden vier Auswahlfenster 1-4 gesetzt, die jeweils (1) die nicht-markierten G1-Zellen, (2) nicht-markierte G2-Zellen, (3) BrdU-markierte S- und G2-Zellen, sowie (4) BrdU-markierte G1-Zellen enthalten.

3.5.3. Flusszytometrie

Die fluoreszenzgefärbten Zellen wurden mit dem Flusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) gemessen. Die Zellen wurden mit einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt und dann die beiden oben beschriebenen Fluoreszenzen gemessen, sodass für jede Zelle zum einen der DNA-Gehalt sowie zum anderen der BrdU-Gehalt bestimmt werden konnte. Diese beiden Werte wurden in einer Punktwolken-Darstellung (engl. „Dot Plot“, Abb. 2) dargestellt. Jeder Punkt entspricht dabei einer Zelle. Die Rotfluoreszenz wurde mit dem Langphasenfilter (F13-H) bei Wellenlängen $> 670\text{nm}$ gemessen und stammt im Wesentlichen vom PI (Emissionsmaximum: 617nm). Sie ist folglich dem DNA-Gehalt proportional. Auf diese

Weise konnte zwischen einfachem DNA-Gehalt (G1-Phase) und doppeltem DNA-Gehalt (G2-Phase) unterschieden werden. Die Grünfluoreszenz wurde mit dem Bandpass-Filter (F11-H) bei einer Wellenlänge von 515 bis 545nm gemessen. Sie setzt sich aus der schwachen Autofluoreszenz der Zelle und der Anti-BrdU-FITC-Fluoreszenz (Emissionsmaximum: 525nm) zusammen. Damit ist sie dem BrdU-Gehalt der Zelle proportional und damit ein Marker, ob die Zelle sich während der Inkubationszeit in der S-Phase befand. Bei den flusszytometrischen Messungen wurden zwischen 2000 und 10000 Zellen gezählt. Die Auswertung der Daten erfolgte an einem Macintosh Computer.

3.5.4. Auswertung

Die Auswertung der flusszytometrisch erhobenen Daten erfolgte mit der Software CellQuestPro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Dazu wurden für das Punkte-Diagramm am PC Auswahlfenster 1-4 (englisch: "gates") festgelegt, die jeweils den bestimmten Zellpopulationen zuzuordnen sind. In Abb. 2 umschließt das Fenster 1 die Zellen, die kein BrdU in ihre DNA eingebaut haben und einen einfachen DNA-Gehalt besitzen und deren schwache Grün-Fluoreszenz allein von der Autofluoreszenz stammt. Diese Population stellen somit die Zellen da, die in der G1-Phase arretiert wurden. Das Fenster 2 enthält Zellen, die ebenfalls kein BrdU eingebaut haben aber einen doppelten DNA-Gehalt besitzen. Dies sind G2-Zellen, die nicht mehr proliferieren. Das Fenster 3 enthält die Zellen, die BrdU eingebaut haben und sich in der S- bzw. G2-Phase befinden. Das Fenster 4 enthält die Zellen, die zwar einen einfachen DNA-Gehalt haben und sich somit in der G1-Phase befinden, die aber aufgrund des Einbaus von BrdU als proliferierend identifiziert werden können. Der Anteil der Zellen im Fenster 1 an allen gemessenen Zellen ergibt dann den Anteil der Zellen, die in der G1-Phase arretiert wurden.

3.6. γ H2AX- Foci-Präparation

Zur Detektierung der strahleninduzierten Doppelstrangbrüche wurde die γ H2AX-Präparation angewendet. Bei diesen Versuchen wurden die Fibroblasten in Konfluenz bestrahlt und danach sofort durch Aussaat in kleinerer Zelldichte zur Proliferation stimuliert. Für diese Versuche wurden die Zellen auf Chamber Slides ausplatiert.

Nach Bestrahlung verblieben die Kulturen 24 Stunden im Brutschrank und wurden

anschließend mit 2%-iger Formaldehydlösung (in PBS) fixiert. Nach der Fixierung erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit einer Lösung aus 0,2 Triton X-100 in PBS+1%BSA (Kälberserumalbumin). Danach erfolgte eine einstündige Blockierung (in PBS+3%BSA) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Nach einer Stunde wurden die Objektträger mit dem ersten Antikörper (γ H2AX, monoklonal 1:100, in PBS+1%BSA+0,5%Tween 20) versehen (50 μ l/Objektträger) und mit einem Plastikgläschen abgedichtet. Die Inkubation betrug eine Stunde in einer dunklen, feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte eine dreimalige, zehnmünütige Waschung (PBS+1%BSA+0,5%Tween 20) unter ständiger Schüttlung.

Der zweite lichtempfindliche Antikörper (Alexa Flour 594, 1:600 in PBS+1%BSA + 0,5%Tween 20) verlangte die Arbeit im Dunkeln. Wieder wurden die Objektträger mit jeweils 50 μ l versehen und bei Raumtemperatur für eine Stunde in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Die anschließende Waschung (in PBS+0,5%Tween 20) erfolgte viermal jeweils zehn Minuten auf dem Schüttler.

Nach der Färbung erfolgte die Gegenfärbung mit 1/3 DAPI/Antifade. Pro Objektträger wurden mit abgeschnittener Pipettenspitze 15 μ l aufgetropft und mit einem kleinen Objektträger versehen. Um Luftblasen und Austrocknung zu verhindern, wurden die Objektträger in Trockenblöcken ausgestrichen und mit Nagellack an den Seiten verschlossen. Die Objektträger verblieben bis zur Auszählung in Dunkelheit bei 4°C.

Die Auszählung erfolgt an einem Mikroskop unter Fluoreszenzlicht. Die Zellkerne erschienen durch die Gegenfärbung mit DAPI bläulich und die γ H2AX-Foci als rote Punkte. Bei der Auszählung wurden pro Objektträger 50 Zellen nach γ H2AX-Foci ausgezählt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Zellkern intakt (oval und klar begrenzt) und, um die Färbung zu garantieren, pro Gesichtsfeld mindestens eine Zelle Foci aufwies. Pro Versuch wurde jeweils die mittlere Zahl der Foci bestimmt.

3.7. Kolonietest

Mit Hilfe des Kolonietests wurde die zelluläre Strahlenempfindlichkeit bestimmt. Als überlebende und damit klonogene Zelle wurde diejenige gewertet, die in der Lage war, innerhalb von 14 Tagen eine Kolonie zu bilden. Definitionsgemäß entspricht einer Kolonie eine Ansammlung von 50 oder mehr Zellen. Inaktivierte Zellen sind solche, die absterben oder in den permanenten Zellzyklusarrest eingetreten sind.

Die Fibroblastenkulturen wurden in Konfluenz gebracht und dann mit verschiedenen Strahlendosen von 0-6 Gy/min bestrahlt und sofort danach dünn ausgesät (1000 Zellen/Flasche). Die Inhibitorzugabe erfolgte zum einen 18 oder 1 Stunde vor der Bestrahlung sowie jeweils unmittelbar nach der Aussaat. Die Zellkulturflaschen wurden danach zur Bildung von Kolonien 14 Tage im Brutschrank bei 37°C und 10%CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen mit 4ml NaCl- Lösung (0,9%) gewaschen und anschließend mit 4ml Ethanol (70%) fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zellkolonien mit 5ml Kristallviolett angefärbt. Nach zehn Minuten konnte der Farbstoff mit Wasser ausgespült werden und mit Hilfe eines Zählgerätes konnten die Kolonien per Hand ausgezählt werden.

4. ERGEBNISSE

4.1. Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Zellproliferation

Über den EGF-Rezeptor (EGFR) regulieren Zellen u.a. ihre Proliferation. Dies gilt insbesondere für Tumorzellen, bei denen dieser Rezeptor überexprimiert wird oder überaktiv ist. Eine Hemmung dieses Rezeptors bewirkt, dass das Wachstum dieser Tumorzellen sich verlangsamt oder sogar gestoppt wird. Es sollte geklärt werden, ob auch bei normalen humanen Fibroblasten eine Hemmung des EGFR zu einer Unterdrückung des Zellwachstums führt. Die Inhibition des EGFR erfolgte entweder mit Hilfe des spezifischen Tyrosinkinaseinhibitors BIBX oder mit Hilfe des EGFR-spezifischen Antikörpers C225.

Für den Versuch wurden die humanen Fibroblasten dünn ausgesät (100.000 Z pro 25cm² Flasche = 4.000 pro cm²) und zur Proliferation bei 37°C inkubiert. Die Zugabe

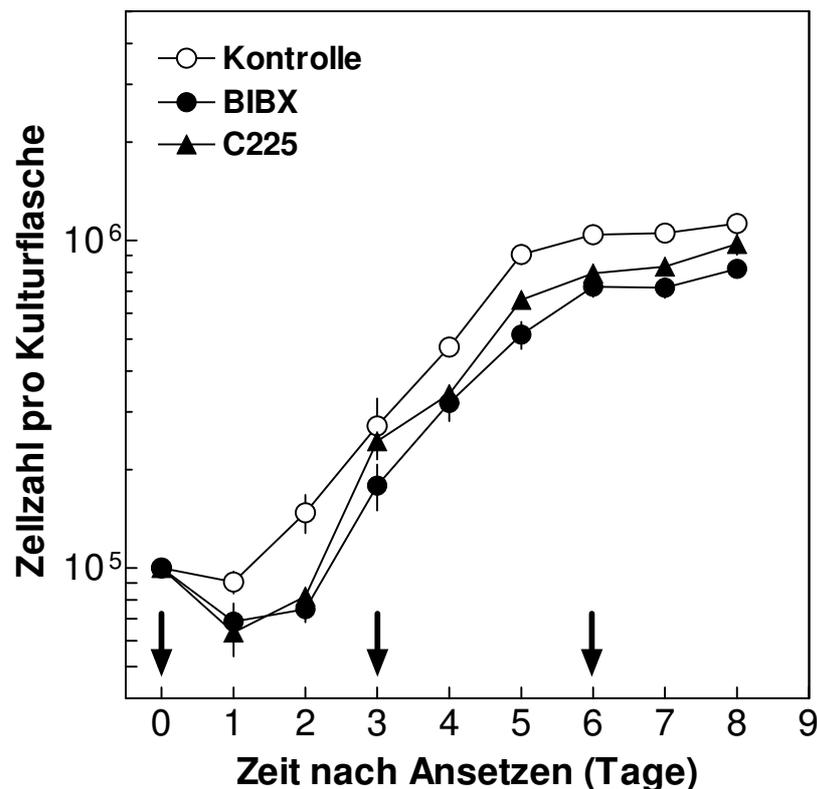


Abb. 3: Einfluss einer EGFR-Inhibition auf das Wachstum von humanen Hautfibroblasten (F124). Zellen wurden bei einer geringen Zelldichte ausgesät und mit 30nM C225 oder 5µM BIBX inkubiert. Danach wurden die Zellen zu verschiedenen Zeiten abtrypsiniert und die Zahl der Zellen mit Hilfe eines CoulterCounters bestimmt. Medium und Inhibitoren wurden alle drei Tage (Pfeile) gewechselt.

der Inhibitoren erfolgte bei der Aussaat und alle drei Tage, zeitgleich mit dem Mediumwechsel (vgl. Material und Methoden).

Abb. 3 zeigt, dass sich die unbehandelten Fibroblasten ab dem ersten Tag nach Ansetzen der Kultur exponentiell mit einer Verdopplungszeit von etwa 1,5 Tagen vermehrten und ab dem sechsten Tag eine maximale Zellzahl von 1×10^6 erreichten, welche dann auf diesem konstanten Plateau blieb. Nach Zugabe von BIBX fiel die Zellzahl am ersten und zweiten Tag zunächst deutlich ab, stieg dann aber nach einer Verzögerung von 1,5 Tagen ebenfalls exponentiell mit einer Verdopplungszeit von 1,5 Tagen wieder an. Eine maximale Zellzahl wurde ebenfalls nach sechs Tagen erreicht, die allerdings mit einer Zellzahl von 8×10^5 im Vergleich zu der unbehandelten Kultur um 20% geringer war.

Nach Zugabe von C225 waren im Prinzip die gleichen Effekte wie nach Zugabe von BIBX sichtbar. Allerdings betrug die Wachstumsverzögerung zu Beginn nur 1 Tag und die maximale Zellzahl nach 6 Tagen 9×10^5 . Dies entspricht im Vergleich zu der unbehandelten Kultur einer Abnahme der Zellzahl um 10%.

Somit zeigte sich nach Behandlung humaner Fibroblasten mit BIBX und C225, dass der Beginn der Proliferation deutlich verzögert wurde, sich dann aber die Zellen mit etwa gleicher Verdopplungszeit vermehrten, wobei nach sechs Tagen unterschiedliche maximale Zelldichten erreicht wurden. Die Effekte nach Inhibition mit BIBX waren etwas ausgeprägter als nach Inhibition mit C225.

4.2. Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Zellzykluskinetik

Eine Ursache für eine Wachstumsverzögerung, wie sie nach EGFR-Inhibition beobachtet werden, können transiente oder permanente Zellzyklusarreste sein. Daher sollte untersucht werden, welche Effekte die EGFR-Inhibitoren auf die Zellzyklusverteilung haben und ob insbesondere eine permanente Arretierung der Zellen in der G1-Phase bewirkt werden kann. Außerdem sollte geklärt werden, ob diese Effekte bei Kombination mit einer Bestrahlung noch weiter verstärkt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwieweit diese Effekte vom Zeitpunkt der EGFR-Inhibition abhängen.

Für diese Versuche wurden Fibroblasten konfluenter Kulturen mittels Trypsinbehandlung abgelöst und zur Stimulation in den Zellzyklus verdünnt ausgesät (700.000 Z pro 175 cm² Flasche = 4.000 pro cm²). Zur Markierung der proliferierenden Zellen

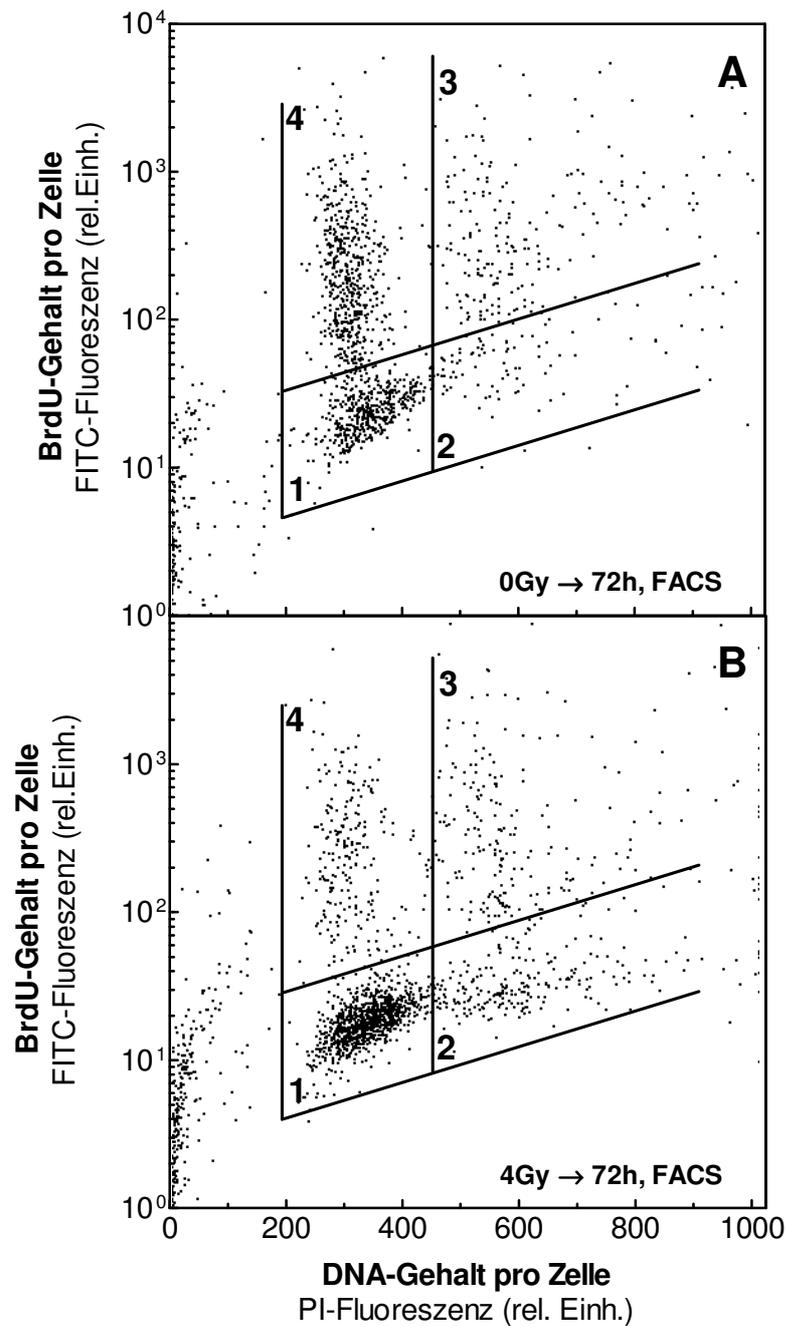


Abb. 4: Flusszytometrische Bestimmung des Anteils G1-arretierter Zellen für unbestrahlte (A) und bestrahlte (B) Zellen. Die Fibroblasten wurden unter Konfluenz bestrahlt und durch verdünnte Aussaat zur Stimulatioin angeregt und nach 72-stündiger Inkubation in BrdU-haltigem Medium fixiert und der BrdU-Gehalt bzw. die DNA Menge pro Zelle mittels geeigneter Fluoreszenzmarkierung bestimmt. In der Punktwolken-Darstellung entspricht jeder Punkt einer Zelle, wobei die FITC-Floureszenz dem BrdU-Gehalt und die Propidiumjodid-Floureszenz dem DNA-Gehalt entspricht. Zur Auswertung der Daten wurden vier Auswahlfenster 1-4 gesetzt, die jeweils (1) die nicht-markierten G1-Zellen, (2) nicht-markierte G2-Zellen, (3) BrdU-markierte S- und G2-Zellen, sowie (4) BrdU-markierte G1-Zellen enthalten (siehe auch Text).

wurde das Medium mit BrdU (233 μ l pro 35ml) versetzt, um 72 Stunden nach Stimulation mittels FACScan den Anteil der BrdU-negativen Zellen zu bestimmen. Vorhergehende Untersuchungen mit normalen humanen Fibroblasten zeigen, dass 72 Stunden nach der Stimulation alle proliferationsfähigen Zellen in den Zellzyklus eingetreten sind und BrdU eingebaut haben. Damit sind alle Zellen, die auch 72 Stunden nach der Stimulation kein BrdU eingebaut haben (BrdU-negative Zellen), in der G1-Phase arretiert. Detaillierte Versuche verdeutlichen, dass diese Zellen permanent in der G1-Phase arretiert sind und ihr Teilungsvermögen irreversibel verloren haben (Dikomey et al. 2003). Daher bestimmt der oben beschriebene Ablauf des Versuches den Anteil der Zellen, welche nach der Behandlung in der G1-Phase permanent arretiert bleiben.

Abb. 4 zeigt den Einfluss einer Bestrahlung mit 4 Gy auf den Anteil der G1-arretierten Zellen. Hierbei wurden die Zellen unter Konfluenz bestrahlt, dann sofort ausplattiert und mit BrdU inkubiert. Bei der unbestrahlten Fibroblastenkultur verblieben nur wenige Zellen in dem Auswahlfenster 1, die meisten der Zellen konnten in den Zellzyklus stimuliert werden und befanden sich nach 72 Stunden entweder in der G2-Phase oder bereits in der nächsten G1-Phase. Für eine Bestrahlung mit 4 Gy zeigte sich dagegen, dass deutlich mehr Zellen im ersten Fenster verblieben. Eine Berechnung der jeweiligen Anteile ergibt, dass bei unbestrahlten Zellen nur 8% der Zellen permanent in der G1-Phase arretiert verbleiben. Dieser Anteil nimmt nach Bestrahlung deutlich mit der Dosis zu und erreicht nach 6 Gy einen Wert von 58% (Abb. 5). Nach Korrektur auf den Anteil von 8%, den man bereits für unbestrahlte Zellen vorfindet, ergibt sich eine strahleninduzierte Zunahme von 50%.

Um den Einfluss einer EGFR-Inhibition auf den Anteil der permanent arretierten G1-Zellen zu untersuchen, wurde den Zellen BIBX (5 μ M) entweder 18 Stunden vor (und zusätzlich noch unmittelbar nach der Stimulation, um den Mediumwechsel auszugleichen) oder nur nach der Stimulation hinzugegeben. Abb. 5 zeigt, dass der Anteil der permanent in G1 arretierten Zellen bei unbestrahlten Kulturen von 8% auf etwa 14% zunimmt, wenn die erste Zugabe von BIBX 18 Stunden vor der Stimulation der EGFR erfolgte (Abb. 5, gefülltes Quadrat bei Dosis 0 Gy). Damit werden durch eine EGFR-Hemmung bei unbestrahlten Zellen weitere 6% der Zellen permanent in der G1-Phase arretiert. Die gleiche Wirkung wurde erzielt, wenn die Hemmung des EGFR erst

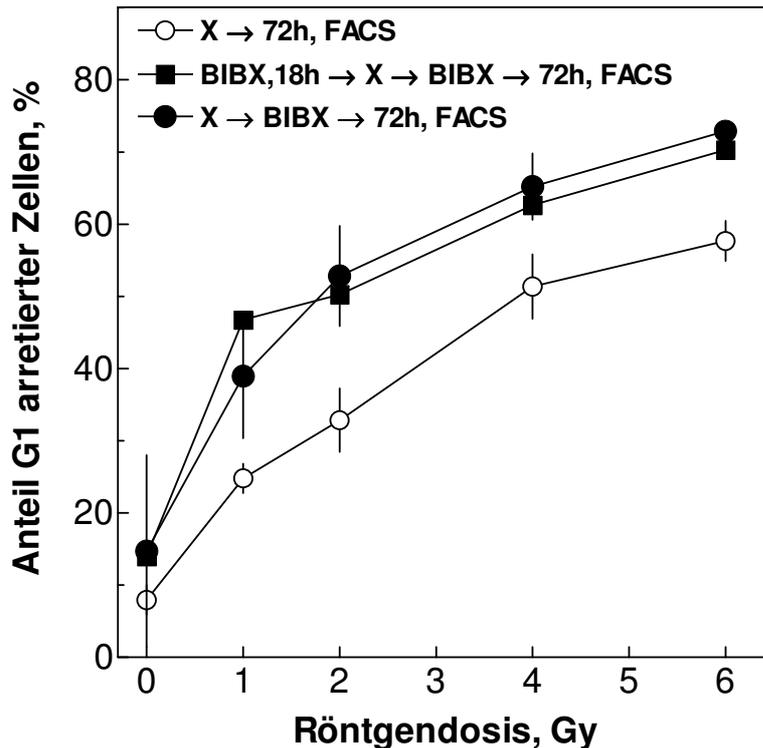


Abb. 5: Einfluss einer BIBX-Inhibition auf das Ausmaß des permanenten G1-Arrests. Konfluente Kulturen (Fibroblastenlinie F124) wurden mit Dosen bis zu 6 Gy bestrahlt und unmittelbar danach durch verdünnte Aussaat zur erneuten Proliferation angeregt (restimuliert). Zur Markierung der proliferierenden Zellen wurde das Medium mit BrdU versetzt und dann der Anteil BrdU-negativen Zellen flusszytometrisch mittels BrdU-DNA-Färbung gemessen. Zur EGFR-Inhibition wurden die Zellen entweder bereits 18 Stunden vor der Bestrahlung mit 5 μ M BIBX (■) inkubiert oder erst zum Zeitpunkt der Stimulation (●).

zum Zeitpunkt der Stimulation erfolgte (Abb. 5, gefüllter Kreis bei Dosis 0 Gy).

Erfolgte die EGFR-Hemmung zusätzlich zur Bestrahlung, dann wurde ebenfalls eine klare Zunahme der in G1-arretierten Zellen mit der Strahlendosis beobachtet, wobei diese aber etwas stärker als nach alleiniger Bestrahlung ausfiel. Dieses Ergebnis ist unabhängig davon, ob die EGFR-Inhibition bereits 18 Stunden vor der Stimulation oder erst zum Zeitpunkt der Stimulation erfolgte. Auch hier zeigt sich, dass nach kombinierter Behandlung der Anstieg mit der Dosis etwas stärker als nach alleiniger Bestrahlung ausfiel. Nach Korrektur um den Anteil von 14%, wie man ihn nach alleiniger Inhibition des EGFR findet, ergibt sich für eine Bestrahlung mit 6 Gy insgesamt ein Anstieg um im Mittel 58%. Im Vergleich zu dem Anstieg von 50%, wie er für eine alleinige Bestrahlung gemessen wurde, ergibt sich somit bei kombinierter Behandlung ein zusätzlicher Anstieg um 8%.

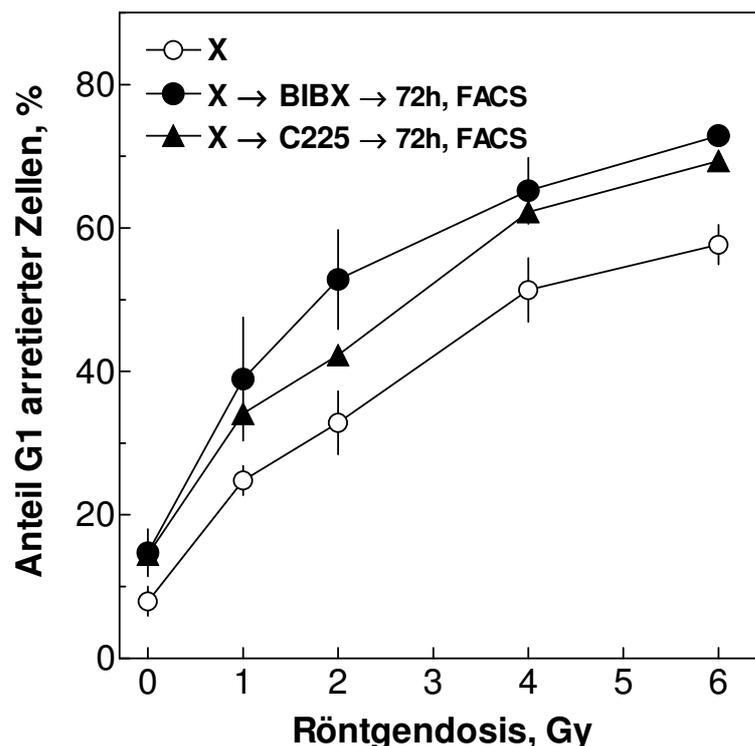


Abb. 6: Einfluss einer EGFR-Inhibition auf den Anteil der humanen Fibroblasten, die permanent in G1-arrestiert werden. Konfluente Kulturen (Fibroblastenlinie F124) wurden mit Dosen bis zu 6 Gy bestrahlt und unmittelbar danach durch verdünnte Aussaat zur erneuten Proliferation angeregt (restimuliert). Zur Markierung der proliferierenden Zellen wurde das Medium mit BrdU versetzt und dann der Anteil BrdU-negativen Zellen flusszytometrisch mittels BrdU-DNA-Färbung gemessen. Zur EGFR-Inhibition wurden die Zellen unmittelbar nach Stimulation mit 5 μ M BIBX (●) bzw. 30nM C225 (▲) inkubiert.

Damit weisen die Daten in Abb. 5 insgesamt auf zwei entscheidende Ergebnisse hin. Zum einen hat eine EGFR-Inhibition, die erst unmittelbar zum Zeitpunkt der Stimulation durchgeführt wurde, die gleiche Wirkung wie eine Inhibition, die bereits 18 Stunden zuvor erfolgte. Dies gilt sowohl für die alleinige Wirkung einer EGFR-Inhibition als auch für ihre Wirkung bei Kombination mit einer Bestrahlung. Dieses Ergebnis bedeutet, dass auch mit einer EGFR-Inhibition, die erst zum Zeitpunkt der Stimulation durchgeführt wird, alle die Prozesse beeinflusst werden, die letztendlich zu einem verstärkten G1-Arrest führen. Damit wird deutlich, dass diese Prozesse erst zu einem Zeitpunkt nach der Stimulation einsetzen.

Die Daten in Abb. 5 demonstrieren zum anderen, dass hinsichtlich des G1-Arrestes ein leicht synergistischer Effekt vorliegt, wenn die Zellen nicht nur bestrahlt werden,

sondern zusätzlich der EGFR inhibiert wird. Das bedeutet, dass sowohl durch eine Bestrahlung als auch durch eine EGFR-Inhibition die Prozesse moduliert werden, die für den Eintritt einer Zelle in den Zellzyklus erforderlich sind. Allerdings werden diese Prozesse offensichtlich an unterschiedlichen Stellen moduliert, weshalb kein rein additiver, sondern ein synergistischer Effekt zu beobachten ist.

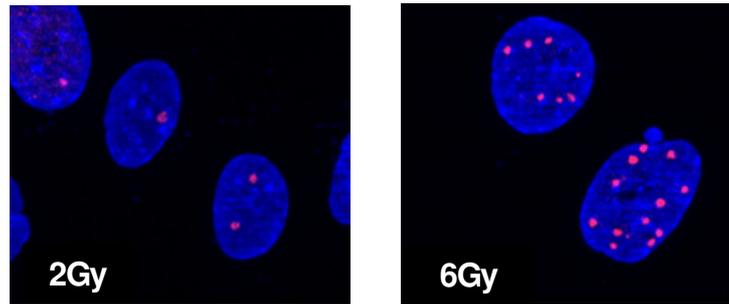
Abb. 6 zeigt die Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors BIBX im Vergleich zu einer Hemmung des EGFR mittels des Antikörpers C225. Die Zugabe des Antikörpers C225 erfolgte ebenfalls zum Zeitpunkt der Stimulation. Es wurden bei Hemmung des EGFR mittels C225 im Wesentlichen die gleichen Effekte wie bei einer Hemmung mittels BIBX beobachtet. Bei unbestrahlten Zellen bewirkt auch eine Zugabe von C225 einen Anstieg der permanent in G1-arretierten Zellen um weitere 6%, und es wird ebenfalls der strahleninduzierte Anstieg des G1-Arrestes (Abb. 6, schwarze Dreiecke) verstärkt. Allerdings fällt dieser synergistische Effekt etwas geringer aus als bei der Hemmung des EGFR mittels BIBX. So findet man für die Bestrahlung mit 6 Gy nur eine weitere Steigerung um 5%, während diese bei der Hemmung mit BIBX noch 8% betrug.

Beide EGFR-Inhibitoren können allein bereits eine permanente Arretierung der Zellen in der G1-Phase bewirken. Bei Kombination mit Bestrahlung wird zusätzlich eine leichte Steigerung für den strahleninduzierten G1-Arrest beobachtet. Dieser leicht synergistische Effekt ist nach Behandlung mit BIBX etwas ausgeprägter als nach Behandlung mit C225.

4.3. Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Doppelstrangbruchreparatur

Die Zelle wird durch Bestrahlung auf vielfältige Weise geschädigt. Hinsichtlich des Zellüberlebens sind vor allem die DNA-Doppelstrangbrüche von Bedeutung. Zellen verfügen über ein komplexes Reparatursystem, um diese Schäden zu erkennen und zu beseitigen. Es dauert 16-20 Stunden bis eine Zelle die Reparatur der strahlenbedingten Schädigungen vollendet hat. Die über diese Zeit hinaus verbleibenden residuellen Doppelstrangbrüche sind somit ein Maß für die Reparaturkapazität der einzelnen Zelle. In dem folgenden Versuch sollte untersucht werden, inwieweit eine EGFR-Inhibition die Doppelstrangbruch-Reparaturkapazität nach Bestrahlung beeinflusst.

(A)



(B)

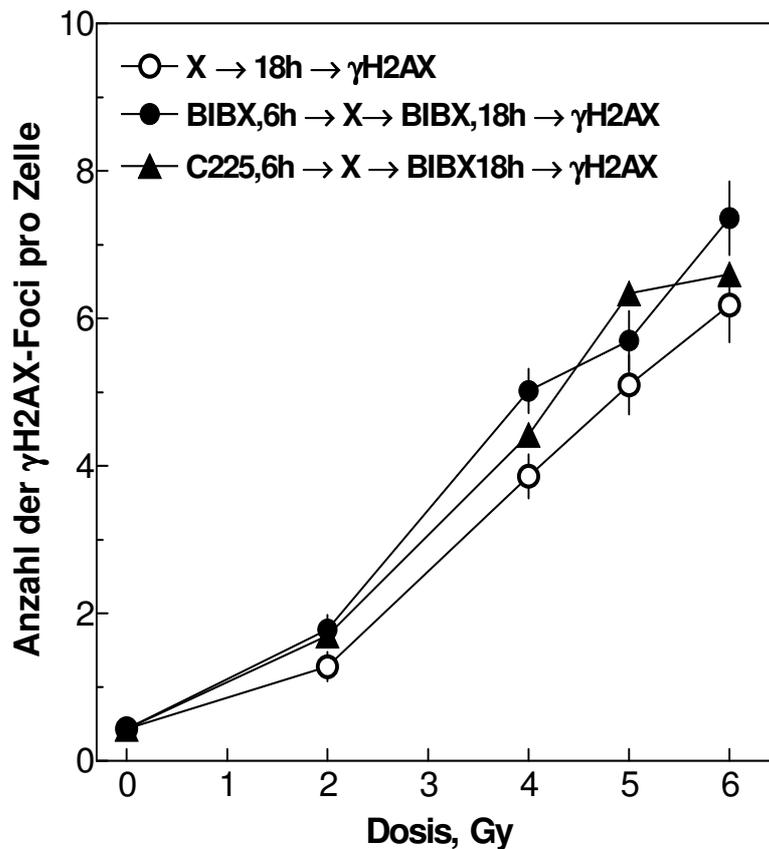


Abb. 7: Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Anzahl strahleninduzierter residueller γ H2AX-Foci. (A) Fluoreszenzmikroskopische Bilder roter γ H2AX-Foci auf blauen Zellkernen bestrahlter Zellen.

(B) Anzahl der residuellen γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Konfluente Fibroblastenkulturen wurden mit verschiedenen Strahlendosen bestrahlt. Die Zugabe der EGFR-Inhibitoren BIBX, 5 μ M (●) bzw. C225, 30nM (▲) erfolgte 6 Stunden vor der Bestrahlung. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung verdünnt ausgesät und nach erneuter Zugabe des Inhibitors im Brutschrank inkubiert. Die Fixation und Präparation der Zellen erfolgte 18 Stunden nach Bestrahlung. Nach der Färbung erfolgte die Auszählung am Fluoreszenzmikroskop. Pro Dosis wurden 50 Zellen ausgezählt.

Die residuellen Doppelstrangbrüche einer Zelle können durch die γ H2AX-Foci-Präparation quantifiziert werden, wobei ein γ H2AX-Focus einem einzelnen Doppelstrangbruch entspricht. Bereits nach geringen Strahlendosen sind die γ H2AX-Foci in den Zellen nachweisbar und können nach Antikörperfärbung mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Abb. 7A zeigt γ H2AX-Foci, die sich als rot-fluoreszierende Punkte darstellen. Die Zellkerne erscheinen nach DAPI-Gegenfärbung bläulich.

Für den Versuch wurden konfluente Fibroblastenkulturen mit verschiedenen Dosen bestrahlt und verdünnt ($30.000 \text{ Z pro } 9,4\text{cm}^2 = 3200 \text{ Z pro cm}^2$) in Chamber Slides ausgesät. Die Zugabe der EGFR-Inhibitoren BIBX oder C225 erfolgte zum einen sechs Stunden vor der Bestrahlung und zusätzlich (um den Mediumwechsel auszugleichen) unmittelbar nach der Aussaat. Nach 18 Stunden erfolgte die Fixation und Färbung der Foci und deren Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert der γ H2AX-Foci aus jeweils 50 Zellen.

Abb. 7B zeigt den Einfluss einer EGFR-Hemmung auf die Anzahl der residuellen γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Die unbehandelten Zellkulturen (Abb. 7B, offene Kreise) zeigen bei 0 Gy im Mittel 0,5 γ H2AX-Foci pro Zelle. Diese Anzahl nimmt mit steigender Strahlendosis zu und erreicht bei 6 Gy eine mittlere Anzahl von 6 γ H2AX-Foci pro Zelle. Eine Behandlung mit BIBX führt bei unbestrahlten Zellen zu keiner weiteren Erhöhung der Foci, wohl aber bei bestrahlten Zellen (Abb. 7B, geschlossene Kreise).

Erfolgt die EGFR-Hemmung mittels C225, wurden vergleichbare Effekte beobachtet (Abb. 7B, geschlossene Dreiecke). Unbestrahlte Zellen zeigen im Mittel ebenfalls 0,5 γ H2AX-Foci pro Zelle, und auch hier ist mit zunehmender Bestrahlungsdosis ein Anstieg der γ H2AX-Foci ersichtlich. Im Mittel ist die Zunahme für die beiden Inhibitoren gleich.

Insgesamt zeigen die Daten, dass in unbestrahlten Zellen eine Behandlung mit EGFR-Inhibitoren zu keiner Zunahme der Doppelstrangbrüchen führt. Bei bestrahlten Zellen ist dagegen sowohl für BIBX als auch für C225 eine leichte Zunahme der Doppelstrangbrüche zu verzeichnen. Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt unklar, ob die Behandlung mit BIBX womöglich zu einem stärkeren Anstieg der Doppelstrangbrüche nach Bestrahlung führt.

4.4. Einfluss einer EGFR-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit

Die Strahlenempfindlichkeit beschreibt die Sensitivität von Zellen hinsichtlich des unbegrenzten Teilungsvermögens. In den Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit die Hemmung des EGFR durch BIBX oder C225 die Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten beeinflusst. Weiter wird überprüft, inwieweit dieser Effekt von der Länge der EGFR-Inhibition vor der Bestrahlung abhängt. Die EGFR-Inhibition mit BIBX (5 μ M) oder C225 (30nM) erfolgte jeweils 1 Stunde oder 18 Stunden vor der Bestrahlung. Gemessen wurde die Strahlenempfindlichkeit mit Hilfe des Kolonietests. Für die Versuche wurden konfluente F124-Fibroblastenkulturen mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt anschließend umgehend in Kulturflaschen dünn ausgesät (1000 Zellen pro 25 cm²) und damit zur Proliferation angeregt. Nach vierzehntägiger Inkubation

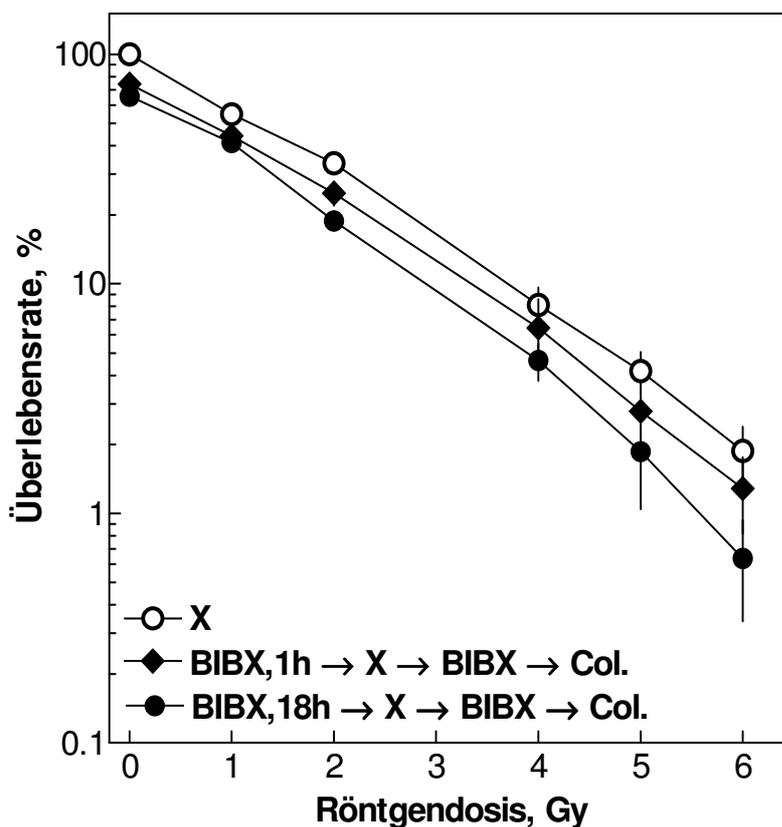


Abb. 8: Einfluss einer EGFR-Hemmung mittels BIBX auf die Strahlenempfindlichkeit von F124-Fibroblasten. Die Zellen wurden in Konfluenz gebracht und mit verschiedenen Dosen bestrahlt (X) und sofort danach in Petrischalen dünn ausgesät (Immediate Plating). Die anschließende Inkubation im Brutschrank dauerte 14 Tage. Zur Hemmung des EGFR mittels BIBX wurde die Substanz entweder 1 Stunde (◆) oder 18 Stunden (●) vor der Bestrahlung hinzugegeben; eine weitere Zugabe erfolgte jeweils beim Platieren.

wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Bei der Auszählung am Keimzählgerät wurde eine Ansammlung (Kolonie) von mehr als 50 Zellen einer klonogenen Zelle zugeordnet.

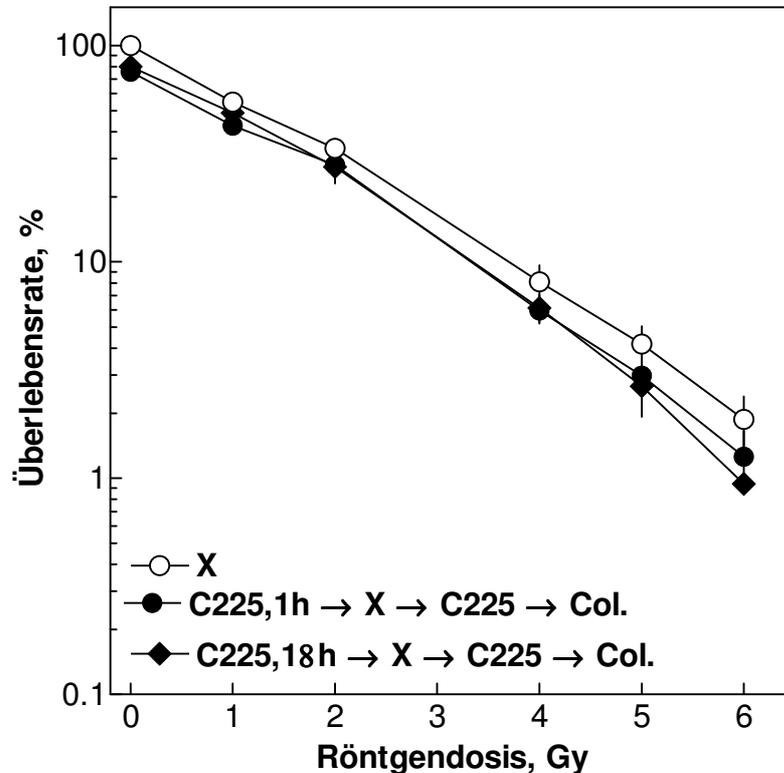


Abb. 9: Einfluss einer EGFR-Hemmung mittels C225 auf die Strahlenempfindlichkeit von F124-Fibroblasten. Die Zellen wurden in Konfluenz gebracht, mit verschiedenen Dosen bestrahlt (X) und sofort danach in Petrischalen dünn ausgesät (Immediate Plating). Die anschließende Inkubation im Brutschrank dauerte 14 Tage. Zur Hemmung des EGFR mittels C225 wurde die Substanz entweder 1 Stunde (●) oder 18 Stunden (◆) vor der Bestrahlung hinzugegeben; eine weitere Zugabe erfolgte jeweils beim Platieren.

4.4.1. Einfluss einer BIBX-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit

Abb. 8 zeigt den Einfluss einer BIBX-Inhibition auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von humanen Fibroblasten. Für unbehandelte Zellkulturen (Abb. 8, offene Kreise) nimmt die Überlebensrate mit der Dosis ab und beträgt bei 6 Gy nur noch 1,9%. Wurde der EGFR mittels BIBX eine Stunde vor der Zellaussaat gehemmt (Abb. 8, geschlossene Rauten) ist schon bei unbestrahlten Proben eine Abnahme der Überlebensrate um 25% auf 75% zu beobachten. Durch diese Behandlung wird zudem die Sensitivität gegenüber der Bestrahlung geringfügig verändert, denn bei

6 Gy wurde eine weitere Abnahme von 1,9% auf 1,3% festgestellt, was einer relativen Abnahme von 32% entspricht. Damit ist bei dieser kombinierten Behandlung nur ein ganz geringer synergistischer Effekt zu beobachten.

Wird der EGFR für 18 Stunden mittels BIBX gehemmt (Abb. 8, geschlossene Kreise), ergibt sich für die unbestrahlten Zellen eine noch stärkere Abnahme der Überlebensrate auf insgesamt 65%. Dies entspricht einer Abnahme der Überlebensrate um 35% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Bei 6 Gy beträgt die Überlebensrate nach kombinierter Behandlung nur noch 0,64%, was einer relativen Abnahme der Überlebensrate um 66% entspricht. Damit zeigte sich für BIBX eine Sensibilisierung hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten, die sich aber nur deutlich abzeichnet, wenn der EGFR bereits für 18 Stunden vor der Bestrahlung durch BIBX inhibiert wird.

4.4.2. Einfluss einer C225-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit

Die Abb. 9 zeigt den Einfluss einer Hemmung des EGFR mittels C225 auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von humanen Fibroblasten. Die Daten für die allein bestrahlten Zellen sind die Gleichen wie bereits in Abb. 8 dargestellt.

Wird eine Stunde vor der Zellaussaat der EGFR mit C225 inhibiert (Abb. 9, geschlossene Kreise) ist bereits für unbestrahlte Zellen eine Abnahme um 24% auf 76% zusehen. In Kombination mit Bestrahlung wird zumindest für die Dosis von 6 Gy eine etwas stärkere relative Abnahme um 35% beobachtet. Wird die Inkubation mit C225 auf 18 Stunden ausgedehnt, steigen diese Effekte geringfügig an. So zeigt sich für unbestrahlte Zellen zwar eine Abnahme auf 74%, in Kombination mit 6 Gy aber eine Abnahme von 1,9% auf 0,9%, was einer relativen Abnahme um 50% entspricht. Damit zeigen diese Daten hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit bei Fibroblasten zumindest bei längerer Hemmung des EGFR einen geringen synergistischen Effekt.

5. DISKUSSION

5.1. Generelle Frage

Das Ziel dieser Arbeit war es, für normale humane Hautfibroblasten die Wirkung einer Röntgenbestrahlung in Kombination mit einer EGFR-Inhibition zu untersuchen. Zur Unterdrückung des EGFR wurde dabei sowohl ein spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor (BIBX382BS, Kurzform: BIBX) als auch ein spezifischer Antikörper (C225) eingesetzt. Von besonderer Bedeutung war die Frage, ob bei Normalzellen solch eine Hemmung des EGFR eine Strahlensensibilisierung bewirkt. Solch eine Strahlensensibilisierung wurde bisher nur für Tumorzellen beschrieben. Jedoch besteht diesbezüglich eine erhebliche Heterogenität (Baumann et al. 2007).

Fibroblasten, wie sie für diese Versuche ausgewählt wurden, repräsentieren sehr gut das Normalgewebe, da sie ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommen und als Stützgewebe in fast jedem Organ zu finden sind. Mit dieser Arbeit wird erstmalig der Effekt solch einer kombinierten Behandlung für normale humane Zellen beschrieben. Bisher lagen lediglich die Ergebnisse von Eke et al. (Eke et al. 2007) für embryonale Mausfibroblasten vor, so dass die hier erzielten Ergebnisse vor allem mit den Ergebnissen verglichen werden, wie sie bisher für Tumorzellen erzielt wurden.

Die Auswirkung einer kombinierten Behandlung von Bestrahlung und EGFR-Inhibition auf Fibroblasten wurde in Bezug auf verschiedene Endpunkte untersucht. Der Einfluss einer EGFR-Inhibition auf das Zellwachstum wurde mittels Wachstumskurven untersucht. Der Einfluss hinsichtlich eines Zellzyklusarrests in der G1-Phase wurde mittels BrdU-Markierung und FACS-Analyse und der Einfluss auf die Doppelstrangbruchreparatur über den Nachweis von γ H2AX-Foci ermittelt. Der Verlust der Teilungsfähigkeit wurde mit dem Kolonietest nachgewiesen.

5.2. Zellwachstum

Die Daten aus Abb. 3 zeigen einen geringen Einfluss auf das Zellwachstum für die humanen Fibroblasten nach EGFR-Inhibition. Es fiel auf, dass die Verdopplungszeit sich nicht veränderte, sondern vor allem die im Plateau maximal erreichte Zellzahl reduziert war. Diese Abnahme der Zellzahl betrug für BIBX 20%, für C225 dagegen nur 10% (Abb. 3).

Ein direkter Vergleich dieser Daten ist nur mit Tumorzellen möglich, da für Fibroblasten bisher keine anderen Ergebnisse vorliegen. Hier gibt es bereits zahlreiche Ergebnisse. Die Publikationen zu Tumorzellen zeigen in der Regel eine Wachstumsinhibierung, die deutlich stärker ausfällt, als die hier für humane Fibroblasten beschriebenen Effekte. Hinsichtlich der Verdopplungszeit wurde in der vorliegenden Arbeit für die humanen Fibroblasten keine Änderung beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde für diverse Tumorzelllinien, wie Lungenkarzinomzellen (Chang et al. 2004; Giocanti et al. 2004), Vulvakarzinomzellen (A431) (Giocanti et al. 2004), Cervixkarzinomzellen (HeLa) (Giocanti et al. 2004), Hals- und Kopftumorzellen (SCC1, SCC11B, SCC38, SCC13Y und HSC2+3) (Huang et al. 1999), oralen Tumorzellen (Shintani et al. 2003) und Prostatakarzinomzellen (LNCaP, DU145, PC3) (Sgambato et al. 2004) eine deutliche Zunahme der Verdopplungszeit festgestellt. Dabei war dieser Effekt stets von der Konzentration abhängig und nahm mit der Konzentration zu (Chang et al. 2004). Bei ausreichend hoher Konzentration der EGFR-Inhibitoren konnte für einige Tumorzelllinien sogar ein vollständiger Wachstumsstopp erreicht werden (Chang et al. 2004; Sgambato et al. 2004).

Die Daten von Raben et al. 2005 (Raben et al. 2005) deuten an, dass die Wirkung einer EGFR-Hemmung umso stärker ausfällt, desto höher die EGFR-Expression einer Zelle ist. So wurde nach Inkubation mit Cetuximab für Lungenkarzinomzellen (NSCLC) mit extrem hoher EGFR-Expression (Tumorzelllinie H294 und H332) eine sehr starke Wachstumshemmung nachgewiesen, während für die Tumorzelllinie H157 mit nur geringer EGFR-Expression eine deutlich geringere Wachstumshemmung und für die EGFR-negative Tumorzelllinie H520 kein Effekt beobachtet werden konnte. Da Fibroblasten insgesamt eine sehr niedrige EGFR-Expression zeigen (Kasten-Pisula et al. 2010) scheinen sich diese Zellen bezüglich einer Wachstumshemmung nach EGFR-Inhibition damit ähnlich zu verhalten wie Tumorzellen mit einem geringem EGFR-Level.

Auch für Xenotransplantate wird nach EGFR-Hemmung eine deutliche Wachstumsverzögerung beobachtet (Baumann et al. 2003; Chinnaiyan et al. 2005; Chun et al. 2006; Hara et al. 2005; Harari und Huang 2001; Huang und Harari 2000; Huang et al. 2002). Eine vollständige Kontrolle dieser Tumore wurde jedoch nur in Kombination mit einer Bestrahlung erreicht. (Huang und Harari 2000)

Die hier vorliegenden Daten deuten an, dass Tyrosinkinaseinhibitoren einen stärkeren Effekt auf das Zellwachstum als EGFR-spezifische Antikörper haben (vgl. Abb. 3). Bisher liegen keine weiteren Daten vor, die diese Beobachtung bestätigen. Andere Arbeiten zeigen aber, dass die Wirkung einer EGFR-Inhibition auf die Zellverdopplungszeit deutlich gesteigert wird, wenn die Zellen zusätzlich bestrahlt werden (Giocanti et al. 2004; Shintani et al. 2003).

Eine wichtige Beobachtung ist, dass bei den Fibroblasten die maximal erreichbare Zelldichte durch EGFR-Hemmung reduziert wird (Abb. 3). Parallel dazu wurde festgestellt, dass nach EGFR-Hemmung ein Teil der Fibroblasten eine veränderte Morphologie aufwies, die sich durch eine deutliche Zunahme des Zellvolumens auszeichnete (Bilder nicht gezeigt). Diese Zunahme ist ein Indikator für eine vermehrte terminale Differenzierung der Fibroblasten, da diese stets mit einer sehr starken Zunahme des Zellvolumens und insbesondere des Zytoplasmas einhergeht (Rodemann und Bamberg 1995). Während die prämitotischen Fibroblasten sich durch eine spindelförmige Struktur auszeichnen, nehmen die postmitotischen Fibroblasten eine eher rhombenförmige Struktur ein, mit insgesamt einer deutlichen Zunahme des Zellvolumens (Bayreuther et al. 1992). Damit weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass bei den Fibroblasten nach EGFR-Inhibition die Abnahme der maximal erreichten Zelldichte letztendlich auf einen erhöhten Anteil an terminal differenzierten Fibrozyten zurückzuführen ist.

5.3. Zellzyklus

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war die Beobachtung, dass bei humanen Fibroblasten sich eine EGFR-Inhibition sehr stark auf die Zellzyklusverteilung auswirkt und insbesondere zu einer vermehrten Akkumulation in der G1-Phase führt.

Die Ursache für eine Akkumulation in der G1-Phase kann sowohl ein transienter als auch ein permanenter G1-Arrest sein. Bei einem transienten G1-Arrest verbleiben die Zellen deutlich länger in der G1-Phase. Danach treten sie aber - wenn auch mit z.T. deutlicher Verzögerung - wieder in die S-Phase ein und durchlaufen im Folgenden einen normalen Zellzyklus. Es wird vermutet, dass diese zusätzliche Zeit in der G1-Phase von der Zelle genutzt wird, DNA-Schäden zu entfernen, um dann anschließend fehlerfrei in die S-Phase eintreten zu können (Kastan et al. 1991; Lane 1992).

Im Gegensatz dazu beinhaltet der permanente G1-Arrest eine dauerhafte Arretierung

der Zellen in der G1-Phase. Vermutet wird, dass diese dauerhafte und nicht-reversible Arretierung der Zellen in der G1-Phase durch irreparable DNA-Schäden (Linke et al. 1997) oder durch eine besondere Akkumulation von p53 (Yamauchi et al. 2008) ausgelöst wird.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich auf den permanenten G1-Arrest, da nur dieser zum Verlust der Teilungsfähigkeit der Zelle führt und damit einen eigenständigen Weg der Inaktivierung darstellt (Dikomey et al. 2003).

Für unbestrahlte Fibroblasten wird bereits ein Anteil von etwa 8% permanent arretierten G1-Phasezellen gemessen (Abb. 5). Hierbei handelt es sich vermutlich um den Anteil der Fibroblasten, die bereits in der Zellkultur terminal differenziert wurden und deshalb nicht mehr zur Proliferation stimuliert werden können (Bumann et al. 1995; Burger et al. 1998).

Durch eine Bestrahlung konnte der Anteil der permanent arretierten Fibroblasten weiter gesteigert werden (Abb. 5). Dieser Anteil nimmt mit steigender Bestrahlungsdosis zu, sodass bei 6 Gy etwa 55% der Zellen permanent in der G1-Phase arretiert sind. In einer früheren experimentellen Arbeit wurde für humane Fibroblasten nach Bestrahlung mit 3,5 Gy ein Anteil von im Mittel 38% permanent arretierter G1-Phasezellen gemessen. (Dikomey et al. 2003). Aus den hier vorliegenden Daten kann für diese Dosis mit etwa 40% ein sehr ähnlicher Wert abgeschätzt werden, sodass die hier untersuchte Fibroblastenlinie als repräsentativ gewertet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde für unbestrahlte Zellen außerdem gezeigt, dass durch eine EGFR-Inhibition der Anteil der G1-arretierten Zellen um weitere 6% zunimmt. Es ist davon auszugehen, dass diese arretierten Zellen zur terminalen Differenzierung angeregt und sich dadurch entsprechend morphologisch verändern werden. Damit könnte letztendlich dieser Anstieg im Anteil der permanent arretierten G1-Phasezellen und der aufgrund der terminalen Differenzierung hervorgerufenen Zunahme im Zellvolumen für die oben beschriebene Abnahme in der maximalen Zelldichte nach EGFR-Inhibition verantwortlich sein. Wird zudem berücksichtigt, dass bei den Proliferationsuntersuchungen die EGFR-Inhibitoren mehrfach (alle 3 Tage) hinzugefügt wurden, während bei den Zellzyklusanalysen die Inhibitoren nur einmal hinzugegeben wurden, erklärt dies, warum bei der Abnahme der Zelldichte um 10% bis 20% ein etwas größerer Effekt beobachtet wurde als für die Zunahme des G1-Arrestes

um nur 6% (Abb. 3 und 5).

Bei Kombination der EGFR-Inhibition mit einer Bestrahlung konnte der strahleninduzierte permanente G1-Arrest noch weiter gesteigert werden, wobei ein leicht synergistischer Effekt festgestellt wurde (Abb. 5 und 6). Hierbei deutet sich an, dass mit BIBX ein etwas stärkerer Effekt als mit C225 erzielt werden kann.

Während für Normalzellen keine vergleichbaren Daten vorliegen, wurden für Tumorzellen bereits eine große Anzahl solcher Untersuchungen nach Gabe von EGFR-Inhibitoren durchgeführt. Dabei wurde nach EGFR-Inhibition eine deutliche Zunahme im Anteil der G1-Phasezellen und dementsprechend eine Abnahme für die S-Phasezellen nachgewiesen (Chang et al. 2004; Di Gennaro et al. 2003; Giocanti et al. 2004; Hara et al. 2005; Huang et al. 1999; Huang et al. 2002; Sgambato et al. 2004).

Diese Zellzyklusanalysen wurden in der Regel mit Hilfe eines Flusszytometers durchgeführt. Dabei wurden die Zellen entweder nach einem definierten Zeitpunkt mit der BrdU-Pulsmarkierung (Di Gennaro et al. 2003; Giocanti et al. 2004) oder nach Markierung der gesamten DNA mittels des Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (Chang et al. 2004; Hara et al. 2005; Huang et al. 1999; Huang et al. 2002; Sgambato et al. 2004) analysiert. Die meisten Untersuchungen zeigten nach EGFR-Inhibition eine sehr deutliche Zunahme im Anteil der G1-Phasezellen. So fanden Chang et al. (Chang et al. 2004) nach Inkubation mit ZD1839 für die Lungenkarzinomzelllinie A549 eine Zunahme des G1-Arrestes um 24,7% und Hara et al. (Hara et al. 2005) für die Ösophaguskarzinomzelllinie TE8 nach Gabe von Gefitinib eine Erhöhung um 27%.

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muss beachtet werden, dass aufgrund der Methodik es nicht oder nur eingeschränkt möglich ist, den Anstieg im Anteil der G1-Phasezellen eindeutig einem transienten oder einem permanenten G1-Arrest zuzuordnen. Diese Zuordnung ist deshalb so wichtig, weil - wie oben bereits dargestellt - nur der permanente G1-Arrest für die Zellinaktivierung von Bedeutung ist, nicht jedoch der transiente G1-Arrest (Dikomey et al. 2003).

Lediglich die Daten von Brammer et al. (Brammer et al. 2010) erlauben diesbezüglich eine klare Interpretation. Bei diesen Untersuchungen wurde bis zu 120 Stunden nach Zugabe des EGFR-Inhibitors der Anteil der Zellen bestimmt, die in der G1-Phase verbleiben. Um zu verhindern, dass die Zellen nach der Teilung wieder in die G1-Phase eintreten und dadurch der Anteil der G1-Zellen wieder erhöht wird, wurde das

Spindelgift Colcemid hinzugegeben, so dass alle sich teilenden Zellen in der Mitose arretiert wurden. Aufgrund dieser Versuchsanordnung kann eindeutig zwischen einem transienten und einem permanenten G1-Arrest unterschieden werden (Brammer et al. 2010). Es zeigte sich hierbei, dass nach EGFR-Inhibition in Tumorzelllinien mit mutiertem oder deletiertem p53 ein massiver transienter G1-Arrest ausgelöst wird und lediglich in der Zelllinie mit mutiertem p53 ein geringer permanenter G1-Arrest auftritt. Dagegen wird in einer Tumorzelllinie mit wtp53 sowohl ein geringer transienter als auch ein geringer permanenter G1-Arrest beobachtet. Diese Daten zeigen damit, dass diese beiden Effekte unabhängig voneinander zu sein scheinen. Daher kann allein aufgrund eines erhöhten Anteils in der G1-Phase nach EGFR-Inhibition nicht zwingend auf einen permanenten G1-Arrest geschlossen werden.

Auch hinsichtlich der Wirkung einer EGFR-Inhibition auf den strahleninduzierten G1-Arrest zeigen sich je nach p53-Status ganz unterschiedliche Effekte. Hier wurde beobachtet, dass nur bei einer Tumorzelllinie mit wtp53 ein strahleninduzierter G1-Arrest auftritt, der dann durch eine EGFR-Inhibition verstärkt werden kann (Brammer et al. 2010).

Damit entsprechen die Ergebnisse, wie sie in dieser Arbeit für normale humane Fibroblasten erhoben wurden, weitgehend den Daten, wie sie von Brammer et al. (Brammer et al. 2010) für Tumorzellen mit intaktem p53 beschrieben wurden. Allerdings fällt bei einem direkten Vergleich auf, dass die Steigerung des strahleninduzierten G1-Arrestes durch EGFR-Inhibition für die Fibroblasten geringer ausfällt als für die Tumorzellen mit wtp53.

Wie das Schema in Abb. 10 zeigt, kann sowohl eine Bestrahlung als auch eine EGFR-Inhibition in die Regulierung des G1/S-Übergangs eingreifen. Nach Bestrahlung kommt es, ausgelöst durch DNA-Schäden, zu einer Stabilisierung und damit Anstieg des p53, was zu einer vermehrten Expression des p21 führt. Der Anstieg von p21 bewirkt eine Hemmung des CyclinE/Cdk2-Komplexes, weshalb eine vollständige Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) ausbleibt. Dadurch wird der E2F-Faktor nicht frei gesetzt, so dass die Zelle in der G1-Phase arretiert wird (Karlson et al. 2005). Der gleiche Effekt kann auch durch eine EGFR-Hemmung ausgelöst werden. Abb. 10 zeigt, dass dies über zwei verschiedene Signalkaskaden geschehen könnte. Zum einen kann hierfür eine verminderte Aktivität von RAS/MAPK verantwortlich sein, was

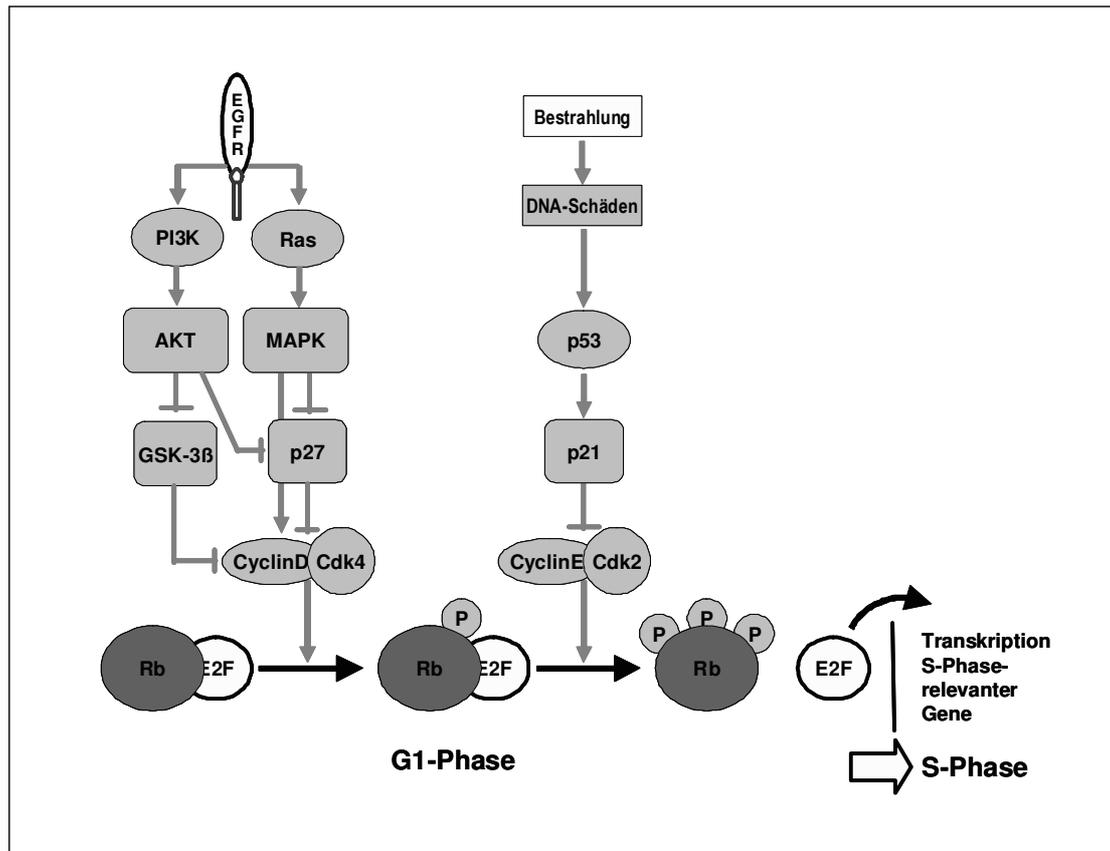


Abb. 10: Schematische Darstellung der Regulierung des G1/S-Phase Übergangs in Abhängigkeit vom Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) und der DNA-Schädigung nach Bestrahlung.

eine Hochregulation von p27 und damit Hemmung des CyclinD/Cdk4-Komplexes zur Folge hat (Wu 2004). Zum Anderen kann dies über eine Reduktion in der PI3K/AKT-Signalkaskade ausgelöst werden, da diese ebenfalls eine Hemmung des CyclinD/Cdk4-Komplexes bewirkt (Boehme et al. 2008). Die Unterdrückung beider Signalwege bewirkt letztendlich, dass Rb nicht phosphoryliert und damit kein E2F freigesetzt wird. Dieses Schema verdeutlicht, dass sowohl die EGFR-abhängige Kaskade als auch die durch eine Bestrahlung ausgelöste Signaltransduktion in die Regulation des G1/S-Übergangs eingreift. Diese Übereinstimmung im Ablauf macht damit verständlich, warum bei gleichzeitiger Auslösung eines G1-Arrestes sowohl durch eine EGFR-Hemmung als auch eine Bestrahlung ein leicht synergistischer Effekt beobachtet wurde, wie in Abb.5 und 6 gezeigt.

Außerdem zeigt diese Arbeit, dass bezüglich eines G1-Arrestes der gleiche Effekt erzielt werden kann, wenn der Rezeptor nicht 18 Stunden vor der Bestrahlung und

nachfolgender Stimulation inhibiert wird, sondern erst unmittelbar nach der Stimulation (Abb. 5). Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass die für den G1/S-Übergang entscheidenden Prozesse erst mit der Stimulation ausgelöst werden. Vorstellbar ist es, dass es sich hierbei um die Expression des für den G1/S-Übergang wichtigen Proteins Cyclin D handelt. Die Expression dieses Proteins ist in ruhenden Fibroblasten vollständig unterdrückt und wird erst durch eine Stimulation in den Zellzyklus wieder aktiviert (Nishi et al. 2009; Stein und Dulic 1998). Eine Hemmung des EGFR kann diese Aktivierung aber verhindern (Petty et al. 2003), was die in Abb. 5 beobachteten Ergebnisse sehr gut erklärt.

5.4. Doppelstrangbruchreparatur

Die hier vorliegende Arbeit zeigt erstmalig, dass auch in normalen humanen Fibroblasten die Doppelstrangbruchreparatur durch eine Hemmung des EGFR beeinflusst wird (Abb. 7). Während für unbestrahlte Zellen kein Effekt beobachtet wird, ergibt sich nach Bestrahlung eine geringe, aber signifikante Zunahme in der Zahl der residuellen Doppelstrangbrüche. Die Zahl der residuellen Doppelstrangbrüche wurde hierbei 18 Stunden (h) nach Bestrahlung bestimmt, weil zum einen vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass in normalen humanen Fibroblasten diese Inkubation ausreicht, damit die Doppelstrangbruchreparatur abgeschlossen ist (Dikomey und Brammer 2000; Dikomey et al. 2000) und zum anderen kurz genug ist, um zu verhindern, dass die stimulierten Zellen bereits in die S-Phase eingetreten sind, was die Zählung der γ H2AX-Foci erschweren würde (Brammer et al. 2010).

Für Normalzellen liegen bisher keine vergleichbaren Daten vor. Jedoch für Tumorzellen wurde ebenfalls beobachtet, dass eine Hemmung des EGFR eine Unterdrückung der Doppelstrangbruchreparatur zur Folge hat. Analog zu den hier dargestellten Ergebnissen zeigt sich bei Tumorzellen diese Unterdrückung sowohl bei Hemmung des EGFR mittels eines Antikörpers (Dittmann et al. 2005) als auch bei Hemmung mittels eines Tyrosinkinaseinhibitors (Golding et al. 2009; Toulany et al. 2006), allerdings nicht in jeder Untersuchung (Giocanti et al. 2004).

Im Vergleich zu den hier für Fibroblasten erzielten Ergebnissen scheinen die für die Tumorzellen beobachteten Effekte etwas ausgeprägter zu sein. So wurde in dieser Arbeit für eine Bestrahlung mit 6 Gy eine Zunahme um etwa 25% von 6 auf 7,5 Foci, während in einer vergleichbaren Arbeit nach Bestrahlung mit 6 Gy eine Zunahme um

50% von 4 auf 6 Foci beobachtet wurde (Toulany et al. 2006). Damit deutet dieser Vergleich an, dass ähnlich wie für den G1-Arrest auch für die Unterdrückung der Doppelstrangbruchreparatur in den normalen humanen Fibroblasten etwas geringere Effekte als für Tumorzellen beobachtet werden.

5.5. Zellinaktivierung

Hinsichtlich der Zellinaktivierung wurde bei EGFR-Hemmung sowohl für den Antikörper C225 als auch für den Tyrosinkinaseinhibitor BIBX eine geringe Steigerung gemessen, die allerdings bei dem Antikörper C225 etwas geringer ausfiel (Abb. 8 und 9). Eine signifikante Sensibilisierung war aber jeweils nur dann zu erkennen, wenn die EGFR-Hemmung bereits 18h vor der Bestrahlung erfolgte, während bei 1h Inkubation bei C225 keine und bei BIBX nur eine sehr geringe Steigerung der Strahlenempfindlichkeit zu beobachten war. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Eke et al. (Eke et al. 2007) für embryonale Mausfibroblasten überein, die nach 1h BIBX-Behandlung für eine Dosis von 2 Gy ebenfalls keine Strahlensensibilisierung feststellen konnten.

Für Tumorzellen werden hinsichtlich der Strahlensensibilisierung nach EGFR-Hemmung ganz unterschiedliche Ergebnisse beobachtet. Während für einige Tumorzellen eine deutliche Sensibilisierung erreicht wird (Huang et al. 1999; Huang et al. 2002; Sgambato et al. 2004; Shintani et al. 2003), ergibt sich bei anderen kein entsprechender Effekt bzw. wird z.T. sogar eine Radioresistenz beobachtet (Burdak-Rothkamm et al. 2005; Chinnaiyan et al. 2005; Giocanti et al. 2004). Die Gründe für diese Unterschiede sind nur z.T. bekannt. Mehrere Untersuchungen deuten an, dass zumindest für den Tyrosinkinaseinhibitor eine Sensibilisierung nur erreicht werden kann, wenn eine Mutation im KRAS-Gen vorliegt (Toulany et al. 2005; Toulany et al. 2006).

Die für bestimmte Tumorzellen beobachtete Strahlensensibilisierung wird sowohl auf eine Unterdrückung in der Doppelstrangbruchreparatur als auch auf eine gesteigerte Arretierung in der G1-Phase zurückgeführt (Baumann et al. 2007), wobei die jeweiligen Anteile dieser beiden Effekte bisher unklar sind.

Für die normalen humanen Fibroblasten deuten die hier dargestellten Ergebnisse ebenfalls an, dass beide Prozesse an der Strahlensensibilisierung beteiligt sind. Es wurde allerdings beobachtet, dass für den Tyrosinkinaseinhibitor BIBX keine deutliche

Strahlensensibilisierung beobachtet wird, wenn die Inhibition erst 1h vor der Bestrahlung erfolgte. Durch diese Behandlung sollte aber bereits hinsichtlich des G1-Arrests der maximale Anstieg erreicht werden (Abb. 5). Die zusätzliche Steigerung in der Strahlenempfindlichkeit, wie beobachtet, wenn die Inkubation von 1 auf 18h ausgedehnt wird, kann damit allein auf die Behinderung der Doppelstrangbruchreparatur zurückgeführt werden. Damit deuten diese Daten an, dass für die normalen humanen Fibroblasten bei 18h Hemmung des EGFR die Steigerung der Strahlenempfindlichkeit im Wesentlichen durch die Hemmung der Doppelstrangbruchreparatur verursacht wird.

5.6. Generelle Einordnung und Ausblick

Klinisch könnten die gezeigten Ergebnisse darauf hinweisen, dass bei einer kombinierten Behandlung von EGFR-Inhibitoren und Bestrahlung ein vermehrtes Auftreten von Nebenwirkungen (z.B. Fibrose) möglich wäre. Die Daten von Bonner et al. (Bonner et al. 2006) negieren eine Zunahme radiogener Nebenwirkungen nach kombinierter Behandlung. Jedoch fehlen bis zum jetzigen Zeitpunkt Untersuchungen über mögliche Spätreaktionen, wie z.B. der Fibrose, da diese erst mehrere Jahre nach einer Bestrahlung auftritt. Neuere Studien weisen jedoch daraufhin, dass eine stärkere Ausprägung von Nebenwirkungen nach kombinierter Behandlung von EGFR-Hemmung und Bestrahlung durchaus auftreten kann. So wurden beispielsweise von Koutcher et al. (Koutcher et al. 2009) nach kombinierter Behandlung mit Bestrahlung und Cetuximab eine Zunahme der hochgradigen radiogenen Dermatitis beobachtet. Von 115 Patienten hatten 23% eine Dermatitis \geq Grad 3. Birnbaum et al. (Birnbaum et al. 2009) fanden in einer prospektiven Phase-II-Studie für die Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenen Hals-Kopf-Karzinomen mit Cetuximab, Paclitaxel, Carboplatin und Bestrahlung ebenfalls eine signifikante Erhöhung der radiogenen Dermatitis. Diese klinischen Beobachtungen werden durch Untersuchungen an einem Mausmodell bestätigt, welches zeigt, dass nach Gabe des Chemotherapeutikums Bleomycin die sich entwickelnde Lungenfibrose noch verstärkt, wenn zusätzlich der EGFR inhibiert wird (Suzuki et al. 2003).

Insgesamt weisen die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass bei der Behandlung von Tumorerkrankungen mit EGFR-Inhibitoren in Kombination mit einer Strahlentherapie nicht nur die Steigerung der Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen zu sehen ist, sondern auch die potentielle Wirkung auf die Normalzellen mit den möglichen

Konsequenzen einer gesteigerten Normalgewebetoxizität zu berücksichtigen ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde erstmalig für eine Bestrahlung in Kombination mit EGFR-Inhibitoren die Wirkung auf normale humane Fibroblasten (Linie F124) untersucht. Zur Inhibition des EGFR wurde einerseits der monoklonale Antikörper C225 sowie andererseits der Tyrosinkinaseinhibitor BIBX eingesetzt.

- Die EGFR-Hemmung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Verdopplungszeit der Zellen, bewirkt aber eine Reduzierung in der maximal erreichten Zelldichte um 10% (C225) bzw. 20% (BIBX), was auf einen erhöhten Anteil an terminal differenzierten Fibrozyten und damit einer Zunahme im Zellvolumen zurückgeführt wird.
- Eine EGFR-Hemmung durch BIBX als auch C225 führt bereits in unbestrahlten Zellen zu einer Zunahme des Anteils an permanent arretierten G1-Zellen um 6%. Die EGFR-Hemmung verstärkt außerdem das Ausmaß des strahleninduzierten G1-Arrestes. Für 6 Gy wird hierbei für BIBX mit 8% ein etwas stärkerer Effekt gefunden als für C225 mit einer Zunahme von nur 5%. Für BIBX konnte zudem gezeigt werden, dass der maximale Effekt bereits erreicht wird, wenn die EGFR-Hemmung erst nach der Bestrahlung zum Zeitpunkt der Stimulation stattfand.
- Eine Behandlung mit BIBX oder C225 allein induziert keine Doppelstrangbrüche, bewirkt aber bei Kombination mit einer Bestrahlung eine geringe Hemmung der Doppelstrangbruchreparatur.
- Beide Substanzen bewirken eine sehr geringe Strahlensensibilisierung der Fibroblasten. Diese fällt nach Behandlung mit BIBX geringfügig stärker aus als nach Behandlung mit C225. Diese Sensibilisierungseffekte können mit den jeweiligen Effekten der EGFR-Inhibitoren auf G1-Arrest und der Doppelstrangbruchreparaturkapazität erklärt werden.
- Damit zeigen diese Daten erstmalig, dass bei einer kombinierte Behandlung von Tumoren mit Bestrahlung und EGFR-Inhibitoren nicht nur für die Tumorzellen von einer verstärkten Inaktivierung auszugehen ist, sondern auch – wenn auch in einem deutlich geringeren Maße – für die Normalzellen eine verstärkte Wirkung zu erwarten ist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Agero AL, Dusza SW, Benvenuto-Andrade C, Busam KJ, Myskowski P, Halpern AC (2006) Dermatologic side effects associated with the epidermal growth factor receptor inhibitors. *J Am Acad Dermatol* 55: 657-70.
- Azzam EI, de Toledo SM, Waker AJ, Little JB (2000) High and low fluences of alpha-particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts. *Cancer Res* 60: 2623-31.
- Baumann M, Krause M, Dikomey E, Dittmann K, Dorr W, Kasten-Pisula U, Rodemann HP (2007) EGFR-targeted anti-cancer drugs in radiotherapy: preclinical evaluation of mechanisms. *Radiother Oncol* 83: 238-48.
- Baumann M, Krause M, Zips D, Eicheler W, Dorfler A, Ahrens J, Petersen C, Bruchner K, Hilberg F (2003) Selective inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by BIBX1382BS and the improvement of growth delay, but not local control, after fractionated irradiation in human FaDu squamous cell carcinoma in the nude mouse. *Int J Radiat Biol* 79: 547-59.
- Bayreuther K, Francz PI, Rodemann HP (1992) Fibroblasts in normal and pathological terminal differentiation, aging, apoptosis and transformation. *Arch Gerontol Geriatr* 15 Suppl 1: 47-74.
- Birnbaum A, Dipetrillo T, Rathore R, Anderson E, Wanebo H, Puthwala Y, Joyce D, Safran H, Henderson D, Kennedy T, Ready N, Sio TT (2009) Cetuximab, Paclitaxel, Carboplatin, and Radiation For Head and Neck Cancer: A Toxicity Analysis. *Am J Clin Oncol* Epub ahead of print
- Boehme KA, Kulikov R, Blattner C (2008) p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7785-90.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354: 567-78.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, Ang KK (2009) Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11: 21-8.
- Borgmann K, Dede M, Wrona A, Brammer I, Overgaard J, Dikomey E (2004) For X-irradiated normal human fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 445-52.

- Brammer I, Kriegs M, Can YK-P, U., Dikomey E (2010) Effect of EGFR tyrosine kinase inhibitors on cell cycle regulation after ionising irradiation and its impact on cell killing in human tumour cells. *Radio Oncology* submitted
- Bumann J, Santo-Holtje L, Loffler H, Bamberg M, Rodemann HP (1995) Radiation-induced alterations of the proliferation dynamics of human skin fibroblasts after repeated irradiation in the subtherapeutic dose range. *Strahlenther Onkol* 171: 35-41.
- Burdak-Rothkamm S, Rube CE, Nguyen TP, Ludwig D, Feldmann K, Wiegel T, Rube C (2005) Radiosensitivity of tumor cell lines after pretreatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Strahlenther Onkol* 181: 197-204.
- Burger A, Loffler H, Bamberg M, Rodemann HP (1998) Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int J Radiat Biol* 73: 401-8.
- Chang GC, Hsu SL, Tsai JR, Liang FP, Lin SY, Sheu GT, Chen CY (2004) Molecular mechanisms of ZD1839-induced G1-cell cycle arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochem Pharmacol* 68: 1453-64.
- Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G, Armstrong E, Varambally S, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Harari PM (2005) Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res* 65: 3328-35.
- Chun PY, Feng FY, Scheurer AM, Davis MA, Lawrence TS, Nyati MK (2006) Synergistic effects of gemcitabine and gefitinib in the treatment of head and neck carcinoma. *Cancer Res* 66: 981-8.
- Coffman FD, Studzinski GP (1999) Differentiation-related mechanisms which suppress DNA replication. *Exp Cell Res* 248: 58-73.
- Dei Tos AP, Ellis I (2005) Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours: what is the value of current test methods? *Eur J Cancer* 41: 1383-92.
- Dewey WC, Ling CC, Meyn RE (1995) Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33: 781-96.
- Di Gennaro E, Barbarino M, Bruzzese F, De Lorenzo S, Caraglia M, Abbruzzese A, Avallone A, Comella P, Caponigro F, Pepe S, Budillon A (2003) Critical role of both p27KIP1 and p21CIP1/WAF1 in the antiproliferative effect of ZD1839 ('Iressa'), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in head and neck squamous carcinoma cells. *J Cell Physiol* 195: 139-50.
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8: 2540-51.

- Dikomey E, Borgmann K, Brammer I, Kasten-Pisula U (2003) Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology* 193: 125-35.
- Dikomey E, Brammer I (2000) Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line. *Int J Radiat Biol* 76: 773-81.
- Dikomey E, Brammer I, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J (2000) Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46: 481-90.
- Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B (1998) Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol* 73: 269-78.
- Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP (2005) Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol* 76: 157-61.
- Eke I, Sandfort V, Storch K, Baumann M, Roper B, Cordes N (2007) Pharmacological inhibition of EGFR tyrosine kinase affects ILK-mediated cellular radiosensitization in vitro. *Int J Radiat Biol* 83: 793-802.
- Giocanti N, Hennequin C, Rouillard D, Defrance R, Favaudon V (2004) Additive interaction of gefitinib ('Iressa', ZD1839) and ionising radiation in human tumour cells in vitro. *Br J Cancer* 91: 2026-33.
- Golding SE, Morgan RN, Adams BR, Hawkins AJ, Povirk LF, Valerie K (2009) Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells. *Cancer Biol Ther* 8: 730-8.
- Goodhead DT (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* 65: 7-17.
- Hara F, Aoe M, Doihara H, Taira N, Shien T, Takahashi H, Yoshitomi S, Tsukuda K, Toyooka S, Ohta T, Shimizu N (2005) Antitumor effect of gefitinib ('Iressa') on esophageal squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 226: 37-47.
- Harari PM, Allen GW, Bonner JA (2007) Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol* 25: 4057-65.
- Harari PM, Huang SM (2001) Head and neck cancer as a clinical model for molecular targeting of therapy: combining EGFR blockade with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49: 427-33.

- Herbst RS, LoRusso PM, Purdom M, Ward D (2003) Dermatologic side effects associated with gefitinib therapy: clinical experience and management. *Clin Lung Cancer* 4: 366-9.
- Herrmann T, Baumann M, Dörr W (2006) *Klinische Strahlenbiologie - kurz und bündig*. München: Urban und Fischer
- Huang SM, Bock JM, Harari PM (1999) Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 59: 1935-40.
- Huang SM, Harari PM (2000) Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 6: 2166-74.
- Huang SM, Li J, Armstrong EA, Harari PM (2002) Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Res* 62: 4300-6.
- Karlson P, Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W (2005) *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Stuttgart: Thieme
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-11.
- Kasten-Pisula U, Saker J, Eichele W, Krause M, Yaromina A, Meyer-Staeckling S, Scherkl B, Kriegs M, Brandt B, Baumann M, Dikomey E (2010) Cellular and tumour radiosensitivity is correlated to EGFR protein expression level in tumours with no *egfr* amplification. *Clin Cancer Res* submitted
- Kasten-Pisula U, Tastan H, Dikomey E (2005) Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *Int J Radiat Biol* 81: 409-19.
- Kim R, Emi M, Tanabe K (2006) The role of apoptosis in cancer cell survival and therapeutic outcome. *Cancer Biol Ther* 5: 1429-42.
- Koutcher LD, Wolden S, Lee N (2009) Severe Radiation Dermatitis in Patients With Locally Advanced Head and Neck Cancer Treated With Concurrent Radiation and Cetuximab. *Am J Clin Oncol* 32: 472-476.
- Kowalick L, Lohse C, Ziegler H, Busch FW (2004) Schwere Akne unter Therapie eines metastasierten kolorektalen Karzinoms mit monoklonalem Anti-EGF-Rezeptor-Antikörper Cetuximab (Erbix). *Akt Dermatol* 30: 474-477.
- Krause M, Fritzmann J, Rodemann P, Baumann M (2007) Interaktion von EGFR- und VEGFR-Inhibitoren mit Chirurgie und Strahlentherapie. *Der Onkologe* 13: 67-72.

- Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-6.
- Leischner H (2007) *BASICS Onkologie*. München: Urban & Fischer Verlag
- Li T, Perez-Soler R (2009) Skin toxicities associated with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Target Oncol* 4: 107-19.
- Linke SP, Clarkin KC, Wahl GM (1997) p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Res* 57: 1171-9.
- Nishi K, Inoue H, Schnier JB, Rice RH (2009) Cyclin D1 downregulation is important for permanent cell cycle exit and initiation of differentiation induced by anchorage-deprivation in human keratinocytes. *J Cell Biochem* 106: 63-72.
- Petty WJ, Dragnev KH, Dmitrovsky E (2003) Cyclin D1 as a target for chemoprevention. *Lung Cancer* 41 Suppl 1: S155-61.
- Raben D, Helfrich B, Chan DC, Ciardiello F, Zhao L, Franklin W, Baron AE, Zeng C, Johnson TK, Bunn PA, Jr. (2005) The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. *Clin Cancer Res* 11: 795-805.
- Rodemann HP, Bamberg M (1995) Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 35: 83-90.
- Sgambato A, Camerini A, Faraglia B, Ardito R, Bianchino G, Spada D, Boninsegna A, Valentini V, Cittadini A (2004) Targeted inhibition of the epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase by ZD1839 ('Iressa') induces cell-cycle arrest and inhibits proliferation in prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 201: 97-105.
- Shintani S, Li C, Mihara M, Terakado N, Yano J, Nakashiro K, Hamakawa H (2003) Enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer. *Int J Cancer* 107: 1030-7.
- Stein GH, Dulic V (1998) Molecular mechanisms for the senescent cell cycle arrest. *J Invest Dermatol Symp Proc* 3: 14-8.
- Suzuki H, Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A (2003) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition augments a murine model of pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 63: 5054-9.
- Toulany M, Dittmann K, Baumann M, Rodemann HP (2005) Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS. *Radiother Oncol* 74: 117-29.

- Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, Wang S, Chen J, Dittmann K, Baumann M, Dikomey E, Rodemann HP (2006) Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res* 12: 4119-26.
- Wagener C, Müller O (2009) *Molekulare Onkologie*. München: Thieme Verlag
- Wannenmacher M, Debus J, Wenz F (2006) *Strahlentherapie*. München: Springer
- Weinberg RA (2007) *The biology of cancer*. New York: Taylor & Francis Group
- Wu GS (2004) The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 3: 156-61.
- Yamauchi M, Oka Y, Yamamoto M, Niimura K, Uchida M, Kodama S, Watanabe M, Sekine I, Yamashita S, Suzuki K (2008) Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *DNA Repair (Amst)* 7: 405-17.

8. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dikomey, der mir den Arbeitsplatz im Labor zur Verfügung gestellt und das Thema dieser Arbeit übertragen hat. Besonders danke ich ihm für die hervorragende Betreuung bei der Fertigstellung dieser Arbeit, die ich sehr zu schätzen weiß.

Besonders dankbar bin ich ebenfalls Dr. I. Brammer für die Planung der Experimente und die intensive Betreuung während der gesamten Laborzeit. Er stand immer für Fragen zur Verfügung und hat mich, wo er konnte, unterstützt. Vielen Dank für die ausgesprochen nette Zusammenarbeit!

Vielen Dank an B. Riepen und J. Schäfer, die mich in die Laborarbeit eingeführt haben und mir bei den Experimenten immer freundlich mit Rat und Tat zur Seite standen. Ebenfalls danke ich A. Zielinski, die mich bei der Foci-Präparation unterstützt hat.

Allen Mitarbeitern des Labors danke ich für das freundliche Arbeitsklima.

Darüber hinaus danke ich ganz besonders Mirko für seine emotionale Unterstützung und für die vielen schönen gemeinsamen Augenblicke. Vielen Dank an Marie und Simon. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und meinen Freunden dafür, dass sie mich hin und wieder davon ablenkt haben. Danke an Wiebke, Anne B., Clarissa, Jana, Fee, Basti, und Franzi.

9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.