

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

des Onkologischen Zentrums

Direktorin Prof. Dr. med. Cordula Petersen

Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie

Leitung Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

BEDEUTUNG DES EGF-REZEPTORS FÜR DIE EXPRESSION VON DNA-REPARATURPROTEINEN

Dissertation

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

vorgelegt von

Benjamin Johannes Bernhard Scherkl

aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 15.11.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg**

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Cordula Petersen

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Matthias Kneussel

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Arbeitshypothese und Fragestellung	4
2.	Einleitung	5
2.1	Wirkung ionisierender Strahlung	5
2.2	Mechanismen der Zellinaktivierung	6
2.3	Mechanismen der DNA-Reparatur	8
2.4	Funktion des EGF-Rezeptors	10
2.4.1	Ursachen und Folgen einer EGFR-Überexpression	11
2.4.2	EGFR als Target	12
3.	Material und Methoden	15
3.1	Abkürzungsverzeichnis	15
3.2	Zelllinien	16
3.3	Zellkultur	17
3.4	Spezifischer Proteinnachweis mittels Western Blot	17
3.4.1	Gesamtzellproteinextraktion "snap freeze"	18
3.4.2	Proteinquantifizierung mit dem BCA-Assay	18
3.4.3	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
3.4.4	Proteintransfer (Western Blot)	19
3.4.5	Detektion und Auswertung der Proteinsignale	20
3.5	RNA-Interferenz	21
3.5.1	Transfektion der Zellen	22
3.6	Verwendete Substanzen, Puffer und Lösungen	23
3.7	Verwendete Laborgeräte	25
3.8	Laborzubehör und Verbrauchsmaterial	25
4.	Ergebnisse	26
4.1	Proteinbasallevel in verschiedenen Tumorzelllinien	26
4.2	Korrelation der basalen Proteinexpression in verschiedenen Tumorzelllinien	28
4.3	Einfluss einer EGFR-Suppression auf die Expression von DNA-Reparaturproteinen	31

5.	Diskussion	37
5.1	Ziel der Arbeit	37
5.2	Basale EGFR-Proteinexpression	38
5.3	Basale Expression der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs und XRCC1	40
5.4	Korrelation der untersuchten Proteine und mögliche Ursachen	41
5.5	Einsatz von RNA-Interferenz (RNAi)	43
5.6	Fazit	45
6.	Zusammenfassung	46
7.	Literaturverzeichnis	47
8.	Danksagung	51
9.	Lebenslauf	52
10.	Eidesstattliche Versicherung	53

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Das Ziel der Strahlentherapie, als eine wichtige Option bei der Behandlung von soliden Tumoren, ist die Inaktivierung der Tumorzellen bei möglichst geringer Beeinträchtigung des umgebenden, gesunden Normalgewebes. Es ist bekannt, dass der EGF-Rezeptor (EGFR) in humanen Tumoren überexprimiert ist. Dies geht einher mit einer schlechteren Prognose durch invasives Wachstum und Metastasierung, sowie auch einer erhöhten Strahlenresistenz (Herrmann und Baumann, 2006). Der genaue Mechanismus dieser Resistenz ist noch nicht geklärt. Es gibt aber Hinweise darauf, dass die Höhe der EGFR-Expression mit dem Expressionslevel von DNA-Reparaturproteinen korreliert (Um et al., 2004). Durch einen hohen Level an DNA-Reparaturproteinen wären die Tumorzellen in der Lage, die strahleninduzierten Schäden effektiv zu beseitigen, was mit einer verstärkten Radioresistenz einhergehen würde. Durch diesen Zusammenhang wäre es möglich, dass der EGFR-Level die Reparaturkapazität von Zellen bestimmt und damit auch das Ausmaß des zellulären Überlebens nach Bestrahlung.

Da die Wirkung der Strahlentherapie vor allem auf der Induktion von Doppelstrangbrüchen beruht, soll die Hypothese überprüft werden, ob die EGFR-Expression in Tumorzellen mit der Expression von Reparaturproteinen korreliert, die direkt an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind (DNA-PKcs, XRCC1). Außerdem soll überprüft werden, ob der EGFR die Expression der Reparaturproteine direkt beeinflusst, oder ob diese Expression durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus reguliert wird.

Es sollen verschiedene Tumorzelllinien vergleichend zu Normalfibroblasten untersucht werden. Zum einen werden mehrere Zelllinien derselben Entität (Plattenepithelkarzinom) hinsichtlich des entsprechenden Proteinbasallevels untersucht, zum andern werden Tumorzelllinien verschiedener Entitäten verglichen. Die Extraktion der Proteine soll aus unbestrahlten Zellen erfolgen, um den unregulierten Level zu ermitteln. Dabei sollen die Proteine EGFR, DNA-PKcs, XRCC1 und Actin (als Kontrolle) bestimmt werden, um eine Korrelation der Proteinexpression zu überprüfen. Um eine direkte Wirkung vom EGFR auf die Expression von Reparaturproteinen zu testen, soll in weiteren Versuchen zunächst der EGFR-Level mittels RNA-Interferenz supprimiert und anschließend der Expressionslevel der Reparaturproteine bestimmt werden.

2. EINLEITUNG

Bösartige Neubildungen standen mit etwa 25 Prozent an zweiter Stelle auf der Liste der Todesursachen im Jahr 2007 (Bundeszentrale für politische Bildung, 2008). Die Strahlentherapie gehört neben Chirurgie und Chemotherapie zu den Grundpfeilern der Therapie solider Tumore, ist aber z. T. durch erhebliche Nebenwirkungen, vor allem durch Schädigung des gesunden Gewebes in unmittelbarer Umgebung des Tumors, belastet. Durch die dreidimensionale Planung des Bestrahlungsfeldes und die intensitätsmodulierte Strahlentherapie lässt sich die Schädigung des umgebenden Normalgewebes bereits deutlich vermindern (dkfz, 2010, Sterzing et al., 2011). Eine Radiosensitivierung der Tumorzellen könnte die Schädigung des gesunden Gewebes noch weiter reduzieren, da eine geringere Gesamtstrahlendosis eingesetzt werden könnte. Dafür wäre es unerlässlich, auf zellbiologischer Ebene die Reparaturmechanismen von Strahlenschäden zu verstehen, und nach Strukturen zu forschen, durch die sich diese Reparaturmechanismen beeinflussen lassen.

2.1 Wirkung ionisierender Strahlung

In der Behandlung von Tumoren macht sich die Strahlentherapie gezielt die DNA-schädigende Wirkung von ionisierenden Strahlen zunutze. Durch ihre hohe Energie sind

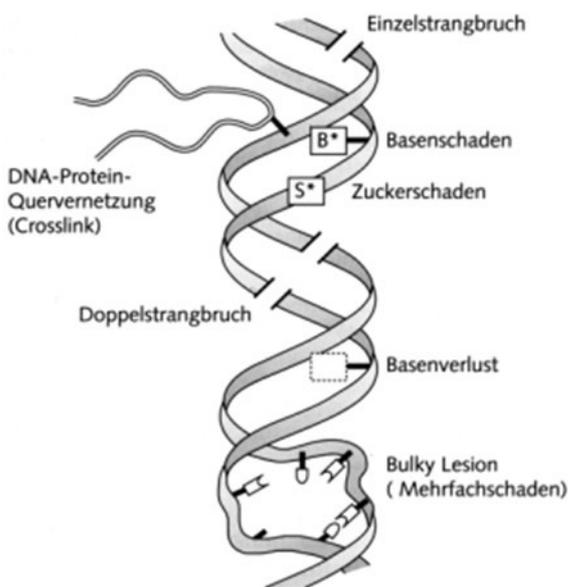


Abb. 1: Schematische Darstellung der radiogenen DNA-Schäden (Kauffmann, 2001).

ionisierende Strahlen in der Lage, verschiedene Schäden an der DNA zu erzeugen. Dabei wird zwischen fünf Schadenstypen unterschieden. Zu den häufigsten Schäden zählen Basenschäden und Einzelstrangbrüche. Seltener kommen DNA-Protein-Vernetzungen und Mehrfachläsionen vor. Sehr selten kommt es zu Doppelstrangbrüchen (Herrmann und Baumann, 2006). Es gibt eine Vielzahl von Basenschäden, die durch Ionisation eines Atoms einer Base entstehen und in einer Strukturveränderung resultieren. Bei einer Röntgenbestrahlung

werden pro Zelle und Gray (Gy) ca. 4000-5000 DNA-Schäden erzeugt, davon etwa 3000 Basenschäden. Einzelstrangbrüche entstehen durch eine Schädigung der Zucker-Phosphatkette mit Spaltung einer Phosphodiesterbindung, oder durch den Verlust eines ganzen Nukleosids. Durch ionisierende Strahlen kommt es etwa zu 1000 Einzelstrangbrüchen pro Zelle und Gy (Herrmann und Baumann, 2006). Zu DNA-Proteinvernetzungen kann es durch Ionisation eines Kernproteins kommen. Es entsteht eine kovalente Bindung mit der DNA in einer Häufigkeit von etwa 150 pro Zelle und Gy. Im Falle von Mehrfachläsionen liegen mehrere der bisher beschriebenen Schäden dicht beieinander. Die Häufigkeit beträgt etwa 400 pro Zelle und Gy (Kauffmann et al. 1996). Doppelstrangbrüche entstehen durch zwei Einzelstrangbrüche, die sich entweder direkt gegenüber liegen, oder durch maximal drei Basenpaare voneinander getrennt sind. Die Häufigkeit beträgt etwa 30-40 pro Zelle und Gy. Trotz der geringen relativen Häufigkeit ist dieses Ereignis für das Zellüberleben von größter Bedeutung (Herrmann und Baumann, 2006).

2.2 Mechanismen der Zellinaktivierung

Durch die Induktion von DNA-Schäden mittels ionisierender Strahlen soll eine Inaktivierung der Tumorzellen erreicht werden. Kann eine Zelle die Reparatur der erzeugten Schäden nicht bewältigen, verliert sie ihre Teilungsfähigkeit oder stirbt. Dabei sind drei verschiedene potenzielle Mechanismen möglich: Zum einen kann ein permanenter G1-Arrest induziert werden, zum anderen können Apoptose oder vor allem der Mitosetod zur Zellinaktivierung führen (Herrmann und Baumann, 2006).

Nicht reparierte Doppelstrangbrüche können dazu führen, dass eine Zelle am G1-Kontrollpunkt arretiert, bis die Schäden behoben sind. Über p53 wird p21 exprimiert, welches den Komplex Cyclin E/Cdk2 hemmt und damit den Eintritt in die S-Phase verhindert. Es ist möglich, dass in dieser Phase p21 von p16 abgelöst wird, was einer terminalen Differenzierung gleichkommt und einen permanenten G0-Zustand bedeutet. Eine in Tumorzellen häufig vorkommende Mutation des p53 kann einen G1-Arrest verhindern, was dazu führt, dass diese Zellen trotz erheblicher DNA-Schäden in die Mitose gehen. Daher ist ein G1-Arrest bei Tumorzellen selten (Herrmann und Baumann, 2006).

Beim apoptotischen Zelltod kommt es schon vor dem Erreichen der Mitose zu einer Aktivierung des zelleigenen Selbstzerstörungsprogramms. Durch DNA-Schäden hervorgerufen, kommt es über eine Aktivierung des Proteins p53 zur Expression des

Proteins Bax. An der äußeren Zellmembran der Mitochondrien wirkt das Protein Bax als Gegenspieler zum Protein Bcl-2, welches die Freisetzung der Proteine Cytochrom C (Cyt C) und Apaf-1 verhindert. Cyt C und Apaf-1 lösen eine Caspasen-Kaskade aus, welche eine systematische Spaltung essentieller Struktur- und Regulatorproteine zur Folge hat. Über die Aktivierung von Endonukleasen wird eine Fragmentierung der DNA bewirkt und somit der Zelltod eingeleitet (Löffler, 2003). Auch dieser Mechanismus spielt bei Tumorzellen nach ionisierender Bestrahlung eine eher untergeordnete Rolle (Herrmann und Baumann, 2006).

Den wichtigsten Mechanismus der Zelinaktivierung nach ionisierender Bestrahlung stellt der Mitosetod durch Chromosomenaberration dar. Sind beim Eintritt in die S-Phase noch Doppelstrangbrüche vorhanden, die nicht oder inkorrekt repariert wurden, kommt es zu einer Fixierung der strahleninduzierten Schäden in Form von Chromosomenaberrationen. Dabei werden nicht letale von letalen Chromosomenaberrationen unterschieden. Zu den nicht letalen Chromosomenaberrationen zählen Schäden, bei denen kein genetisches Material verloren geht, sondern wie z. B. bei der Translokation lediglich verschoben wird. Dies hat zur Folge, dass die Zelle überlebt, aber daraus möglicherweise Funktionsausfälle resultieren. Bei der letalen Chromosomenaberration kommt es durch den Verlust von DNA zum Absterben der Zelle. Durch Abtrennung eines endständigen Chromosomenfragmentes entstehen terminale, und durch Verlust eines innerhalb des Chromosoms gelegenen Teilstückes interstitielle Deletionen. Verknüpfen sich zwei geschädigte Chromosomen, entsteht ein dizentrisches Chromosom. Die durch Deletion abgespaltenen DNA-Fragmente bilden ein azentrisches Fragment. In der Anaphase kann das azentrische Fragment ohne Centromer mangels Anheftungspunkt der Spindelfasern nicht zu den Spindelpolen gezogen werden. Es verbleibt in der Äquatorialebene und wird als Mikrokern isoliert und degradiert. Die genetische Information dieses Fragmentes geht den Tochterzellen damit verloren. Resultiert daraus ein Defizit in der Expression essentieller Proteine, sterben die Tochterzellen nach wenigen weiteren Zellteilungen ab, oder überleben als teilungsunfähige Zellen (Hall, 2000).

2.3 Mechanismen der DNA-Reparatur

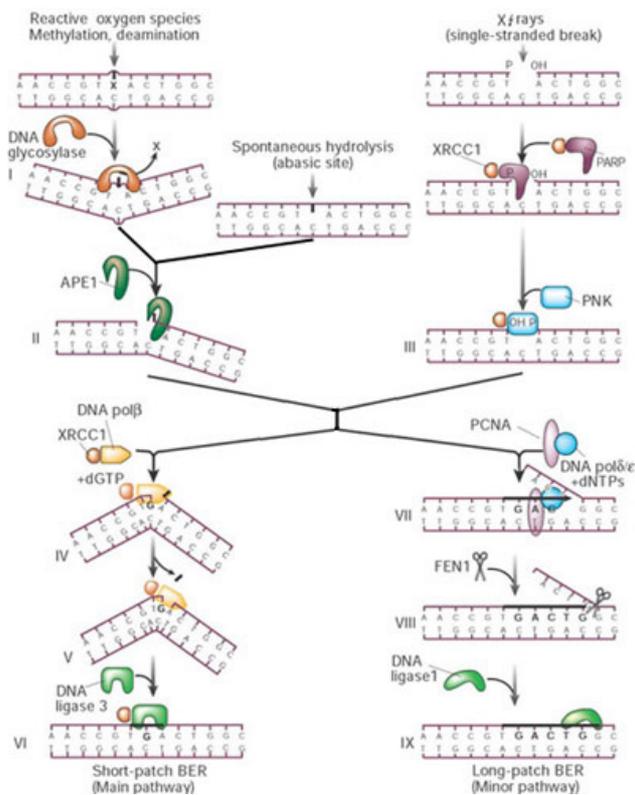


Abb. 2: Schematische Darstellung der Basenexzisionsreparatur als Reparaturmechanismus für Basenschäden und Einzelstrangbrüche (Hoeijmakers, 2001).

einer Polymerase wieder gefüllt. Abschließend wird der DNA-Strang durch einen Ligase-Komplex geschlossen. Auch Einzelstrangbrüche werden über diesen Mechanismus repariert. Zunächst interagiert der XRCC1-Komplex mit der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und der Polynukleotid-Kinase (PNK), um mit der Erzeugung einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende die Bruchstücke auf den Reparaturvorgang mit den DNA-Polymerasen β und δ/ϵ , sowie dem nukleären Antigen proliferierender Zellen (PCNA) vorzubereiten. Dann wird der defekte Strang mittels der Polymerase über die Bruchstelle hinaus neu synthetisiert. Dabei wird ein Teil des alten Stranges verdrängt und mittels der Endonuklease FEN1 entfernt. Die DNA-Ligase verbindet das neu synthetisierte Stück mit dem vorhandenen Strang und schließt damit den Bruch endgültig (Wiebalk, 2006).

Der Reparaturmechanismus für Mehrfachläsionen ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass die einzelnen Schäden parallel zueinander repariert werden. So kann es vorkommen, dass durch die gleichzeitige Reparatur von Basenschäden und

Um einer Inaktivierung entgegenzuwirken, steht der Zelle eine Reihe von Möglichkeiten zur Reparatur von DNA-Schäden zur Verfügung. Basenschäden werden mittels Basenexzisionsreparatur (BER) behoben. Die defekte Base wird durch eine DNA-Glykosylase von der Zucker-Phosphatkette unter Bildung einer abasischen Stelle entfernt. Anschließend wird durch das Enzym AP-Endonuklease 1 die Zucker-Phosphatkette gespalten und der abasische Zuckerrest entfernt. Durch den XRCC1-Komplex wird diese Stelle stabilisiert und die Lücke wird, anhand des komplementären DNA-Stranges der Doppelhelix, mittels

Einzelstrangbrüchen ein, durch die Reparatur bedingter, sekundärer Doppelstrangbruch entsteht, der entsprechend beseitigt werden muss (Herrmann und Baumann, 2006, Hall, 2000).

Bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen stehen der Zelle mit der homologen Rekombination (HR) und dem nicht-homologen Endjoining (NHEJ) zwei unterschiedliche Hauptmechanismen zur Verfügung.

Bei der homologen Rekombination wird mit Hilfe einer homologen Sequenz von einem Schwesterchromatid oder homologen Chromosom in einer Austauschreaktion der DNA-Schaden in der Regel fehlerfrei behoben. Dieser Mechanismus findet in der späten S-Phase beziehungsweise in der G2-Phase Anwendung. Im ersten Schritt wird über ATM der Rad50/Mre11/NBS1-Komplex phosphoryliert. Dieser reseziert durch seine 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Bruchenden so, dass überhängende 3'-Bruchenden übrig bleiben. Diese werden von Rad51 gebunden, das die Fähigkeit besitzt, die Sequenz des Einzelstranges mit der eines intakten Doppelstranges zu vergleichen. Über RPA erfolgt das Zusammenlagern des zentralen Proteins Rad51 mit

z. B. BRCA2, Rad52, Rad54, Rad54B und den Rad51 paralogen Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 und XRCC3, was eine Invasion des Einzelstranges in den Doppelstrang des intakten Schwesterchromatids ermöglicht (Helleday et al., 2007). Über Rad51 erfolgt die Suche der homologen Sequenz, und mit Hilfe von Kohesinen die richtige Positionierung und Bindung der homologen Sequenzen. Es kommt zur Ausbildung einer Heteroduplex, wobei die intakten Stränge des Schwesterchromatids als Matrize für die Neusynthese dienen. DNA-Polymerasen beginnen mit der Neusynthese der Einzelstränge in beide Richtungen. Abschließend wird die Heteroduplex an ihren Kreuzungsstellen, den sog. „Holliday Junctions“, mit Hilfe einer Endonuklease aufgelöst und die Lücken mittels einer Ligase geschlossen.

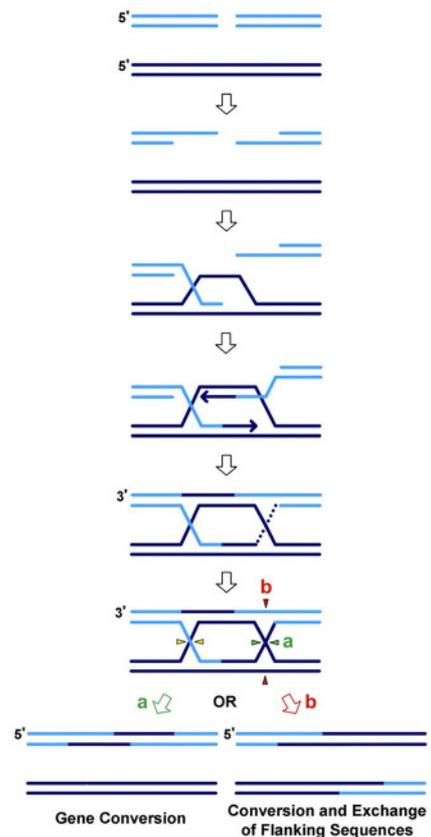


Abb. 3: Schematische Darstellung der homologen Rekombination mit Ausbildung von sog. „Holliday Junctions“ (Helleday, 2007).

Beim nicht-homologen Endjoining werden die Bruchenden direkt, ohne Zuhilfenahme einer größeren homologen Sequenz, wieder miteinander verbunden. Dieser Reparaturmechanismus ist der Hauptreparaturweg in der G1-Phase des Zellzyklus, kann aber auch in anderen Zellzyklusphasen aktiv sein. Je nach Art des Doppelstrangbruches werden einige Nukleotide abgebaut und die Bruchenden direkt miteinander verbunden. Eine zentrale Rolle nimmt dabei die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) mit ihren Untereinheiten Ku70/Ku80 und der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs ein. Das Heterodimer Ku70/Ku80 zeigt eine hohe Affinität für freie DNA-Enden und bindet diese. Dadurch wird möglicherweise eine weitere Schädigung der DNA durch Nukleasen verhindert. Der an der Erkennung des Schadens beteiligte Mre11-NBS1-Rad50-Proteinkomplex bereinigt mit seiner Exonukleaseaktivität die Bruchenden und bereitet sie so auf den Reparaturvorgang vor. Dabei können einzelne Nukleotide der Erbinformation verloren gehen. Die Ankopplung der DNA-PKcs bewirkt durch Autophosphorylierung deren Aktivierung und über Phosphorylierung auch die Aktivierung der Faktoren Artemis und WRN. Durch diesen Proteinkomplex werden die Bruchenden zusammengeführt und mit dem Ligase IV-XRCC4-XLF-Komplex miteinander verbunden (Helleday et al., 2007).

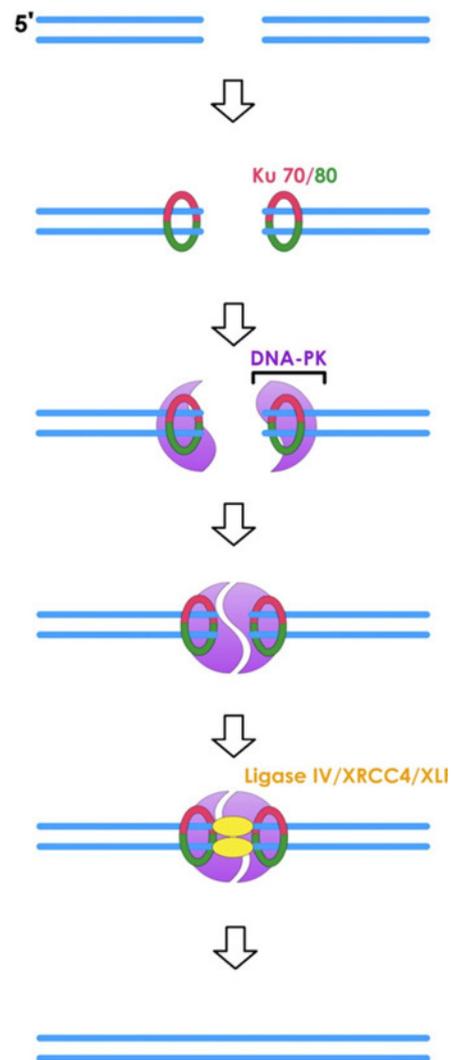


Abb. 4: Schematische Darstellung des nicht-homologen Endjoinings (Helleday, 2007).

2.4 Funktion des EGF-Rezeptors

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist ein essentieller, in allen Zellarten vorkommender, membranständiger Rezeptor der ErbB-Familie mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Nach Bindung eines natürlichen extrazellulären Liganden wie dem epidermalen-Wachstumsfaktor (EGF) oder dem Transforming-Growth-Factor alpha (TGF α) bildet der EGFR (ErbB-1) mit einem weiteren Erb-B1-Rezeptor ein Homodimer, oder ein Heterodimer mit einem anderen Rezeptor aus der

ErbB-Familie (Erb B2/3/4). Die Dimerisierung aktiviert die intrinsische Proteinkinase. Dies führt zu einer Autophosphorylierung und zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden wie dem Ras/MAPK-, dem JAK/STAT-, dem PLC/PKC-, oder dem PI3K/AKT-Signalweg. Über den Ras/MAPK-Signalweg kommt es in Tumorzellen zu einer verstärkten Proliferation und Invasivität. Die JAK/STAT-Signalkaskade führt zu vermehrter Genexpression, der PLC/PKC-Signalweg zu einem beschleunigten Zellzyklus und der PI3K/AKT-Signalweg fördert das Zellüberleben, die Angiogenese und die Expression von anti-apoptotischen Proteinen (Nyati et al., 2006; Lo and Hung, 2006; Thariat et al., 2007).

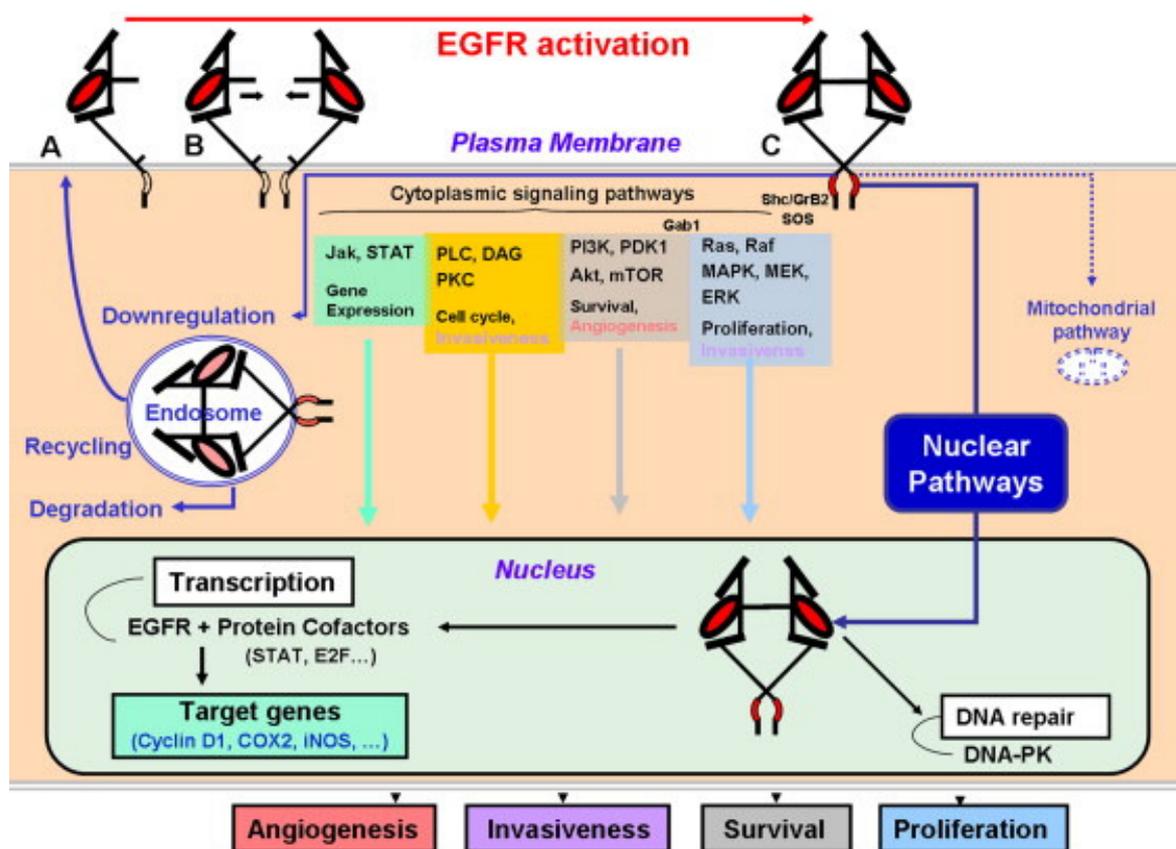


Abb. 5: Schematische Darstellung der EGFR-abhängigen Signalwege und deren potentielle Funktionen (Thariat, 2007).

2.4.1 Ursachen und Folgen einer EGFR-Überexpression

In vielen soliden Tumoren (besonders in Plattenepithelkarzinomen und Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen) wird häufig eine erhöhte Expression des EGFR beobachtet. Diese Überexpression kann aufgrund einer komplexen Regulation viele Ursachen haben. Einerseits kommt eine Vermehrung der Genabschnitte (Genamplifikation) auf dem Chromosom 7 oder eine Vermehrung des entsprechenden

Chromosoms (Chromosomenamplifikation) als Ursache in Frage, andererseits kann durch eine gestörte Regulation der Transkriptions- und Cofaktoren, sowie durch das Vorhandensein von SNP's (single-nucleotide polymorphisms) eine EGFR-Überexpression bedingt sein (Romeike et al., 2001; Kitadai et al., 2007; Liu et al., 2005). Auch die Anzahl der CA-repeats in Intron 1 des EGFR-Gens ist für die Expression des EGFR von Bedeutung, wobei eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl der, einem Enhancer vorgeschalteten, CA-repeats und der Synthese von EGFR-pre-mRNA bei Brustkrebs beschrieben ist (Brandt et al., 2006).

Mutationen und die erhöhte Anzahl des EGFR führen zu einer Hyperaktivität des Rezeptors. Es kommt zu einer verstärkten Dimerisierung und damit zu einer verstärkten Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne. Über die gesteigerte Autophosphorylierung kommt es zu einer gesteigerten Phosphorylierung anderer Proteine und damit zu einer verstärkten, aber fehlregulierten Aktivierung der entsprechenden intrazellulären Signalwege. Diese Veränderungen können zu einer Radioresistenz führen, die ein Problem in der Strahlentherapie darstellt und mit einer schlechten Prognose einhergeht (Hatanpaa et al., 2010). Diese Zusammenhänge machen den EGFR als Ziel für therapeutische Ansätze interessant.

2.4.2 EGFR als Target

Um den EGFR als Angriffsziel für eine Beeinflussung der EGFR-abhängigen Signalwege zu nutzen, gibt es derzeit hauptsächlich zwei Möglichkeiten. Zum einen lässt sich der EGFR an der Zellmembran extrazellulär mit spezifischen Antikörpern blockieren, zum andern kann die EGFR-Tyrosinkinase intrazellulär mit spezifischen Inhibitoren (sog. „small molecules“) inhibiert werden. Das Ziel ist es, die durch den EGFR vermittelten fehlregulierten Signalweg entstandene Radioresistenz zu verringern und die Zelle wieder radiosensitiv zu machen. Studien bestätigen die Effektivität dieses Ansatzes. Bonner et al. (2006) konnten auf zellulärer Ebene zeigen, dass sich durch eine Anti-EGFR-Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper (Cetuximab/C225) der Effekt einer Radiosensitivierung nachweisen lässt. Um et al. zeigten, dass eine Behandlung von aggressiven Krebszelllinien mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor PKI116 eine signifikante Erhöhung der Chemosensitivität verursacht (Um et al., 2004). In einer klinischen Studie mit Plattenepithelkarzinomen (Kopf und Hals) konnten Bonner et al. zeigen, dass Strahlentherapie mit gleichzeitiger Gabe von Cetuximab,

einer alleinigen Strahlentherapie in Bezug auf das progressionsfreie Überleben signifikant überlegen ist (Bonner et al., 2006).

Es wurde beobachtet, dass durch eine EGFR-Inhibition die Doppelstrangbruchreparatur der Zelle gestört werden kann, was wiederum durch verbleibende Doppelstrangbrüche mit dem Zellüberleben nach Bestrahlung korreliert (Dittmann et al., 2005, Toulany et al., 2006). Als Mechanismus wird eine Translokation des normalerweise membranständigen EGFR in den Kern diskutiert. Dittmann et al. (2005) konnten zeigen, dass sich der EGFR nach Bestrahlung vom Zytoplasma in den Zellkern verlagert und dort mit der DNA-PKcs interagiert. Durch eine Anti-EGFR-Behandlung mit dem monoklonalen C225-Antikörper verbleibt der EGFR allerdings im Zytoplasma. Es kommt zu einer geringeren Aktivität der DNA-PK und die Radiosensitivität wird erhöht. Zusätzlich wurde gezeigt, dass EGFR im Zellkern als Transkriptionsfaktor oder Cofaktor wirken kann. Auf diesem Weg könnte der EGFR ebenfalls Einfluss auf Reparaturproteine haben und die beschriebene Radioresistenz verursachen.

Die Ergebnisse von Dittmann et al. (2005) stehen teilweise im Gegensatz zu der Arbeit von Bandyopadhyay et al. (1998). Dort wurde eine, nicht durch monoklonale Anti-EGFR-Antikörper (mAb 225) verhinderte, sondern eine dadurch induzierte direkte physikalische Interaktion zwischen EGFR und DNA-PK bzw. Ku70/80 im Zellkern beschrieben. Die Kolokalisation von EGFR mit DNA-PK bzw. Ku70/80 in Anti-EGFR-Antikörper behandelten Zellen führt zu einer Reduktion der intrinsischen Kinaseaktivität des EGFR, zu einer Reduktion des DNA-PK-Levels und zu einer Verminderung der DNA-PK-Aktivität in der Kernfraktion. Dieser Effekt ist abhängig von der Anwesenheit des EGFR, jedoch nicht von dem EGFR-Level.

Friedmann et al. (2006) konnten eine dosis- und zeitabhängige Interaktion von EGFR und DNA-PKcs nach Behandlung mit Gefitinib (Iressa/ZD1839), einem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor, in MCF-7 (Brustkrebs) und AR42J (Pankreaszelllinie mit hohem EGFR Level) zeigen. In MDA-453 (Brustkrebs), einer Zelllinie mit einem niedrigen EGFR-Level, konnte dieser Effekt nicht erzielt werden. Die gezeigte Interaktion zwischen EGFR und DNA-PKcs korreliert mit einer Reduktion der DNA-PK-Aktivität durch die Behandlung mit Gefitinib. Eine Reduktion der DNA-PK-Aktivität konnte nur in den Zelllinien MCF-7 und AR42J und nicht in der Zelllinie MDA-453 beobachtet werden.

Auch Bonner et al. (2004) beschreiben einen Versuch, in dem erst ein mittels Transfektion erhöhter EGFR-Level die Colonkarzinomzelllinie LS174T durch Anti-EGFR-Behandlung mit C225 radiosensitiv machte.

Diese Ergebnisse lassen auf eine Bedeutung des EGFR-Levels für die erfolgreiche Behandlung mit EGFR-Inhibitoren schließen, die Auswirkung auf die Doppelstrangbruchreparatur und damit das Zellüberleben hat.

Einen weiteren Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem EGFR und DNA-Reparaturproteinen liefern Um et al. (2004). Es konnte gezeigt werden, dass bei aggressiv wachsenden und behandlungsresistenten Tumorzelllinien stets ein hoher EGFR-Expressionslevel mit einem hohen Expressionslevel von DNA-PKcs einhergeht. Eine Anti-EGFR-Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor PKI166 verminderte die DNA-PK-Aktivität und führte zu einer Radiosensitivierung.

Yacoub et al. (2003) konnten zeigen, dass nach einer Behandlung der Prostatazelllinien Du145 und LNCaP mit EGF und Bestrahlung über eine Aktivierung des MAPK-Signalweges, die Expression der Reparaturproteine XRCC1 und ERCC1 gesteigert wird. Wird der MAPK-Signalweg inhibiert, führt dies zu einer reduzierten Hochregulierung der beiden Proteine und zu einem Persistieren von abasischen Stellen, was eine verminderte Basenexzisionsreparatur anzeigt. Über XRCC1 und ERCC1, zentrale Proteine der Basenexzisionsreparatur, könnte der EGFR Einfluss auf diesen DNA-Reparaturmechanismus haben und eventuell über eine auf diesem Weg entstandene Vermehrung der sekundären Doppelstrangbrüche auch auf das Zellüberleben.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Abkürzungsverzeichnis

BCA	= Bicinchoninic Acid
BSA	= Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
DMEM	= Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	= Desoxyribonucleic Acid
DNA-PKcs	= DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit
DTT	= Dithiothreitol
ECL	= Electrochemiluminescence
EDTA	= Ethylendiamintetraacetat
EGFR	= Epidermal-Growth-Factor-Receptor
FCS	= Fetal Calf Serum
LFA	= Lipofectamin
RISC	= RNA-induced silencing complex
RNA	= Ribonucleic Acid
RNAi	= Ribonucleic Acid interference
RNase	= Ribonuklease
rpm	= Rounds per minute
SCC	= Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom)
MM	= Magermilch
mRNA	= Messenger Ribonucleic Acid
OptiMEM	= Reduziertes Serum Medium zur Transfektion
RT	= Raumtemperatur
scrRNA	= Scrambled Ribonucleic Acid
SDS-PAGE	= Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	= Single Interference Ribonucleic Acid
TBS	= Tris-Buffered Saline

3.2 Zelllinien

Folgende humane Zelllinien wurden untersucht:

Tabelle 1: Verwendete Plattenepithelkarzinomzellen.

Plattenepithelkarzinomzelllinien ¹	EGFR	KRas	p53
UT-SCC-5 (Zungenmetastase Grade II)	wildtyp	wildtyp	mutiert
UT-SCC-8 (supraglottische Larynxmetastase Grade I)	wildtyp	wildtyp	mutiert
UT-SCC-14 (Zunge rekurrenter Primärtumor Grade II)	wildtyp	wildtyp	mutiert
UT-SCC-15 (Zunge Primärtumor Grade I)	wildtyp	wildtyp	negativ
UT-SCC-45 (Mundboden persist. Primärtumor Grade II)	wildtyp	wildtyp	mutiert
SAS (Zunge Primärtumor Grade IV)	wildtyp	wildtyp	mutiert
XF354 (Mundboden LK-Metastase Grade I)	wildtyp	wildtyp	negativ
CAL33 (Zunge Primärtumor Grade I)	wildtyp	wildtyp	mutiert
HSC4 (Zunge Primärtumor Grade I)	wildtyp	wildtyp	mutiert
FaDuDD (Hypopharynx Primärtumor Grade IV)	wildtyp	wildtyp	negativ

¹) Freundlicherweise erhalten von Prof. M. Baumann, Uniklinik Dresden.

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien verschiedener Tumorentitäten.

Tumorzelllinie	EGFR	KRas	p53
A549 ¹ (Bronchialkarzinom)	wildtyp	mutiert	wildtyp
FaDu-Tü ¹ (Plattenepithelkarzinom)	wildtyp	wildtyp	mutiert
UiRad ² (Osteosarkom)	wildtyp	wildtyp	
MCF7 ³ (Mammakarzinom)	wildtyp	wildtyp	wildtyp
4451 ⁴ (Plattenepithelkarzinom)	wildtyp	wildtyp	mutiert
H1299 ⁵ (Bronchialkarzinom)	wildtyp	wildtyp	negativ
A431 ⁶ (Plattenepithelkarzinom)	wildtyp	wildtyp	mutiert
Du145 ³ (Prostatakarzinom)			mutiert
LNCaP ³ (Prostatakarzinom)			wildtyp
MO59J ⁷ (Glioblastom)			
MO59K ⁷ (Glioblastom)			
Fus9 ⁷			
Fus1 ⁷			

¹) Freundlicherweise erhalten von Prof. H. Peter Rodemann, Universität Tübingen

²) Freundlicherweise erhalten von Prof. Horst Werner Stürzbecher, Universität Kiel

³) Freundlicherweise erhalten von PD Jochen Dahm-Daphi, Universität Hamburg

⁴) Freundlicherweise erhalten von Dr. Kerstin Borgmann, Universität Hamburg

⁵) Freundlicherweise erhalten von Prof. Georg Mayr, Universität Hamburg

⁶) Freundlicherweise erhalten von Prof. Klaus Pantel, Universität Hamburg

⁷) Freundlicherweise erhalten von Prof. Bernard Salles, Universität Toulouse

Tabelle 3: Verwendete Normalfibroblasten.

Zelllinie	EGFR	KRas	p53
HSF1	wildtyp	wildtyp	wildtyp
HSF13	wildtyp	wildtyp	wildtyp
HSF14	wildtyp	wildtyp	wildtyp

3.3 Zellkultur

Die Zelllinien wurden in 25 cm² und 75 cm² Zellkulturflaschen bei 10 % CO₂, 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Dafür wurde das Wachstumsmedium DMEM unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Passagierung der Zellen erfolgte vor Erreichen der Konfluenz, alle drei bis vier Tage. Dazu wurde das Medium abgesaugt und 4-8 ml EDTA-Trypsin auf den Zellrasen pipettiert. Nach einer Minute Einwirkzeit wurde das EDTA-Trypsin abgesaugt und die Zellkulturflasche verschlossen bei 37 °C in den Wärmeschrank gestellt. Sobald die Zellen anfangen sich abzulösen wurden 5-10 ml frisches Medium in die Flasche gegeben. Durch vorsichtiges Aufnehmen der Zellsuspension und anschließende Spülung des Flaschenbodens wurden alle Zellen abgelöst und vereinzelt. Die Bestimmung der Zellzahl dieser Suspension erfolgte mit Hilfe des Coulter-Counters. Durch die nun bekannte Zellzahl pro Milliliter kann die gewünschte Zellzahl mit frischem Wachstumsmedium in neue Zellkulturflaschen ausgesät werden.

3.4 Spezifischer Proteinnachweis mittels Western Blot

Die verschiedenen Proteine eines Zellextraktes lassen sich der Größe nach durch die denaturierende Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) auftrennen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an einer leitfähigen Gelmatrix wandern die Proteine in Richtung Anode. Die Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld ist von der Form, Ladung und Masse der Moleküle abhängig. Zur Aufspaltung der Disulfidbrücken wurde DTT benutzt. Zur Überdeckung der Proteineigenladung wurde das anionische Detergenz SDS hinzugegeben. Zur Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur wurden die Proteine im kochenden

Wasserbad denaturiert, so dass zur Auftrennung allein die Masse die Wanderung im Gel beeinflusste.

Zur Detektion werden die Proteine im Western Blot von dem Gel auf eine Trägermembran überführt und anschließend mit Antikörpern inkubiert. Diese Antikörper binden spezifisch an definierte Stellen des zu detektierenden Proteins. Durch einen mit Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper, der an das Fc-Fragment des ersten Antikörpers bindet, wird bei Zugabe des entsprechenden Substrates eine Lichtreaktion ausgelöst, welche sich durch eine hochsensitive Kamera oder durch die Belichtung eines Filmes sichtbar machen lässt. Ein während der Gelelektrophorese mitgeführter Molekulargewichtsmarker ermöglicht eine Größenordnung der Proteine.

3.4.1 Gesamtzellproteinextraktion "snap freeze"

Die Extraktion der Zellproteine mittels der "snap freeze" Methode erfolgte von nahezu konfluent gewachsenen Zellkulturen in 25 cm² Zellkulturflaschen. Nach dem Absaugen des Wachstumsmediums wurde der Zellrasen mit eiskaltem TBS-Puffer gespült. Nach vollständigem Absaugen des Puffers wurden die Zellkulturflaschen sofort auf Trockeneis gestellt. Die gefrorenen Zellen wurden unter Zugabe von 70 µl detergentenhaltigem Extraktionspuffer in den Flaschen aufgetaut und mit einem Cell-Scraper vom Boden abgelöst. Die Suspension wurde mit einer 20 G Kanüle und einer 1 ml Spritze in ein Microtube überführt und anschließend fünf Mal durch die Kanüle aspiriert, um die DNA zu scheren. Anschließend wurde das eisgekühlte Extrakt für 15 Minuten bei 4 °C und 13000 g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden in sterile, vorgekühlte Microtubes überführt und bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Proteinquantifizierung mit dem BCA-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch die Bicinchoninsäure-Methode (BCA-Assay). In dieser Modifizierung der Biuret-Methode werden Cu²⁺-Ionen in einer alkalischen Proteinlösung zu Cu⁺-Ionen reduziert. Anschließend bilden die Cu⁺-Ionen mit BCA einen violetten Farbkomplex dessen Konzentration photometrisch bei 562 nm bestimmt werden kann. Der lineare Messbereich dieser Methode liegt in einem Proteinkonzentrationsbereich von 20 – 2000 µg/ml. Als Eichreihe diente Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0 – 1000 µg/ml.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Zellextrakt wurden 2 µl Zellextrakt und 48 µl destilliertes Wasser gemischt. Als Untergrundkontrolle wurde statt des

Zellextrakt 2 μ l Extraktionspuffer verwendet. Die Proben wurden mit 1 ml Farbreagenz versetzt, das zu 50 Teilen aus Reagenz A und einem Teil Reagenz B bestand. Nach dem Mischen der Proben wurden diese für 30 Minuten in einem 37 °C warmen Wasserbad belassen. Je nach Menge des Proteinanteils verfärbte sich die Probe von grün nach violett. Anschließend wurden die Proben in Küvetten überführt und die Absorption im Photometer bei 562 nm gemessen. Anhand der Eichreihe war nun eine Berechnung der Proteinkonzentration der Proben möglich.

3.4.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum spezifischen Nachweis der Proteine aus den Zellextrakten wurden die bei -80 °C gelagerten Zellextrakte auf Eis aufgetaut. Während dieser Zeit wurden das Gel und besonders die Geltaschen mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt und in den Kühlschrank gestellt. Eine definierte Menge Zellextrakt wurde mit 5 μ l des fünffach konzentrierten Probenpuffers versetzt und mit der entsprechenden Menge destilliertem Wasser auf 25 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach dem Mischen der Proben wurden diese bei 4 °C für wenige Sekunden zentrifugiert. Danach wurden die Proben für fünf Minuten zur Denaturierung in ein kochendes Wasserbad gestellt und dann sofort auf Eis abgekühlt. Nach dem Zentrifugieren der Proben für eine Minute bei 4 °C und 13000 rpm wurden diese in die Geltaschen pipettiert. Mindestens eine Geltasche wurde mit einem sichtbaren Farbmarker befüllt, der den Fortschritt der Proteinwanderung im Gel, sowie anschließend die Effizienz des Blots anzeigt. Mindestens eine weitere Geltasche wurde mit einem Molekulargewichtsmarker befüllt, der erst unter der Reaktion mit ECL sichtbar wird.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einer Sammelphase für 5 Minuten bei 100 V und anschließender Trennphase mit 200 V über 40 Minuten.

3.4.4 Proteintransfer (Western Blot)

Zum Überführen der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran (Nitrocellulose) wurde zunächst die Membran in destilliertem Wasser angefeuchtet und dann für 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Ebenfalls wurden zwei Blotschwämme und zwei auf Gelgröße zurechtgeschnittene Filterpapiere in Transferpuffer eingelegt. Das Gel wurde aus der Gelkammer herausgenommen, die Sammeltaschen und der untere Rand des Gels entfernt und das Gel anschließend

ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Mit Hilfe eines der Filterpapiere wurde das Gel für die Blotschichtung in die Blothalterung überführt. Die komplette Schichtung bestand, ausgehend von der Kathode, aus Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier und Schwamm. Diese wurde dann anschließend in die Blotkammer überführt, die dann mit eisgekühltem Transferpuffer befüllt wurde. Als zusätzliche Kühlung wurde in die Blotkammer noch der dafür vorgesehene Kühlakku eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte über Nacht (17 – 20 Stunden) bei 4 °C und 10 V sowie am nächsten Tag zusätzlich für 30 Minuten bei 4 °C mit 100 V (max. 1600 mA).

3.4.5 Detektion und Auswertung der Proteinsignale

Nach Ende des Proteintransfers wurde die Membran zunächst kurz mit 1x konzentriertem TBS-Puffer abgespült und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur in 1x konzentriertem TBS-Puffer gewaschen. Danach folgte die Blockierung, die der Absättigung freier, unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran dient. Dazu wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Proteinlösung (Magermilch) geschwenkt. Nach der Blockierung wurde die Membran kurz mit TBS-Tween abgespült und dann im ersten Waschschrift für einige Minuten in TBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert. Es folgte ein weiteres Waschen der Membran in TBS-Tween und dann die Inkubation mit dem zweiten (Peroxidase gekoppelten) Antikörper. Nach einem wiederholten Waschen wurde die Membran für eine Minute mit ECL-Lösung benetzt, zwischen zwei durchsichtige Plastikfolien gelegt und zur Detektion mit einer lichtsensitiven Kamera (Night Owl) aufgenommen. Diese Kamera ermöglicht eine genaue Quantifizierung der Proteinsignale über die entstehenden Lichtsignale. Die durch die Peroxidase vermittelte Oxidation von Luminol entstandene Lichtreaktion wird in einer dunklen Kammer von der Kamera aufgenommen und als Graustufenbild in eine dazugehörige Software übertragen. Zur Auswertung wurden später identische Quadrate über die Signale und die jeweiligen Hintergründe gelegt. So konnte zunächst jedes Signal durch Subtraktion des Hintergrundwertes korrigiert werden. Eine Normierung erfolgte anschließend durch Korrektur um die Actin-Signale. Aus dem Quotient Proteinsignal/Actinsignal ergibt sich ein relativer Wert zur besseren Vergleichbarkeit. Zusätzlich wurden lichtsensitive Röntgenfilme belichtet (siehe dazu Abbildung 6).

Zur Detektion mehrerer Proteine nacheinander wurde dieses Prozedere mit den jeweils spezifischen Antikörpern wiederholt. In diesem Fall erfolgte vor der erneuten Blockierung noch ein zehnminütiger Waschschrift in TBS-Tween, um die ECL-Lösung zu entfernen. Während dieser Prozeduren wurde das Gel zur Kontrollfärbung für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel für eine Minute in Methanol fixiert und danach mit Entfärbelösung entfärbt. Am Ende dieses Verfahrens waren die eventuell im Gel verbliebenen Proteinreste zu erkennen. So war eine Aussage über die Qualität des Proteintransfers möglich.

Tabelle 4: Nachweisbedingungen der spezifischen Zielproteine.

Zielprotein →	DNA-PKcs	EGFR	XRCC1	Actin
Blockierung	1 h, 10 % MM	1 h, 5 % BSA	1 h, 5 % MM	30 Min. 5 % MM
1. Waschen	1x kurz, 1x 10 Min.	1x kurz, 3x5 Min.	1x kurz, 1x 10 Min.	1x kurz, 1x 10 Min.
1. Antikörper	Anti-DNAPKcs aus Rabbit Ab-1 / PC127 Calbiochem 1:800 (5 % MM) über Nacht (4 °C)	Anti-EGFR aus Rabbit #2232 Cell Signalling 1:2000 (5 % BSA) über Nacht (4 °C)	Anti-XRCC1 aus Mouse clone144 R+D Systems 1:1250 (5 % MM) über Nacht (4 °C)	Anti-Actin aus Mouse Sigma 1:10000 (5 % MM) 20 Min. (RT)
2. Waschen	1x kurz, 3x10 Min.	1x kurz, 6x5 Min.	1x kurz, 3x10 Min.	1x kurz, 3x10 Min.
2. Antikörper 1h bei Raumtemperatur	Anti-Rabbit NA934, Amersham 1:1500 (5 % MM)	Anti-Rabbit NA934, Amersham 1:1500 (5 % BSA)	Anti-Mouse NA931, Amersham 1:1000 (5 % MM)	Anti-Mouse NA931, Amersham 1:1000 (5 % MM)
3. Waschen	1x kurz, 4x15 Min.	1x kurz, 6x5 Min.	1x kurz, 4x15 Min.	1x kurz, 4x15 Min.

3.5 RNA-Interferenz

Das Prinzip der RNA-Interferenzmethode (RNAi) ist die posttranskriptionale Gensuppression. Wird ein Stück künstlich erzeugte einzelsträngige RNA (siRNA) in eine Zelle eingeschleust, die komplementär zu einer von der Zelle produzierten mRNA ist, bildet sich aus beiden ein Komplex, der von der Zelle über den RNA-induced silencing complex (RISC) abgebaut wird. Die Translation einer speziellen mRNA kann so unterdrückt, und die Produktion des entsprechenden Proteins auf diesem Weg vermindert werden. Als Kontrolle wird zusätzlich eine unspezifische siRNA (scrRNA) mitgeführt, um den Effekt des Transfektionsablaufes auf die Zelle zu kontrollieren. Die

Transfektion beruht auf dem Prinzip der Lipofektion, also der Bildung von Liposomen, die mit ihrer umgebenden Lipid-Doppelschicht hydrophile Substanzen wie RNA in eukaryote Zellen einschleusen können.

3.5.1 Transfektion der Zellen

Zur Suppression der Proteinbiosynthese des EGFR wurden Zelllinien mit unterschiedlichem EGFR-Basallevel (FaDuDD, HSC4 und UT-SCC-8) ausgewählt und mit siRNA transfiziert. Zur Vorbereitung wurden diese Zelllinien über drei bis vier Passagen in RNase-freiem Medium kultiviert. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu 30-50 Prozent konfluent waren. Eine Stunde vor Beginn der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und 2,5 ml neues RNase-freies Medium ohne FCS und Penicillin/Streptomycin in die Flaschen pipettiert. Während dieser Stunde wurde die si- und scrRNA im Dunklen vorsichtig mit dem lichtempfindlichen OptiMEM vermischt, so dass Endkonzentrationen von 33 und 100 nM si/scrRNA eingestellt wurden. Als Transfektionsagens wurde Lipofectamin 2000 (LFA) eingesetzt. Die LFA-Stammlösung wurde zunächst aufgemischt und dann im Verhältnis 1:50 mit OptiMEM verdünnt. Beide Ansätze wurden dann für mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde dann die verdünnte si/scrRNA mit dem verdünnten LFA nach dem dargestellten Schema (Tabelle 5) vorsichtig vermischt. Zur Komplexbildung wurden die Ansätze für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei nach den ersten 10 Minuten noch einmal mit der Pipette gemischt wurde. Nach dieser Inkubation wurden je 500 µl Komplex-Lösung in die jeweiligen Zellkulturflaschen gegeben und mit dem vorhandenen Medium vermischt. Die Transfektion der Zellen erfolgte für 6,5 Stunden. Anschließend wurde in jede Zellkulturflasche zum Verdünnen des Transfektionsagens noch zusätzlich 2 ml RNase freies Medium + FCS hinzugefügt. Nach 48 bzw. 72 Stunden erfolgte die Proteinextraktion nach der Methode „snap freeze“ sowie der Proteinnachweis mittels Western Blot.

Tabelle 5: Pipettierschema für die Transfektion von Zellen mit si/scrRNA.

Zellkulturflasche	LFA +	OptiMEM	si/scrRNA +	OptiMEM	Zeit
1	0	250 µl	0	250 µl	48 h
2	0	250 µl	0	250 µl	72 h
3	5 µl	245 µl	0	250 µl	48 h
4	5 µl	245 µl	0	250 µl	72 h
5	5 µl	245 µl	5 µl (si)	245 µl	48 h
6	5 µl	245 µl	15 µl (si)	235 µl	48 h
7	5 µl	245 µl	5 µl (si)	245 µl	72 h
8	5 µl	245 µl	15 µl (si)	235 µl	72 h
9	5 µl	245 µl	5 µl (scr)	245 µl	48 h
10	5 µl	245 µl	15 µl (scr)	235 µl	48 h
11	5 µl	245 µl	5 µl (scr)	245 µl	72 h
12	5 µl	245 µl	15 µl (scr)	235 µl	72 h

3.6 Verwendete Substanzen, Puffer und Lösungen

- BCA Reagenz A, Sigma
- BCA Reagenz B, Sigma
- BSA (5 %) in TBS-Tween: 5 % (w/v) BSA (Albumin bovine Fraction V pH 7.0, Serva) in TBS-Tween.
- Coulter[®] ISOTON[®] II Diluent, Beckmann Coulter
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X), liquid, invitrogen
- D-MEM +4500 mg/l Glucose –Pyruvat –NaHCO₃, GIBCO™
- ECL™ Western Blotting Detections Reagents, Amersham Bioscience
- Entfärber: 13 % (v/v) Methanol (J.T. Baker); 10 % (v/v) Eisessig (Merck) in H₂O dest.
- Extraktionspuffer nach G. Lammering
 Stammlösung: 25 mM Tris-HCL (Sigma); 1,5 mM EGTA (Carl Roth); 0,5 mM EDTA (2xNa) (Sigma); 50 mM β-Glycerophosphate (Sigma); 1 mM Na-Orthovanadat (Sigma); 1 mM Na-Pyrophosphate (Sigma); 1 mM Benzamidine; pH 7,4 eingestellt.
 Gebrauchspuffer: 9,2 ml Stammlösung; 5 % (v/v) Glycerol (Sigma); 1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma); 1 mini-complete Tablette (Roche Diagnostics); 100 µl Phosphatase-Cocktail 1 (Sigma); 100 µl Phosphatase-Cocktail 2 (Sigma)

- FBS (FCS) Superior, Biochrom AG
- Film-Entwickler: 10 % (v/v) Eukobrom (Tetenal) in Leitungswasser.
- Film-Fixierer: 20 % (v/v) Superfix plus (Tetenal) in Leitungswasser.
- Kaleidoskope Prestained Standards, Bio Rad
(Molekulargewichtsmarker von 6,5 - 200 kDa)
- Laufpuffer: 10 % (v/v) 10xTG-Puffes; 0,1 % (w/v) SDS (Carl Roth) ; in H₂O dest.
- L-Glutamine 200 mM 100x, GIBCO™
- Lipofectamine™ 2000, invitrogen
- Magermilch (5 %) in TBS-Tween: 5 % (w/v) Magermilchpulver (Naturaflor, Töpfer) in TBS-Tween.
- Magermilch (10 %) in TBS-Tween: 10 % (w/v) Magermilchpulver (Naturaflor, Töpfer) in TBS-Tween.
- MagicMark™ XP Western Protein Standard, invitrogen
(Molekulargewichtsmarker von 20- 220 kDa)
- Natriumbicarbonat Hybri-max®, Sigma
- Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (1X), liquid, GIBCO™
- Pen Strep, GIBCO™
- Probenpuffer nach Lämmli: 50 mM Tris-HCl (Sigma), 100 mM DTT (Sigma),
2 % SDS (w/v) (Carl Roth), 0,1 % (w/v) Bromphenolblau (Sigma), 10 % (v/v)
Glycerol (Sigma)
- SDS (10 %): 10 % (w/v) SDS (Carl Roth GmbH); in H₂O dest.
- siRNA SMARTpool® EGFR & Non-Specific Control Pool, Dharmacon
- TBS-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5 (Sigma); 100 mM NaCl (J.T.Baker)
- TBS - Tween: 0,1 % (v/v) Tween20 (TWEEN®, Sigma) in TBS.
- TG-Puffer (10x konzentriert): 192 mM Glycin (Carl Roth GmbH); 25 mM Tris
Base (Sigma); pH sollte uneingestellt zwischen 8,1 und 8,5 liegen.
- Transferpuffer nach Towbin: 10 % (v/v) 10xTG-Puffer; 20 % (v/v) Methanol
(J.T.Baker); kühlen im Eis; 0,5 % (v/v) SDS (Carl Roth).
- Trypsin-EDTA (0.05 % Trypsin 0.53 mM EDTAx4Na) (1X) liquid, GIBCO™
- UltraPURE™ Distilled Water, DNase, RNase Free, GIBCO™

3.7 Verwendete Laborgeräte

- Bio Photometer, Eppendorf
- Criterion™ Blotter, Bio-Rad
- Criterion™ Cell, Bio-Rad
- Electrophoresis Power Supply E425, E802 und E835, Consort
- Microfuge R, Beckmann
- Miniature Shaker Typ KM 2, Edmund Bühler
- Night Owl Molecular Light Imager, EG&G Berthold; Winlight Software
- Rotamax 120, Heidolph
- Z2™ COULTER COUNTER® Cell and Particle Counter, Beckmann

3.8 Laborzubehör und Verbrauchsmaterial

- Tissue Culture Flask, Sarstedt
- Costar® Cell Scraper, Corning Inc.
- Microtube 1.5 ml, Sarstedt
- Bio-one Küvetten Halb-Mikro, Greiner
- Criterion™ Precast Gel 7,5 % Tris-HCl, 1.0 mm 18 Comb, 30 µl, Bio-Rad Laboratories
- Trans Blot® Transfer Medium, supported Nitrocellulose, Bio-Rad
- Blotschwamm
- Filterpapier, Bio-Rad
- CL - XPoser™ Clear Blue X-Ray Film, Thermo Scientific

4. ERGEBNISSE

4.1 Proteinbasallevel in verschiedenen Tumorzelllinien

Die zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien, die dreizehn Zelllinien verschiedener Tumorentitäten, sowie die drei Normalfibroblastenlinien wurden zunächst hinsichtlich der Proteinbasallevel von EGFR, DNA-PKcs und XRCC1 untersucht. Dazu wurden von allen Zelllinien, wie beschrieben, Proteinextrakte nach der „snap freeze“ Methode gewonnen und die relative Proteinkonzentration im Western Blot bestimmt (Abb. 6).

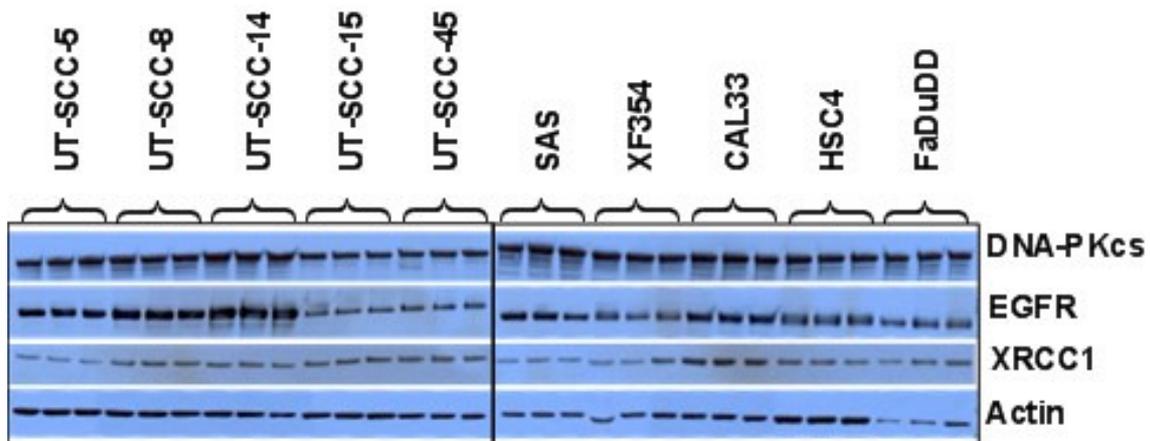


Abbildung 6: Nachweis der Proteine DNA-PKcs, EGFR, XRCC1 und Actin mittels Western Blot. Gezeigt werden exemplarisch die Proteinsignale der zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien auf einem lichtsensitiven Röntgenfilm.

Bei der Untersuchung der Proteinbasallevel zeigt sich, dass sich die Zelllinien der verschiedenen Tumorentitäten, als auch die der Plattenepithelkarzinome hinsichtlich der jeweiligen relativen Proteinkonzentration stark voneinander unterscheiden. Die drei untersuchten Normalfibroblastenlinien zeigen hingegen ähnlich niedrige Proteinbasallevel.

In der Analyse der relativen EGFR-Proteinexpression (Abb. 7 A und B) fällt zunächst die Zelllinie A431 (Plattenepithelkarzinom) mit einer relativ hohen EGFR-Proteinexpression von 4,3 auf. Des Weiteren zeigen die Zelllinien UiRad (Osteosarkom), MCF7 (Mammakarziom) und 4451 (Plattenepithelkarzinom) nahezu keine Expression von EGFR. Die Zellpaare MO59JTou/MO59KTou (Glioblastom) und Fus1/Fus9 zeigen eine sehr ähnliche relative EGFR-Expression von 0,4.

Die weiteren Zelllinien zeigen ein breites Expressionsspektrum von 0,1 (UT-SCC-15) bis 1,4 (UT-SCC-14).

Bei der Bestimmung der relativen DNA-PKcs-Proteinexpression (Abb. 7 C und D) zeigen sich ebenfalls große Unterschiede zwischen den Zelllinien. Sowohl bei den verschiedenen Tumorentitäten, als auch bei den Plattenepithelkarzinomen.

Während die Prostatakarzinomzelllinie Du145 einen DNA-PKcs-Basallevel von etwa 1 zeigt, lässt sich bei der anderen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP, sowie bei den Zelllinien A431 und H1299 (Bronchialkarzinom) eine sehr hohe relative Proteinexpression von über 3,5 feststellen. Die DNA-PKcs-defizienten Zelllinien MO59JTou und Fus9 zeigen wie erwartet keine Expression, während die korrespondierenden DNA-PKcs-profizienten Zelllinien MO59KTou und Fus1 eine relative Proteinexpression von ca. 0,5 aufweisen. Die Normalfibroblasten zeigen eine sehr geringe Expression von durchschnittlich 0,4. Die übrigen Zelllinien weisen ein breites Expressionsspektrum von 0,52 (HSC4) bis durchschnittlich 2,48 (FaDuDD) auf.

Auch bei der Bestimmung der relativen XRCC1-Proteinexpression (Abb. 7 E und F) zeigen sich große Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien. Die höchste relative Expression ist bei den Zelllinien FaDuDD mit 3,24 und H1299 mit 2,74 vorhanden. Bei der zweiten Bronchialkarzinomzelllinie A549 hingegen lässt sich ein XRCC1-Basallevel von nur 0,4 nachweisen. Die Normalfibroblasten zeigen auch für dieses Protein die geringste Expression mit durchschnittlich 0,08. Zwischen den DNA-PK-defizienten Zelllinien MO59JTou und Fus9 und den DNA-PK-profizienten Zelllinien MO59KTou und Fus1 lässt sich ein deutlicher Unterschied feststellen. Dabei zeigen MO59KTou und Fus1 eine geringe XRCC1-Expression von durchschnittlich 0,28 und 0,27, die bei MO59JTou und Fus9 mit 0,69 und 0,82 etwa doppelt so hoch ist. Besonders auffällig ist der Vergleich der beiden verschiedenen Klone der Plattenepithelkarzinomzelllinie FaDu. Während die Zelllinie FaDuTü eine XRCC1-Expression von nur 0,19 aufzeigt, lässt sich bei der Zelllinie FaDuDD eine Expression von 3,24 bestimmen.

Die übrigen Zelllinien zeigen ein breites Expressionsspektrum. Es reicht von 0,2 bei MCF7 bis zu 1,83 bei der Zelllinie CAL33.

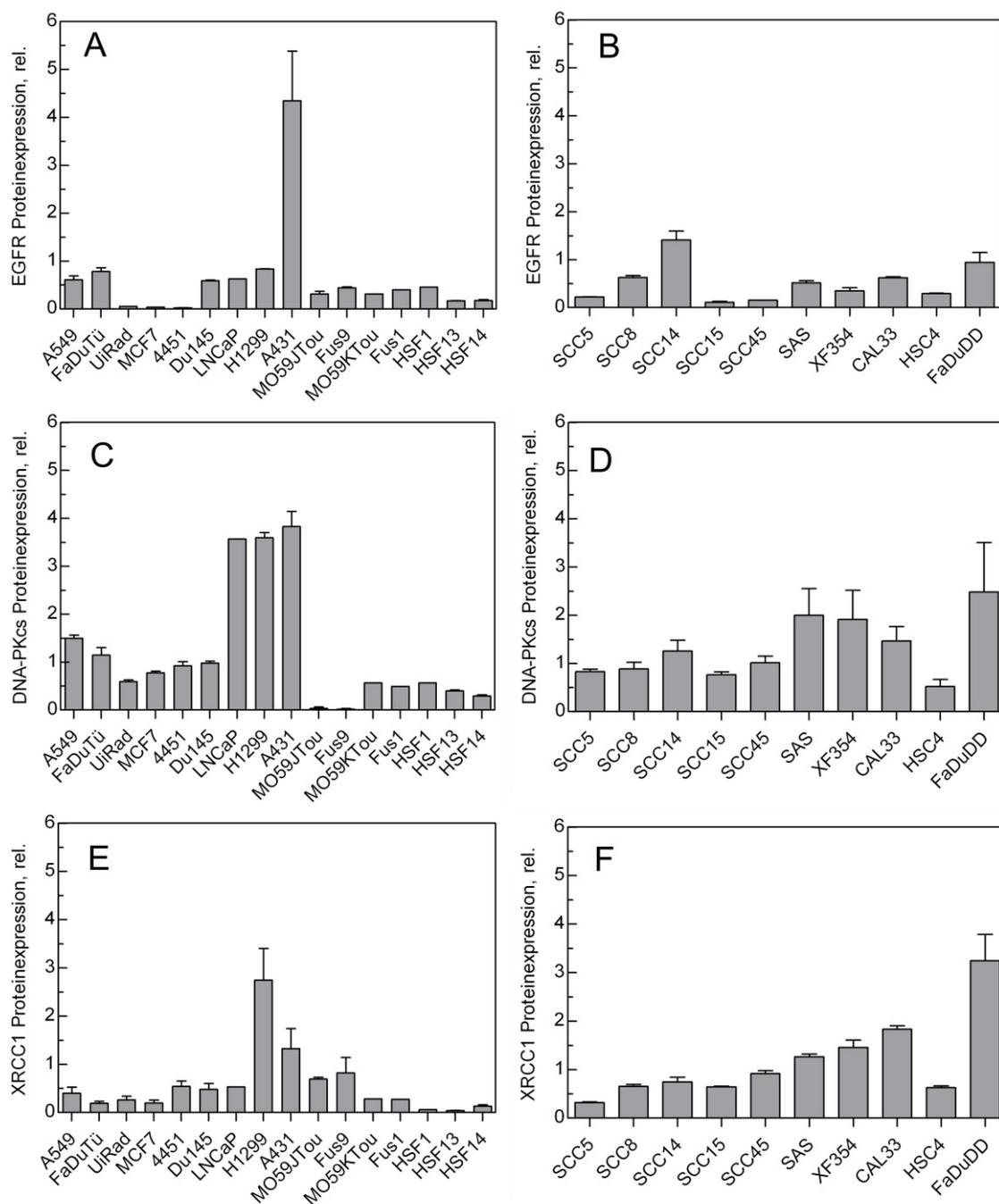


Abbildung 7: Relative Proteinexpression von Zelllinien verschiedener Tumorentitäten (A, C, E) sowie verschiedener Plattenepithelkarzinomzelllinien (B, D, F). Die Gesamtzellproteinextrakte wurde nach der Methode „snap freeze“ hergestellt. Jeweils 20µg Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Zielproteine über Western Blot bestimmt. Die Signale wurden um den Untergrund sowie um die Gelbeladung korrigiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2-6 Einzelwerten von jeweils 2-3 unabhängigen Extrakten ±SEM.

4.2 Korrelation der basalen Proteinexpression in verschiedenen Tumorzelllinien

Wie von Lo et al. (2006) diskutiert wird, gibt es Hinweise, dass der EGFR als Transkriptionsfaktor oder Cofaktor wirken kann. Um zu überprüfen, ob die hier untersuchten Proteine einer gegenseitigen oder gemeinsamen Regulation unterliegen,

wurde der basale Expressionslevel der Proteine EGFR, DNA-PKcs und XRCC1 der zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien, acht Tumorzelllinien verschiedener Entitäten und drei Normalfibroblastenlinien gegeneinander aufgetragen und ein Korrelationskoeffizient errechnet (siehe Abbildung 8). Die Zelllinien UiRad, MCF7 und 4451 wurden wegen ihres extrem niedrigen EGFR-Proteinbasallevels, die Zelllinien MO59JTou und Fus9 wegen der defizienten DNA-PK in der Berechnung der Korrelationen nicht berücksichtigt.

In Abbildung 8 A ist die relative DNA-PKcs-Expression gegen die EGFR-Expression aufgetragen. Es lässt sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,0002$) zwischen der Expression des EGF-Rezeptors und der Expression von DNA-PKcs erkennen. Dieser Zusammenhang lässt sich sowohl zwischen den zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien, als auch zwischen den Zelllinien anderer Tumorentitäten sowie bei den Normalfibroblasten feststellen.

In Abbildung 8 B ist die Expression des XRCC1 gegen die des EGFR aufgetragen. Auch hier ist ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsausmaß beider Proteine vorhanden, der jedoch nicht ganz so deutlich ausfällt ($p=0,0174$). Die zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien liegen tendenziell über der Geraden des Korrelationskoeffizienten, die Normalfibroblasten liegen aufgrund ihres niedrigen XRCC1-Proteinbasallevels etwas abseits der anderen Zelllinien, wurden aber bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten mitberücksichtigt. Die aus den oben genannten Gründen nicht berücksichtigten Zelllinien Fus9 und MO59JTou liegen beide im Mittelfeld.

Da XRCC1 von Lévy et al. (2006) als DNA-PK-Stimulations- oder möglicherweise Regulationsfaktor beschrieben wurde, wurde die Expression beider Proteine in Abbildung 8 C gegeneinander aufgetragen. Der Vergleich der XRCC1-Proteinexpression mit der DNA-PKcs-Proteinexpression lässt einen deutlichen Zusammenhang ($p=0,0001$) erkennen. Dieser Zusammenhang ist sowohl bei den zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien, als auch bei den Zelllinien anderer Tumorentitäten vorhanden. Die zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien liegen tendenziell über der Geraden des Korrelationskoeffizienten, die Normalfibroblasten liegen aufgrund ihres niedrigen XRCC1-Proteinbasallevels etwas abseits der anderen Zelllinien.

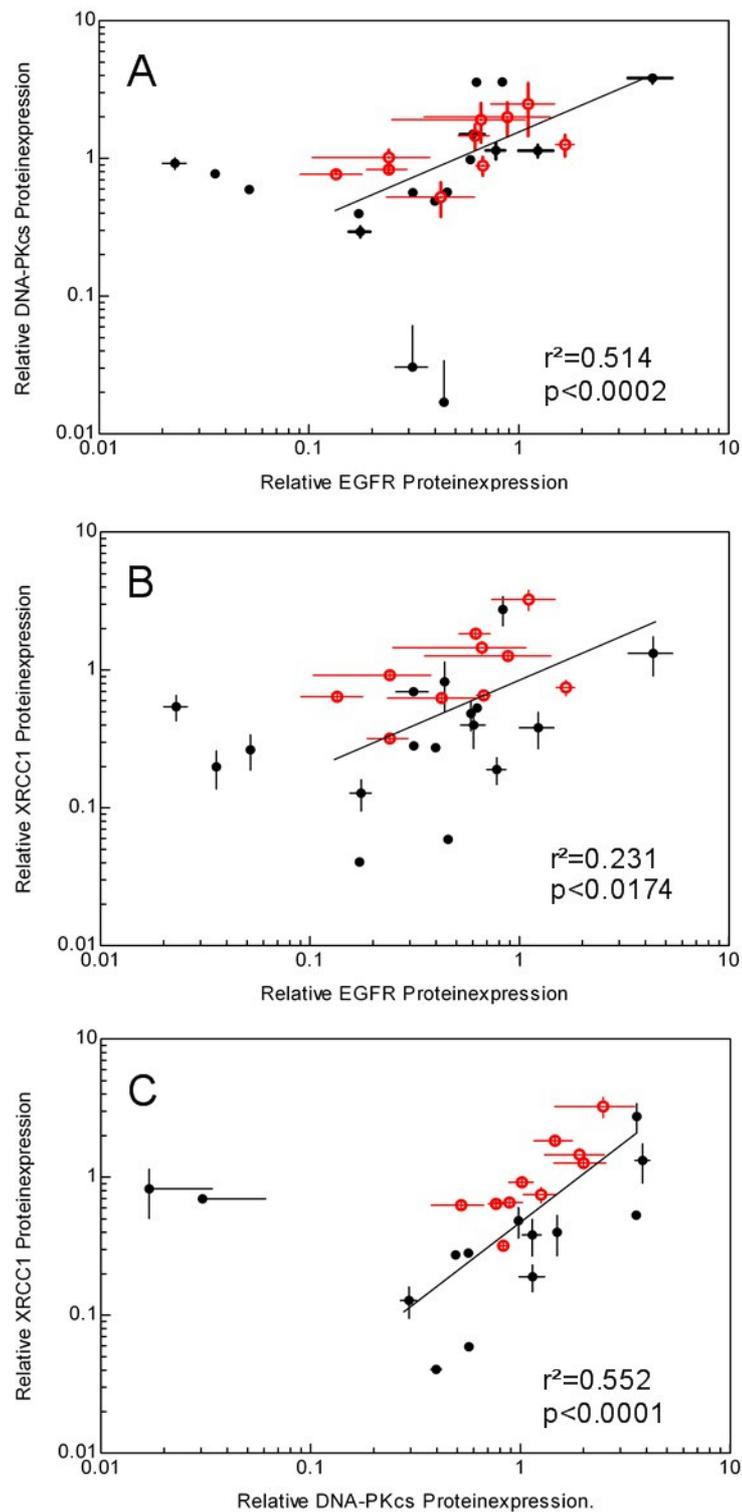


Abbildung 8: Zusammenhang der Proteinexpression in verschiedenen Tumorzelllinien.

A: DNA-PKcs aufgetragen gegen EGFR. B: XRCC1 aufgetragen gegen EGFR. C: XRCC1 aufgetragen gegen DNA-PKcs.

Dargestellt sind die Mittelwerte der basalen Proteinexpression aus 2-6 Einzelwerten von jeweils 2-3 unabhängigen Extrakten \pm SEM (aus Abbildung 7). Die zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien sind durch offene Kreise (rot), die Tumorzelllinien verschiedener Entitäten und die Normalfibroblasten durch geschlossene Kreise (schwarz) gekennzeichnet.

Die aus den oben genannten Gründen nicht berücksichtigten Zelllinien MCF7, UiRad und 4451 liegen im Mittelfeld. Die deutliche Korrelation, insbesondere in den Abbildungen 8 A und C, weist darauf hin, dass DNA-PKcs und EGFR, bzw. XRCC1 und DNA-PKcs entweder gemeinsam oder ähnlich reguliert werden, bzw. sich gegenseitig regulieren können.

4.3 Einfluss einer EGFR-Suppression auf die Expression von DNA-Reparaturproteinen

Aufgrund der zuvor ermittelten Korrelationen bei der Expression der untersuchten Proteine (siehe Abb. 8) sollte überprüft werden, ob die Expression dieser Proteine gemeinsam reguliert wird, oder ob eventuell DNA-PKcs und XRCC1 vom EGFR, mit dessen potenzieller Funktion als Transkriptionsfaktor reguliert werden. Hierzu wurde der EGFR-Proteinlevel in ausgewählten Zelllinien, wie in Material und Methoden beschrieben, mittels RNA-Interferenz (RNAi) reduziert. Die Zelllinien FaDuDD, HSC4 und UT-SCC-8 wurden aufgrund ihres deutlich unterschiedlichen EGFR-Basallevels dafür ausgewählt. Die RNAi-Transfektion erfolgte für 6,5 Stunden mit Konzentrationen von 33 und 100 nM. In jedem Versuch wurden eine unbehandelte, eine nur mit dem Transfektionsagens LFA behandelte und eine mit scrRNA transfizierte Kontrolle mitgeführt.

Die Proteinextrakte wurden 48 und 72 Stunden nach Transfektion mittels der „snap freeze“ Methode hergestellt. Die Gesamtzellproteinextrakte wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Zielproteine mit dem Western Blot nachgewiesen. Die Werte wurden um den Hintergrund korrigiert, es erfolgte keine Normierung auf Actin, um die eigentliche Signalstärke möglichst genau darstellen zu können.

Die Abbildungen 9, 10 und 11 stellen die Ergebnisse der RNAi Transfektion der drei Zelllinien dar. 9 A, 10 A und 11 A zeigen die Proteinbanden des belichteten Röntgenfilms aus dem Western Blot für die Proteine DNA-PKcs, EGFR, XRCC1 und Actin. B und C zeigen jeweils die Auswertungen der Daten für EGFR. D und E bilden die Datenauswertung für DNA-PKcs bzw. XRCC1 ab. Durch gleichmäßige Actinsignale zeigt sich auf allen Abbildungen des Western Blots eine identische Beladung des Gels. Die Daten für Actin sind unter F abgebildet.

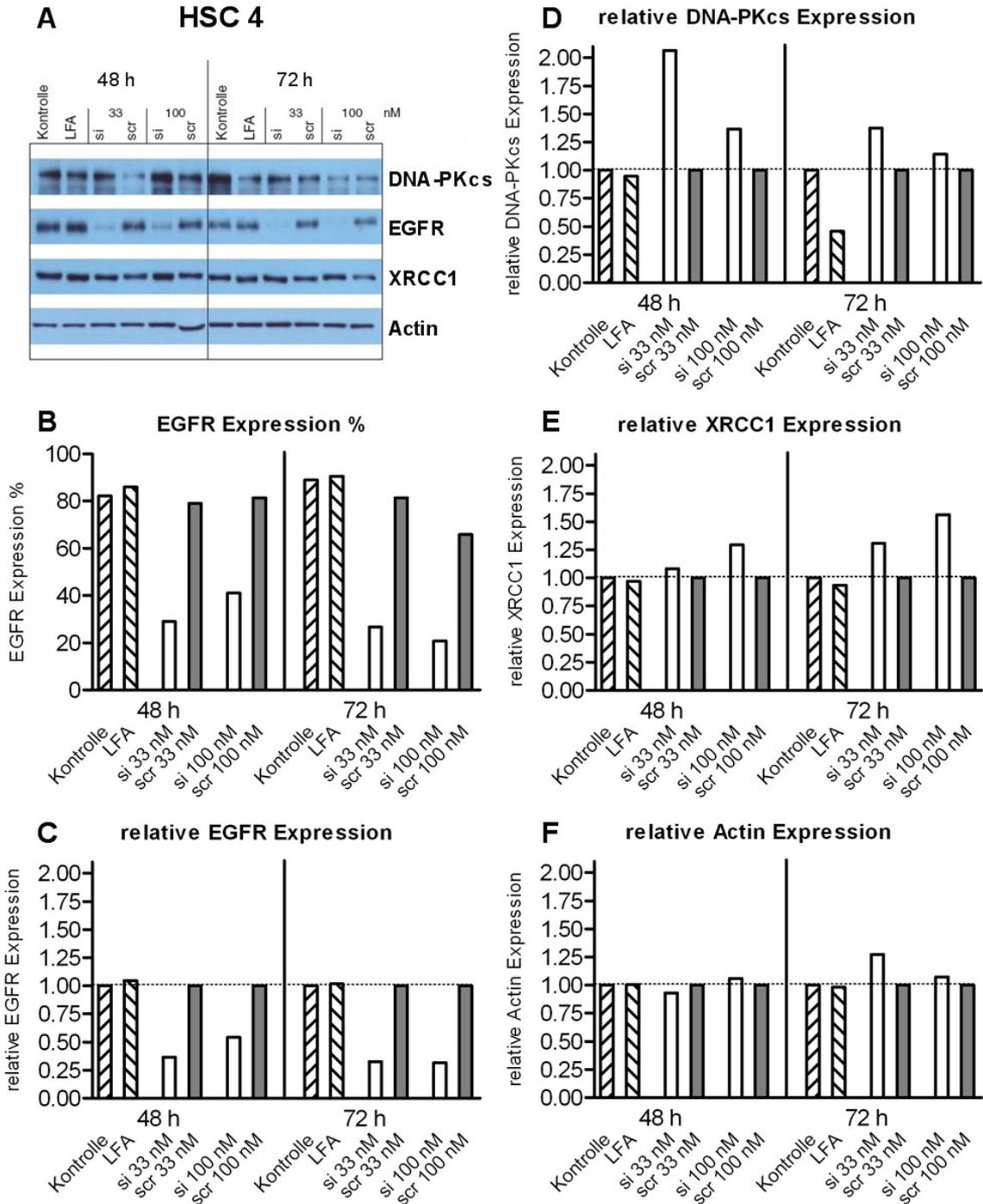


Abbildung 9: Effekt der EGFR-Suppression (RNAi) auf die Expression verschiedener Proteine der Zelllinie HSC4. Proteinsignale aus dem Western Blot (A), Datenauswertung der prozentualen (B) und relativen (C) EGFR-Proteinexpression sowie der relativen Proteinexpression von DNA-PK (D), XRCC1 (E) und Actin (F). Verwendet wurde si- und scrRNA in den Konzentrationen von 33 und 100 nM. Die Gesamtzellproteinextrakte wurden nach 48 bzw. 72 Stunden mittels der Methode „snap freeze“ hergestellt. Jeweils 20µg Protein wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt und die Zielproteine über Western Blot bestimmt. Dargestellt sind Werte nach Korrektur um den Hintergrundwert. Bei den relativen Darstellungen sind die Werte „Kontrolle“ und „scr 33/100 nM“ auf 1 normiert.

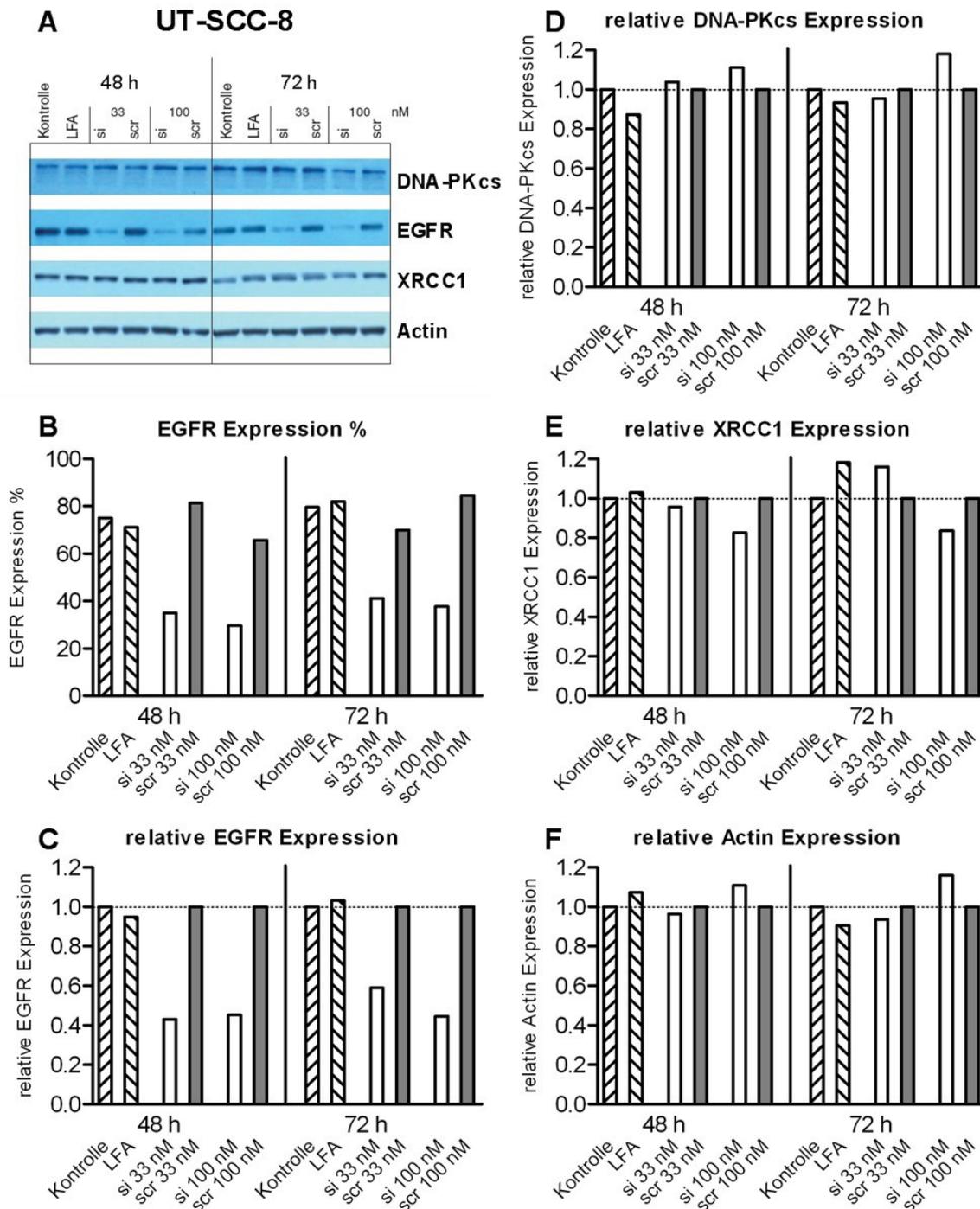


Abbildung 10: Effekt der EGFR-Suppression (RNAi) auf die Expression verschiedener Proteine der Zelllinie UT-SCC-8. Proteinsignale aus dem Western Blot (A), Datenauswertung der prozentualen (B) und relativen (C) EGFR-Proteinexpression sowie der relativen Proteinexpression von DNA-PK (D), XRCC1 (E) und Actin (F). Verwendet wurde si- und scrRNA in den Konzentrationen von 33 und 100 nM. Die Gesamtzellproteinextrakte wurden nach 48 bzw. 72 Stunden mittels der Methode „snap freeze“ hergestellt. Jeweils 20µg Protein wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt und die Zielproteine über Western Blot bestimmt. Dargestellt sind Werte nach Korrektur um den Hintergrundwert. Bei den relativen Darstellungen sind die Werte „Kontrolle“ und „scr 33/100 nM“ auf 1 normiert.

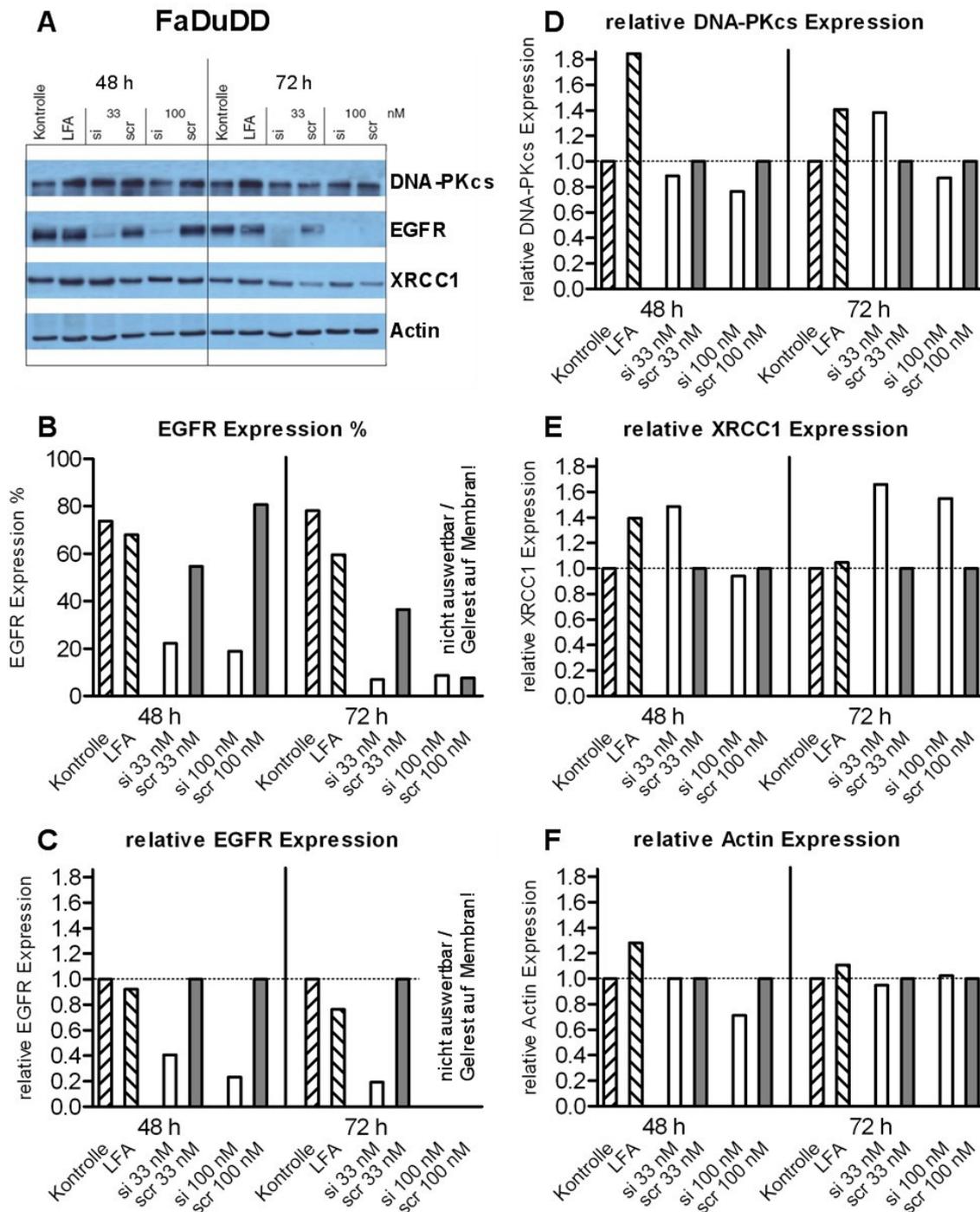


Abbildung 11: Effekt der EGFR-Suppression (RNAi) auf die Expression verschiedener Proteine der Zelllinie FaDuDD. Proteinsignale aus dem Western Blot (A), Datenauswertung der prozentualen (B) und relativen (C) EGFR-Proteinexpression sowie der relativen Proteinexpression von DNA-PK (D), XRCC1 (E) und Actin (F). Verwendet wurde si- und scrRNA in den Konzentrationen von 33 und 100 nM. Die Gesamtzellproteinextrakte wurden nach 48 bzw. 72 Stunden mittels der Methode „snap freeze“ hergestellt. Jeweils 20µg Protein wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt und die Zielproteine über Western Blot bestimmt. Dargestellt sind Werte nach Korrektur um den Hintergrundwert. Bei den relativen Darstellungen sind die Werte „Kontrolle“ und „scr 33/100 nM“ auf 1 normiert.

Mittels RNAi lässt sich die EGFR-Expression deutlich reduzieren. Es ist kein klarer und eindeutiger Effekt auf die Expression der untersuchten Reparaturproteine erkennbar. Die Effizienz der Transfektion der Zelllinie HSC4 lässt sich in den Abbildungen 9 A, B und C an der deutlichen Reduktion der EGFR-Signalstärke erkennen. Es zeigt sich bei den unbehandelten Kontrollen, bei LFA und scrRNA nach Korrektur um den Hintergrundwert eine relativ konstante EGFR-Proteinexpression von durchschnittlich 82 Prozent (B). Die Werte der EGFR-Expression von den siRNA-transfizierten Zellen sind sowohl nach 48 und 72 Stunden, sowie mit einer siRNA-Konzentration von 33 und 100 nM wie gewünscht deutlich reduziert. 48 Stunden nach Transfektion lässt sich die EGFR-Expression um 55 Prozent, 72 Stunden nach Transfektion um 68 Prozent reduzieren (C). Insgesamt zeigen sich bei den siRNA-Konzentrationen ähnlich wirksam. 48 Stunden nach Transfektion ist die EGFR-Reduktion bei einer siRNA-Konzentration von 33 nM stärker, 72 Stunden nach Transfektion ist kein Unterschied feststellbar. Das Actinsignal (F) zeigt eine identische Beladung der Geltaschen. Die Transfektion mit RNAi gegen EGFR zeigt in der relativen Darstellung (D und E) durch die Zunahme der mit siRNA behandelten Probe einen vermeintlichen Effekt auf die Proteinexpression von DNA-PKcs und XRCC1. Der hohe relative DNA-PKcs Wert von über 2 lässt sich durch die Normierung auf das schwache Proteinsignal scr 33 nM / 48 Std. erklären. Vergleichend mit den Auswertungen der DNA-PKcs und XRCC1 Proteinsignale der Zelllinien UT-SCC-8 und FaDuDD (Abbildungen 10 und 11, D und E) sind die Auswirkungen der Transfektion mit RNAi gegen EGFR für diese Proteine nicht regelhaft.

Bei der Transfektion der Zelllinie UT-SCC-8 lässt sich ebenfalls eine deutliche Suppression des EGFR-Proteinexpressionslevels durch RNAi feststellen (Abb. 10 A, B und C). Von durchschnittlich 76 Prozent bei allen Kontrollen (B) wird der EGFR-Level um durchschnittlich 52 Prozent reduziert. 48 Stunden nach Transfektion ist die Reduktion, bezogen auf die Werte nach 72 Stunden, etwas stärker. Beide eingesetzte Konzentrationen (33 / 100 nM) haben eine sehr ähnliche Effizienz. Das Actinsignal (F) zeigt eine identische Gelbeladung. Die deutliche EGFR-Reduktion zeigt keinen nennenswerten Effekt auf die Expression von XRCC1 und DNA-PKcs (D und E).

Die Abbildungen 11 A, B und C zeigen den deutlichen Effekt der RNAi-Behandlung auf den EGFR-Proteinlevel in FaDuDD-Tumorzellen 48 Stunden nach Transfektion. Auf der Membran im Western Blot waren im Bereich der EGFR-Bande teilweise deutliche Gelreste zu erkennen, die eine Auswertung der EGFR-Signale 72 Stunden nach Transfektion unmöglich machen. Im auswertbaren Abschnitt zeigt sich eine stärkere Schwankung der Kontrollen mit einem EGFR-Level von durchschnittlich 69 Prozent (B). Nach Transfektion ist der EGFR-Level um 68 Prozent geringer, wobei die siRNA-Konzentration von 100 nM einen besseren Effekt erzielt. Die Reduktion des EGFR hat keinen eindeutigen Effekt auf die Expression von XRCC1 oder DNA-PKcs (D und E). Die Auswertung für Actin (F) zeigt auch hier eine gleichmäßige Gelbeladung an.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich durch die Transfektion mit EGFR-gerichteter spezifischer RNAi in allen drei untersuchten Zelllinien unabhängig vom EGFR-Proteinbasallevel, eine gute Reduktion der EGFR-Expression um etwa 60 Prozent erzielen ließ. Im Vergleich der siRNA-Konzentrationen zeigen sich beide eingesetzten Konzentrationen ähnlich effektiv. Durch eine höhere Konzentration der siRNA lässt sich der erzielte Effekt nicht verbessern. Die siRNA-Konzentration von 33 nM ist also ausreichend. Die unterschiedlichen Einwirkzeiten von 48 und 72 Stunden nach Transfektion zeigen in der Reduktion des EGFR insgesamt keinen Unterschied. Durch die längere Einwirkzeit von 72 Stunden lässt sich der erzielte Effekt nicht verbessern. Unter diesen Versuchsbedingungen ließ sich durch die deutliche Reduktion von EGFR keine entsprechende Reduktion des Proteinlevels von XRCC1 oder DNA-PKcs beobachten.

5. DISKUSSION

Die Strahlentherapie gehört als Grundpfeiler der Onkologie nach wie vor zum festen Behandlungsschema bei einer Vielzahl von bösartigen Neubildungen. Es ist zu beobachten, dass verschiedene Tumore unterschiedlich gut auf die Strahlentherapie ansprechen. Der Wirkmechanismus der Strahlentherapie beruht im Wesentlichen auf der Induktion von Doppelstrangbrüchen und dem damit verbundenen Tumorzelltod. Die Strahlenempfindlichkeit einer Zelle wird dabei durch die Effektivität der Doppelstrangbruchreparatur bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine geringe Änderung in der Doppelstrangbruchreparaturkapazität einen großen Effekt auf das Zellüberleben nach Bestrahlung hat (Kasten-Pisula et al., 2005). Der entscheidende zelluläre Reparaturmechanismus für die Beseitigung von Doppelstrangbrüchen ist das nicht-homologe Endjoining (NHEJ). Es gibt Hinweise aus aggressiven Tumorzelllinien, dass ein hoher Level von DNA-Reparaturproteinen des nicht-homologen Endjoinings mit einer erhöhten Menge des epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR einhergeht (Um et al., 2004). Der EGFR mit seinen nachgeschalteten Signalwegen ist für das Zellüberleben essentiell. Er gibt der Zelle u. a. das Signal für Genexpression und Proliferation. In Tumoren sind diese Signalwege aufgrund einer EGFR-Überexpression häufig fehlreguliert (Lo und Hung, 2006, Hatanpaa et al., 2010), was eine erhöhte Aggressivität, Resistenz und insgesamt schlechte Prognose zur Folge hat. Aufgrund dieser Daten ist zu vermuten, dass die Menge des EGFR mit der Menge an DNA-Reparaturproteinen des NHEJ korreliert und dies Einfluss auf die, für das Zellüberleben essentielle Doppelstrangbruchreparatur nach Bestrahlung haben müsste. Dieser Zusammenhang könnte die unterschiedliche Radiosensitivität von Tumorzellen zum Teil miterklären.

5.1 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen EGFR-Expression und Expression essentieller DNA-Reparaturproteine in verschiedenen Tumorzelllinien genauer zu untersuchen. Dazu wurden zunächst die Basallevel des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR, der DNA-PKcs als zentrales Protein des NHEJ und das XRCC1 als Protein der Basenexzisionsreparatur (BER) und Stimulator der DNA-PK-Aktivität (Lévy et al., 2006) untersucht.

Es wurden dreizehn Zelllinien verschiedener Tumorentitäten verwendet, um eine Aussage über die Variation der untersuchten Basallevel in verschiedenen Tumorentitäten treffen zu können. Außerdem wurden zehn Zelllinien derselben Tumorentität (Plattenepithelkarzinom) einbezogen, um einen Unterschied der Proteinbasallevel innerhalb einer Tumorentität zu bestimmen. Drei Normalfibroblastenzelllinien wurden verwendet, um einen Bezug zum gesunden Gewebe herstellen zu können.

Um Hinweise auf die Regulationsmechanismen zwischen EGFR und DNA-Reparaturproteinen zu gewinnen, wurden drei Plattenepithelkarzinomzelllinien mit unterschiedlichem EGFR-Basallevel ausgewählt. Diese Zelllinien wurden mit RNA-Interferenz (RNAi) gegen EGFR behandelt, um den Effekt einer EGFR-Suppression auf die Expression von DNA-Reparaturproteinen zu untersuchen.

5.2 Basale EGFR-Proteinexpression

Die Bestimmung der basalen EGFR-Expression hat gezeigt, dass generell eine große Heterogenität im Ausmaß der EGFR-Expression besteht. Im Vergleich der verschiedenen Tumorentitäten variiert die EGFR-Expression erheblich. Während der höchste gemessene Wert etwa 19fach über dem Mittelwert der Normalfibroblasten liegt, zeigt sich der niedrigste Wert nahezu bei Null und damit etwa 11fach unterhalb des Normalfibroblastenmittelwertes.

Bei den zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien (SCC) findet sich ebenfalls eine große Variationsbreite der EGFR-Expression um den Faktor 14. Im Vergleich zu den Normalfibroblasten liegt der niedrigste Wert ca. 2,3fach unterhalb des Normalfibroblastenmittelwertes, der höchste um den Faktor 6 darüber. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch innerhalb einer Tumorentität große Unterschiede in der EGFR-Expression zu finden sind. Außerdem zeigen die Daten, dass Tumorzellen nicht immer eine EGFR-Überexpression zeigen, sondern auch EGFR-Level unterhalb des EGFR-Level von Normalzellen zu finden sind. Ob dabei eine Korrelation zwischen EGFR-Level und Proliferation bzw. Aggressivität des Tumors vorliegt, kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Die Ursachen einer veränderten EGFR-Expression sind vielseitig. Chromosomen- und Genamplifikation können eine mögliche Ursache für eine EGFR-Überexpression sein. Eine erhöhte Anzahl an EGFR codierenden DNA-Sequenzen kann dazu führen, dass mehr EGFR-mRNA transkribiert und translatiert wird. Die Literaturdaten bezüglich des

Einflusses von Chromosomenamplifikation auf die EGFR-Expression sind z. T. widersprüchlich. Eine Korrelation zwischen Chromosomenamplifikation und EGFR-Überexpression beim Magenkarzinom wurde von Liang et al. (2008) untersucht. In 19 Prozent der Fälle führte eine Chromosomenamplifikation des Chromosoms 7 zu einer Erhöhung der EGFR-Genanzahl, die sich jedoch nicht entsprechend auf die EGFR-Proteinmenge übertrug. Romeike et al. (2001) beschreiben für das Glioblastoma multiforme hingegen eine starke Korrelation zwischen dem immunohistochemischen Nachweis von EGFR und der Anzahl der Chromosom 7-Multiplikation.

Bezüglich des Einflusses von Genamplifikationen konnten Experimente aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die verwendeten SCC-Zelllinien mit extremer EGFR-Überexpression auch Genamplifikationen auf Chromosom 7 aufweisen, während bei SCC-Zelllinien mit keiner oder moderater EGFR-Expression keine Genamplifikationen zu finden sind (Kasten-Pisula et al., im Druck).

Als weitere Ursache einer EGFR-Überexpression wird die Anzahl der CA-repeats in Intron 1 des EGFR-Gens diskutiert. Die Anzahl der Wiederholungen des CA-Dinukleotids in der einem Enhancer vorgeschalteten Sequenz korreliert invers mit der Synthese von EGFR-mRNA sowie mit der EGFR-Proteinmenge. Dies konnte z. B. beim Mammakarzinom (Brandt et al., 2006) bzw. bei Karzinomen des Oropharynx (Etienne-Grimaldi et al., 2005) gezeigt werden. Kurze CA-repeats führen also zu einem hohen EGFR-Level, lange CA-repeats zu einem geringeren EGFR-Level. In Bezug auf die in dieser Arbeit verwendeten Plattenepithelkarzinomzelllinien konnte in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Anzahl der CA-repeats relativ konstant zwischen 16 und 19 liegt und damit als Erklärung für die Variationsbreite der EGFR-Expression ausscheidet (Kasten-Pisula et al., im Druck).

Eine veränderte Expression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren kommt auch als möglicher Parameter für die EGFR-Regulation in Betracht. Eine Überexpression oder erhöhte Aktivität entsprechender Transkriptionsfaktoren könnte zu einer abnormal hohen Expression von EGFR führen. Dabei scheint Sp1 von besonderer Bedeutung zu sein. Johnson et al. (1988) konnten Sp1 mit vier Bindungsstellen am EGFR-Promotor als Transkriptionsfaktor für EGFR identifizieren. Kitadai et al. (1992) haben eine Untersuchung an Magenkarzinomzelllinien ohne EGFR-Genamplifikation durchgeführt. Es konnte in allen sieben Zelllinien eine Überexpression von mRNA des Transkriptionsfaktors Sp1 gefunden werden, die in sechs Fällen eng mit der Expression

von EGFR-mRNA korrelierte. In zusätzlich untersuchten zwölf von achtzehn Gewebeproben wurde im Vergleich zu normaler Mucosa eine Überexpression von Sp1 gefunden. In diesen Fällen fand sich auch ein hoher Level von EGFR-mRNA.

Auch Unterschiede einzelner Nukleotide, sog. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), können den EGFR-Level beeinflussen. Bisher sind zwei in der EGFR-Promotorregion lokalisierte SNPs (-216G/T und -191C/A) im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression des EGFR beschrieben (Nomura et al., 2007). Als möglichen Mechanismus konnten Liu et al. (2005) zeigen, dass der SNP -216 im Bereich der Sp1-Bindungsstelle lokalisiert ist und dadurch die Sp1-Bindungseffektivität gesteigert wird. Dies führt zu einer Zunahme der Promotoraktivität um 30 Prozent und damit zu einer gesteigerten Expression von EGFR.

Eine Regulation der EGFR-Expression über microRNA wurde von Webster et al. (2009) beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die EGFR-mRNA drei spezifische Bindungsstellen für microRNA-7 (miR-7) aufweist. So kann miR-7 post-transkriptionell die Expression von EGFR direkt regulieren. Aber auch die EGFR-abhängigen Signalwege werden durch microRNA beeinflusst (Webster et al., 2009). Da dieser Mechanismus nur in Verbindung mit einer Minderung der EGFR-Expression, bzw. einer Inhibition der Signalwege beobachtet wurde, könnte eine EGFR-Überexpression durch eine Fehlfunktion von microRNA bedingt sein.

5.3 Basale Expression der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs und XRCC1

Es konnte ebenfalls eine große Heterogenität in der Expression der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs und XRCC1 festgestellt werden. Für die DNA-PKcs zeigt sich innerhalb der Gruppe der zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien insgesamt eine breite Variation der basalen Proteinexpression. Während die Zelllinie HSC4 einen DNA-PKcs-Expressionslevel knapp über dem Level der Normalfibroblasten aufweist, findet sich bei der Zelllinie FaDuDD ein 8fach höherer Level. Im Vergleich der dreizehn Tumorzelllinien verschiedener Entitäten zeigen sich zunächst zwei DNA-PKcs-defiziente Zelllinien, die in der Beurteilung der Variationsbreite an dieser Stelle nur als Negativkontrolle dienen. Bei den übrigen elf Zelllinien findet sich ebenfalls eine große Variationsbreite um den Faktor 7,8, wobei auch hier die DNA-PKcs-Expressionslevel zum Teil knapp und zum Teil sehr deutlich über dem Level der Normalfibroblasten liegen.

In der Literatur finden sich Daten, die sehr unterschiedliche DNA-PKcs-Expressionslevel beschreiben. Yu et al. (2004) berichten von einem sehr hohen DNA-PKcs-Level in hepatozellulären Karzinomen und im Gegensatz dazu von einem sehr geringen Level in papillären Karzinomen. Die Expression der DNA-PKcs war dabei in invasiven Adenokarzinomen signifikant höher als in nicht-invasiven Karzinomen.

Die basale Proteinexpression von XRCC1 unterscheidet sich innerhalb der zehn Plattenepithelkarzinomzelllinien etwa um das 10fache. Die Zelllinien liegen dabei alle deutlich über dem durchschnittlichen XRCC1-Expressionslevel der Normalfibroblasten. Im Vergleich der dreizehn Tumorzelllinien unterschiedlicher Entität findet sich ein Unterschied der basalen XRCC1-Expression um den Faktor 13,8, wobei auch hier alle Zelllinien deutlich über dem XRCC1-Expressionslevel der Normalfibroblasten liegen. Über unterschiedliche XRCC1-Expressionslevel lassen sich in der Literatur nur wenige Angaben finden. Es gibt allerdings Untersuchungen über eine unterschiedliche XRCC1-Expression im Zusammenhang mit SNPs (Cheng et al., 2009).

Neben der schon diskutierten EGFR-Variationsbreite wurden, wie oben beschrieben, ebenfalls deutliche Unterschiede des DNA-PKcs- und XRCC1-Expressionslevels, sowohl in Tumorzelllinien verschiedener Entitäten, als auch innerhalb einer Tumorentität nachgewiesen. Die dazu verwendeten Gesamtzellextrakte stammen aus zwei bis drei unabhängigen Extraktpräparationen. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte in unabhängigen Western Blots an unterschiedlichen Tagen. Es zeigten sich reproduzierbare Werte mit einer insgesamt sehr geringen Standardabweichung, die in nachfolgenden Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt werden konnten. Die Resultate zeigen also biologische Variationen, da methodische Fehler nahezu ausgeschlossen werden können.

5.4 Korrelation der untersuchten Proteine und mögliche Ursachen

Der Vergleich der Expressionslevel der untersuchten Proteine zeigt eine Korrelation zwischen der Expression des EGFR und der Expression der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs und XRCC1, sowie eine Korrelation der DNA-PKcs- und XRCC1-Proteinexpression. Für diese Korrelationen gibt es verschiedene mögliche Ursachen. Ein Erklärungsansatz beruht auf einer Regulation der DNA-Reparaturproteine über die EGFR-vermittelten Signalwege. Xu und Shu (2007) beschreiben beim Gliom eine

Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Sp1/Sp3 über die EGFR-abhängige p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK). Da auch für die Promotorregion der DNA-PKcs mehrere Sp1-Bindungsstellen beschrieben sind (Fujimoto et al., 1997), könnte dies eine potenzielle Möglichkeit der Regulation der DNA-PKcs über den EGFR-abhängigen MAPK-Signalweg darstellen.

Yacoub et al. (2003) konnten die Beteiligung des EGFR-MAPK-Signalweges an der Expression von XRCC1 zeigen. In den Prostatakarzinomzelllinien DU145 und LNCaP konnte durch Bestrahlung eine MAPK-abhängige verstärkte Transkription des XRCC1-Gens beobachtet werden, die zu einer Erhöhung der XRCC1-mRNA und -Proteinmenge führt. Durch den Einsatz des Inhibitors PD98059 wurde spezifisch der MAPK-Signalweg blockiert. Dies führte zu einer reduzierten Hochregulation von XRCC1, zu einem Persistieren von reparaturpflichtigen DNA-Schäden (AP sites) und zu einem gesteigerten Zelltod. Der vom MAPK-Signalweg abhängige Transkriptionsfaktor E2F1 scheint dabei die Expression von XRCC1 zu beeinflussen (Chen et al., 2008). Hanada et al. (2006) beschreiben in einer Studie zur Klärung der B-Myb-Überexpression bei Brustkrebs eine physikalische und funktionelle Interaktion zwischen EGFR und dem Transkriptionsfaktor E2F1. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der ursprünglich membranständige EGFR in den Zellkern transportiert werden kann und dort z. B. mit dem Transkriptionsfaktor E2F1, aber auch mit den Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5 physikalisch interagiert und somit potenziell Einfluss auf die Transkription einer Vielzahl von Genen nehmen könnte (Hung et al., 2008). Dies ist z. B. für die Proteine Cyclin D1, iNOS und B-Myb beschrieben (Lo und Hung, 2006; Dittmann et al., 2010).

Es konnte sogar eine direkte physikalische Interaktion zwischen EGFR und DNA-Reparaturproteinen nachgewiesen werden. Bandyopadhyay et al. (1998) zeigten anhand verschiedener Zelllinien, dass es zu einer durch Anti-EGFR-Antikörper induzierten physikalischen Interaktion zwischen EGFR, DNA-PKcs und Ku70/80 kommt. Auch Dittmann et al. (2005) beschreiben für die Bronchialkarzinomzelllinie A549 und die Plattenepithelkarzinomzelllinie FaDu eine strahleninduzierte Translokation des EGFR in den Zellkern, die zwar keine Erhöhung des DNA-PK-Levels, aber eine Erhöhung der DNA-PK-Aktivität bewirkt. Wird die Translokation des EGFR durch den EGFR-gerichteten Antikörper C225 verhindert, führt dies über eine verringerte DNA-PK-Aktivität zu einer erhöhten Radiosensitivität der behandelten Zellen.

Ebenfalls theoretisch vorstellbar wäre eine Regulation des EGFR durch DNA-Reparaturproteine. Lees-Miller et al. (1996) konnten zeigen, dass die DNA-PK als Transkriptionsfaktor direkt, oder durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und DNA-Bindungsproteinen indirekt, an einer Vielzahl von Regulations- und Expressionsprozessen beteiligt ist. Denkbar ist somit auch ein Einfluss auf die Expression des EGFR. Hierzu gibt es bisher keine weiterführenden Untersuchungen. Um die Rolle der DNA-PK bei der Regulation des EGFR weiter zu untersuchen, wäre der Einsatz von spezifischen DNA-PK-Inhibitoren oder RNA-Interferenz gegen DNA-PK sinnvoll.

Die beobachtete Korrelation zwischen EGFR und den beiden DNA-Reparaturproteinen DNA-PKcs und XRCC1 könnte auch zwei unabhängig voneinander auftretende Phänomene darstellen. Dagegen sprechen jedoch Daten, die zeigen, dass ein hoher Level an EGFR mit einer erhöhten Radioresistenz einhergeht und umgekehrt (Liang et al., 2003). Für die hier untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien konnte in der eigenen Arbeitsgruppe ebenfalls, sowohl für die Zellkultur als auch im Xenograft bestätigt werden, dass die EGFR-Proteinexpression mit der Strahlenempfindlichkeit korreliert (Kasten-Pisula et al., im Druck). Die hier vorgestellte Arbeit weist daher darauf hin, dass die zuvor beobachtete Radioresistenz wahrscheinlich durch den erhöhten Level an DNA-Reparaturproteinen und einer damit verbundenen gesteigerten Doppelstrangbruchreparatur vermittelt wird. Eine zufällige Korrelation wird deshalb für unwahrscheinlich erachtet.

5.5 Einsatz von RNA-Interferenz (RNAi)

Um eine direkte Regulation der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs und XRCC1 durch den EGFR zu klären, wurde RNA-Interferenz gegen EGFR eingesetzt. Sollte eine direkte Regulation vorliegen, müsste die Inhibition der EGFR-Expression theoretisch Einfluss auf die Expression der DNA-Reparaturproteine haben.

Für dieses Experiment wurden die Zelllinien FaDuDD, HSC4, UT-SCC-8 aufgrund ihrer unterschiedlichen basalen EGFR-Expression ausgewählt. Die Zellen wurden für 48 bzw. 72 Stunden mit unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen behandelt. Die EGFR-Proteinmenge ließ sich um etwa 60 Prozent deutlich reduzieren. Eine 100-prozentige Reduktion des EGFR ist dabei nicht zu erwarten gewesen, da dies mit dem Zellüberleben nicht vereinbar wäre. Trotz dieser erfolgreichen, deutlichen Reduktion

konnte kein signifikanter Effekt auf die Expression der Reparaturproteine DNA-PKcs und XRCC1 festgestellt werden. Folgende mögliche Erklärungen könnten dafür verantwortlich sein:

Die Reduktion der EGFR-Proteinmenge um etwa 60 Prozent ist möglicherweise nicht ausreichend, um einen Effekt in der Expression der DNA-Reparaturproteine zu bewirken. Die verbleibende EGFR-Restmenge von etwa 40 Prozent könnte ausreichen, um die Expression dieser beiden Reparaturproteine zu regulieren.

Möglicherweise ist die Dauer der Behandlung mit spezifischer siRNA für maximal 72 Stunden zu kurz gewählt worden. Über die Stabilität bzw. Halbwertszeit des XRCC1-Proteins lassen sich in der Literatur keine Daten finden. Yacoub et al. (2001) beschreiben aber eine Reduktion der XRCC1-mRNA, etwa 30-60 Minuten nach zuvor durch ionisierende Strahlen induziertem Anstieg. Galloway et al. (1999) beschreiben eine Halbwertszeit der DNA-PKcs-mRNA von ca. 24 Stunden in MO59K (Gliomzelllinie) und GM38 (Normalfibroblasten). Ajmani et al. (1995) berichten bei Erythroleukämiezellen über eine DNA-PKcs-Proteinhalbwertszeit von ca. 5 Tagen. Die Halbwertszeiten der DNA-PKcs bzw. des XRCC1 könnten demnach so lang sein, dass eine Reduktion auf Proteinebene noch nicht messbar ist, obwohl die jeweilige mRNA aufgrund fehlender EGFR-vermittelter Transkription schon reduziert wurde. Um dies zu testen, wäre ein Nachweis der entsprechenden mRNA in weiterführenden Experimenten nötig.

Eine Erklärung für den fehlenden Effekt der EGFR-Suppression auf den Expressionslevel von DNA-PKcs und XRCC1 könnte auch die Tatsache sein, dass keine direkte Regulation vorliegt. Dies kann derzeit nicht abschließend geklärt werden. Um klarere Aussagen über eine potenzielle EGFR-vermittelte Regulation der DNA-PKcs bzw. des XRCC1 machen zu können, sind weiterführende Experimente notwendig. So müsste z. B. die siRNA-Inkubationsdauer verlängert werden, um die Halbwertszeit der DNA-PKcs bzw. des XRCC1 zu überwinden. Weiterhin sollte der Effekt der siRNA-Inkubation ebenfalls auf mRNA-Ebene der beiden Proteine untersucht werden. Um die Halbwertszeit der DNA-PKcs bzw. des XRCC1 zu testen, wäre eine Versuchsreihe mit Bestimmung der Proteinmenge nach Inhibition der gesamten Proteinsynthese denkbar. Um die Bedeutung der EGFR-abhängigen Signalwege für die Expression dieser Reparaturproteine zu klären, wäre der Einsatz von Signalweg-spezifischen Inhibitoren sinnvoll.

Da in dieser Arbeit nur Gesamtzellextrakte verwendet wurden, lässt sich keine Aussage zur Lokalisation und Verteilung der untersuchten Proteine machen. Dies könnte allerdings Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen liefern. Es könnte daher von Interesse sein, die Proteine getrennt in Membran, Cytosol und Kern zu untersuchen.

5.6 Fazit

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der Proteine EGFR, DNA-PKcs und XRCC1 sowohl zwischen verschiedenen Tumorentitäten, aber auch innerhalb einer Tumorart (Plattenepithelkarzinom) eine große Heterogenität aufweist. Weiterhin konnte dargestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und der Expression der beiden DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs und XRCC1 besteht. Dieses Ergebnis ist von besonderer Bedeutung, gerade im Hinblick auf die Tatsache, dass eine EGFR-Überexpression häufig mit einer Radioresistenz assoziiert ist. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Korrelation zwischen EGFR und den beiden Reparaturproteinen DNA-PKcs und XRCC1 könnte somit zur Aufklärung dieses Zusammenhangs beitragen. Danach sollten Tumorzellen mit verstärkter EGFR-Expression ebenfalls eine erhöhte Expression der DNA-Reparaturproteine aufweisen. Dies sollte dementsprechend zu einer verbesserten Reparaturkapazität für Doppelstrangbrüche führen, was eine erhöhte Radioresistenz zur Folge haben sollte. Der genaue Regulationsmechanismus zwischen EGFR-Expression und der Expression dieser DNA-Reparaturproteine lässt sich derzeit jedoch noch nicht beschreiben. Hierzu sind die oben genannten, weiterführenden Experimente notwendig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mittels Western Blot wurden für dreizehn Zelllinien verschiedener Tumorentitäten, zehn Zelllinien derselben Tumorentität (Plattenepithelkarzinom) sowie drei Normalfibroblastenzelllinien Untersuchungen zur basalen EGFR-, DNA-PKcs- und XRCC1-Proteinexpression durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in Tumorzelllinien generell eine sehr große Heterogenität bezüglich des Ausmaßes der EGFR- sowie der DNA-PKcs- und XRCC1-Expression besteht. Dies gilt sowohl für unterschiedliche als auch identische Tumorentität (Plattenepithelkarzinom). Des Weiteren liegt eine Überexpression des EGFR nicht - wie oft vermutet - in allen Tumorzelllinien vor.

Der Vergleich dieser drei Proteine zeigt eine Korrelation zwischen der Expression des EGFR und den DNA-Reparaturproteinen DNA-PKcs ($r^2=0.514$, $p=0.0002$) und XRCC1 ($r^2=0.231$, $p=0.0174$). Es besteht ebenfalls eine Korrelation zwischen der DNA-PKcs- und XRCC1-Proteinexpression ($r^2=0.552$, $p<0.0001$). Diese Korrelation deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Expression des EGFR und der Expression von DNA-Reparaturproteinen hin und auch auf die damit einhergehende Radioresistenz dieser Tumore.

Um Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen zu erhalten, die dieser Korrelation zugrunde liegen, wurde RNAi gegen EGFR in drei Zelllinien mit unterschiedlicher basaler EGFR-Expression eingesetzt. Die EGFR-Expression ließ sich in allen drei Zelllinien durch die Behandlung mit siRNA um etwa 60 Prozent reduzieren. Trotz dieser deutlichen Reduktion konnte unter den gewählten Bedingungen jedoch kein Effekt auf die Expression der beiden DNA-Reparaturproteine festgestellt werden. Dies kann entweder bedeuten, dass dieser oben dargestellte Zusammenhang keine funktionelle Ursache hat. Es kann aber ebenfalls damit erklärt werden, dass aufgrund der langen Halbwertszeit dieser DNA-Reparaturproteine noch keine Abnahme beobachtet wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit ein Zusammenhang zwischen der Expression des EGFR und der für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen essentiellen Proteine DNA-PKcs und XRCC1 festgestellt werden. Dieses Ergebnis könnte die bei erhöhter EGFR-Expression auftretende Radioresistenz erklären. Die genauen Regulationsmechanismen, die dieser Korrelation zugrunde liegen, sind derzeit jedoch noch nicht abschließend aufgeklärt. Hierfür sind weitere Experimente erforderlich.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ajmani A.K., Satoh M., Reap E., Cohen P.L., Reeves W.H. Absence of autoantigen Ku in mature human neutrophils and human promyelocytic leukemia line (HL-60) cells and lymphocytes undergoing apoptosis. *J Exp Med.* 1995 Jun 1;181(6):2049-58

Bandyopadhyay D., Mandal M., Adam L., Mendelsohn J., Kumar R. Physical Interaction between Epidermal Growth Factor Receptor and DNA-dependent Protein Kinase in Mammalian Cells. *J Biol Chem.* 1998 Jan 16;273(3):1568-73

Bonner J. A., Buchsbaum D. J., Russo S. M., Fiveash J. B., Trummell H. Q., Curiel D. T., Raisch K. P. Anti-EGFR-mediated radiosensitization as a result of augmented EGFR expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):2-10

Bonner J. A., Harari P. M., Giralt J., Azarnia N., Shin D. M., Cohen R. B., Jones C. U., Sur R., Raben D., Jassem J., Ove R., Kies M. S., Baselga J., Youssoufian H., Amellal N., Rowinsky E. K., Ang K. K. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell carcinoma of Head and Neck. *N Engl J Med.* 2006 Feb 9;354(6):567-78

Brandt B., Meyer-Staekling S., Schmidt H., Agelopoulos K., Buerger H. Mechanisms of egfr gene Transcription Modulation: Relationship to Cancer Risk and Therapy Response. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec 15;12(24):7252-60

Bundeszentrale für politische Bildung, 2008 Todesursachen in absoluten Zahlen und Anteile in Prozent, 2007. [Online im Internet] URL: <http://www.bpb.de/files/FRGFFN.pdf> [Stand: 01.12.2010, 09:30]

Chen D., Yu Z., Zhu Z., Lopez C.D., E2F1 regulates the base excision repair gene XRCC1 and promotes DNA repair. *J Biol Chem.* 2008 May 30;283(22):15381-9

Cheng X.D., Lu W.G., Ye F., Wan X.Y., Xie X., The association of XRCC1 gene single nucleotide polymorphisms with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009 Jun 29;28:91

Dittmann K., Mayer C., Fehrenbacher B., Schaller M., Raju U., Milas L., Chen D. J., Kehlbach R., Rodemann H. P. Radiation-induced Epidermal Growth Factor Receptor Nuclear Import Is Linked to Activation of DNA-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem.* 2005 Sep 2;280(35):31182-9

Dittmann K., Mayer C., Rodemann H. P. Nuclear EGFR as Novel Therapeutic Target. *Strahlenther Onkol.* 2010 Jan;186(1):1-6

Deutsches Krebsforschungszentrum (dkfz), 2010 Strahlentherapie und Anwendungsbeispiele. [Online im Internet] URL: <http://www.krebsinformationsdienst.de/themen/behandlung/strahlentherapie-techniken.php> [Stand: 01.12.2010, 11:00]

Etienne-Grimaldi M.-C., Pereira S., Magné N., Formento J.-L., Francoual M., Fontana X., Demard F., Dassonville O., Poissonnet G., Santini J., Bensadoun R.-J., Szepetowski P., Milano G. Analysis of the dinucleotide repeat polymorphism in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in head and neck cancer patients. *Ann Oncol.* 2005 Jun;16(6):934-41

Friedmann B. J., Caplin M., Savic B., Shah T., Lord C. J., Ashworth A., Hartley J. A., Hochhauser D. Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment. *Mol Cancer Ther.* 2006 Feb;5(2):209-18

Fujimoto M., Matsumoto N., Tsujita T., Tomita H., Kondo S., Miyake N., Nakano M., Niikawa N. Characterization of the Promoter Region, First Ten Exons and Nine Intron-exon Boundaries of the DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Gene, DNA-PKcs (XRCC7). *DNA Res.* 1997 Apr 28;4(2):151-4

Galloway A. M., Spencer C. A., Anderson C. W., Allalunis-Turner M. J. Differential stability of the DNA-activated protein kinase catalytic subunit mRNA in human glioma cells. *Oncogene.* 1999 Feb 11;18(6):1361-8

Hall E. J. Radiobiology for the Radiologist. 5th Edition, *Lippincott Williams & Wilkins*, 2000

Hanada N., Lo H.-W., Day C.-P., Pan Y., Nakajima Y., Hung M.-C. Co-Regulation of B-Myb Expression by E2F1 and EGF Receptor. *Mol Carcinog.* 2006 Jan;45(1):10-7

Hatanpaa K. J., Burma S., Zhao D., Habin A. A. Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging, and Radioresistance. *Neoplasia.* 2010 Sep;12(9):675-84

Helleday T., Lo J., van Gent D. C., Engelward B. G. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst).* 2007 Jul 1;6(7):923-35

Herrmann Th., Baumann M., Dörr W. Klinische Strahlenbiologie. 4.Auflage, *Urban und Fischer*, 2006

Hoeijmakers JH, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):366-74

Hung L.Y., Tseng J.T., Lee Y.C., Xia W., Wang Y.N., Wu M.L., Chuang Y.H., Lai C.H., Chang W.C. Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2008 Aug;36(13):4337-51

Johnson A. C., Ishii S., Jinno Y., Pastan I., Merlino G.T. Epidermal Growth Factor Receptor Gene Promoter. Deletion analysis and identification of nuclear protein binding sites. *J Biol Chem.* 1988 Apr 25;263(12):5693-9

Kauffmann, Moser, Sauer, Radiologie Grundlagen der Radiodiagnostik Radiotherapie und Nuklearmedizin. Urban & Schwarzenberg, 1996

Kasten-Pisula U., Tastan H., Dikomey E. Huge differences in cellular radiosensitivity are due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *Int J Radiat Biol.* 2005 Jun;81(6):409-19

Kitadai Y., Yasui W., Yokozaki H., Kuniyasu H., Haruma K., Kajiyama G., Tahara E. The level of a transcription factor Sp1 is correlated with the expression of EGF receptor in human gastric carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Dec 30;189(3):1342-8

Lees-Miller S.P., Long M.C., Kilvert M.A., Lam V., Rice S.A., Spencer C.A. Attenuation of DNA-Dependent Protein Kinase Activity and Its Catalytic Subunit by the Herpes Simplex Virus Type 1 Transactivator ICP0. *J Virol.* 1996 Nov;70(11):7471-7

Lévy N., Martz A., Bresson A., Spenlehauer C., de Murcia G., Ménissier-de Murcia J. XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 5;34(1):32-41

Liang K., Ang K.K., Milas L., Hunter N., Fan Z. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Sep 1;57(1):246-54

Liang Z., Zeng X., Gao J., Wu S., Wang P., Shi X., Zhang J., Liu T. Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. *BMC Cancer.* 2008 Dec 6;8:363

Liu W., Innocenti F., Wu M.H., Desai A.A., Dolan M.E., Cook Jr E.H., Ratain M.J. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res.* 2005 Jan1;65(1):46-53

Lo H.-W., Hung M.-C. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and survival. *Br J Cancer.* 2006 Jan 30;94(2):184-8

Löffler G., Petrides P.E. Biochemie & Pathobiochemie. 7.Auflage, Springer-Verlag, 2003

Nomura M., Shigematsu H., Li L., Suzuki M., Takahashi T., Estess P., Siegelman M., Feng Z., Kato H., Marchetti A., Shay J.W., Spitz M.R., Wistuba I.I., Minna J.D., Gazdar A.F. Polymorphisms, Mutations, and Amplification of the EGFR Gene in Non-Small Cell Lung Cancers. *PLoS Med.* 2007 Apr;4(4):e125

Nyati M. K., Morgan M. A., Feng F. Y., Lawrence T. S. Integration of EGFR inhibitors with Radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2006 Nov;6(11):876-85

Um J. H., Kwon J. K., Kang C.-D., Kim M. J., Dong S. J., Jae H. B., Dong W. K., Byung S. C., Kim S. H. Relationship between Antiapoptotic Molecules and Metastatic Potency and the Involvement of DNA-Dependent Protein Kinase in the

Chemosensitization of Metastatic Human Cancer Cells by Epidermal Growth Factor Receptor Blockade. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Dec;311(3):1062-70

Romeike B.F., Jung V., Feiden W., Moringlane J.R., Zang K.D., Urbschat S.M. Distribution of epidermal growth factor receptor protein correlates with gain in chromosome 7 revealed by comparative genomic hybridization after microdissection in glioblastoma multiforme. *Pathol Res Pract.* 2001;197(6):427-31

Sterzing F., Engenhart-Cabillic R., Flentje M., Debus J. Image-guided radiotherapy – a new dimension in radiation oncology. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108(16): 274-80

Thariat J., Milas L., Ang K.K. Integrating radiotherapy with epidermal growth factor receptor antagonists and other molecular therapeutics for the treatment of head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 Nov 15;69(4):974-84

Toulany M., Kasten-Pisula U., Brammer I., Wang S., Chen S., Dittmann K., Baumann M., Dikomey E., Rodemann H. P. 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.* 2006 Jul 1;12(13):4119-26

Webster R. J., Giles K. M., Price K. J., Zhang P. M., Mattick J. S., Leedman P. J. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Human Cancer Cells by MicroRNA-7. *J Biol Chem.* 2009 Feb 27;284(9):5731-41

Wiebalk K. Strahleninduzierte Genexpression von Zellzykluskontroll- und DNA-Reparaturgenen als Biomarker für individuelle Strahlenempfindlichkeit. *Inaugural Dissertation Universität Heidelberg, 2006*

Xu K., Shu HK. EGFR Activation Results in Enhanced Cyclooxygenase-2 Expression through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Activation of the Sp1/Sp3 Transcription Factors in Human Gliomas. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6121-9

Yacoub A., Park J. S., Qiao L., Dent P., Hagan M. P. MAPK dependence of DNA damage repair: ionizing radiation and the induction of expression of the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 human prostate carcinoma cells in a MEK1/2 dependent fashion. *Int J Radiat Biol.* 2001 Oct;77(10):1067-78

Yacoub A., McKinstry R., Hinman D., Chung T., Dent P., Hagan M. P. Epidermal Growth Factor and Ionizing Radiation Up-regulate the DNA Repair Genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 and LNCaP Prostate Carcinoma through MAPK Signaling. *Radiat Res.* 2003 Apr;159(4):439-52

Yu ZJ, Sui JG, Ding YQ, Cao ZS, Zhou PK, Wu DC., Expression of DNA-PK in hepato- and cholangio-neoplasms and its significance. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2004 Nov;12(11):652-5

8. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in dem von Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey geleiteten Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und der Betreuung möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Ganz besonderes bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Ulla Kasten-Pisula, die zunächst mit ihrem Seminar das Interesse an diesem Bereich der Medizin und Biologie bei mir geweckt hat. Durch ihre praktische Anleitung, ihre unendliche Geduld, ihre zahllosen Korrekturen und Anmerkungen konnte diese Arbeit gelingen. Danke, dass du dir immer sofort Zeit genommen hast wenn ich wieder deine Hilfe nötig hatte.

Vielen Dank auch an das Laborteam Frau Britta Riepen, Frau Jutta Schäfer und Frau Alexandra Zielinski für die gute Einarbeitung in die technischen Raffinessen des Western Blot und der Zellkultur.

Ebenso danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Labors für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für die Unterstützung durch Korrekturlesen danken. Sie haben sich durch diese spezielle Materie nicht abschrecken lassen und viele wertvolle Hinweise geliefert.

Als letztes möchte ich meiner Frau Bettina danken. Ohne ihre ständige Motivation und ihre Geduld wäre diese Arbeit nicht fertig geworden. Ihr und meinem Sohn Jona ist diese Arbeit gewidmet.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name: Benjamin Johannes Bernhard Scherkl
Geburtsdatum/-ort: 20.12.1981, Hamburg
Anschrift: Poppenbüttler Hauptstraße 10
22399 Hamburg

Schulbildung:

08/1988 - 06/1998 Gesamtschule Poppenbüttel
08/1998 - 06/2001 Gymnasiale Oberstufe der Gesamtschule Walddörfer
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

10/2001 – 07/2002 CVJM Oberalster zu Hamburg e.V.

Hochschulbildung:

10/2002 – 10/2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
08/2004 Abschlussprüfung der medizinischen Vorklinik
10/2008 Abschluss des Studiums mit der Ärztlichen Prüfung
11/2008 Approbation als Arzt

Tätigkeit:

2006 Beginn der Dissertation, Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
Seit 01/2009 Tätigkeit als Assistenzarzt für Anästhesie, Krankenhaus Reinbek

Hamburg, den 1.5.2011

Benjamin Scherkl

10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

Hamburg, 1.5.2011

Benjamin Scherkl