

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie

Leitung Prof. Dr. E. Dikomey

## **BEDEUTUNG DES EXPRESSIONSLEVELS DES EPIDERMALLEN WACHSTUMSFAKTOR-REZEPTORS (EGFR) FÜR DIE REPARATUR VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Barbara Duszynski  
aus Lodz (Polen)

Hamburg 2010

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.02.2011**

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

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Ekkerhard Dikomey**

**Prüfungsausschuss, zweite Gutachter: Prof. Dr. Jochen Dahm-Daphi**

**Prüfungsausschuss, dritte Gutachter: PD Dr. Ronald Simon**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ARBEITSHYPOTHESE</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1 DNA-Schäden nach ionisierender Bestrahlung	3
2.2 DNA-Reparaturmechanismen	5
2.3 Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	8
2.3.1 Funktion	9
2.3.2 Signaltransduktion	9
2.3.3 Zusammenhang zwischen EGFR-Lokalisation und DNA-Reparatur	11
2.3.4 Bedeutung des EGFR in humanen Tumoren	12
2.3.5 Zusammenhang zwischen EGFR und Strahlenresistenz	13
2.3.6 EGFR-basierte Therapieansätze	14
2.3.7 Bedeutung der EGFR-Proteinmenge	16
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
3.1 Zelllinien	19
3.2 Zellkultur	19
3.3 Wachstumskinetik	20
3.4 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie	20
3.5 Nachweis spezifischer Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot	21
3.5.1 Gesamtzell-Proteinextraktion mit Ultraschall	22
3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay	22
3.5.3 SDS-PAGE	23
3.5.4 Western Blot (Proteintransfer)	24
3.5.5 Detektion und Auswertung der Proteinsignale	24
3.6 Bestrahlung und Dosimetrie	27

3.7	Nachweis von residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen mittels $\gamma$ H2AX-Foci Technik	28
3.7.1	$\gamma$ H2AX Färbung	28
3.7.2	Auswertung der $\gamma$ H2AX-Foci	29
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
4.1	EGFR-Expression	31
4.2	Wachstumskinetik	31
4.3	Zellzyklus-Analyse	33
4.4	Expression und Aktivierung von EGFR und EGFR-abhängigen Signalproteinen	33
4.5	Expression von DNA-Reparaturproteinen	36
4.6	Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüche	38
4.7	Reparatur strahleninduzierter DSBs nach Inhibition des EGFR mittels Erlotinib	40
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>42</b>
5.1	Variationen der EGFR-Genamplifikation	42
5.2	Einfluss der EGFR-Expressionsmenge	43
5.2.1	Zellproliferation	43
5.2.2	Expression und Aktivierung von EGFR und EGFR-abhängiger Signalproteine	44
5.2.3	Expression wichtiger DNA-Reparaturproteine	46
5.2.4	Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche	48
5.2.5	Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche nach EGFR-Hemmung mittels Erlotinib	51
5.3	Fazit	53
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>55</b>

<b>7. ANHANG</b>	<b>57</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>64</b>
<b>9. DANKSAGUNG</b>	<b>75</b>
<b>10. LEBENSLAUF</b>	<b>76</b>
<b>11. EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>77</b>

## 1. ARBEITSHYPOTHESE

Bösartige Neubildungen sind in Deutschland die zweithäufigste Todesursache. Eine Therapiemöglichkeit stellt die Strahlentherapie dar. Der epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist in vielen soliden Tumoren überexprimiert und wird mit aggressivem Tumorwachstum und schlechter Prognose assoziiert. Sehr häufig wird bei EGFR-überexprimierenden Tumorzellen eine Strahlenresistenz festgestellt, die ein wichtiges Problem für die durchzuführende Radiotherapie darstellt (Rodemann et al., 2007). Die Mechanismen dieser Resistenzausbildung sind noch nicht abschließend geklärt, es wird aber angenommen, dass der EGFR eine wichtige Rolle in der Strahlenantwort einnimmt und radioprotektive Funktionen hat (Chen and Nirodi, 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass der EGFR als Transkriptionsfaktor die Expression von Proteinen beeinflussen kann (Lin et al., 2001). Ob auch die Expression von DNA-Reparaturproteinen (wie z.B. der DNA-PK) dadurch beeinflusst werden kann, ist unklar. Es gibt jedoch Hinweise, dass Tumorzelllinien mit starker EGFR-Expression ebenfalls eine erhöhte Expression von DNA-PKcs und Ku80 zeigen und umgekehrt (Um et al., 2004). Zudem konnten Akimoto et al. (1999) zeigen, dass die EGFR-Expression in Tumorzellen positiv mit der Radioresistenz korreliert. Demnach könnte die EGFR-abhängige Modulation der zellulären Reparaturkapazität ursächlich für die in Tumorzellen beobachtete Radioresistenzbildung sein.

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob sich die EGFR-Menge auf die Expression zentraler Reparaturproteine (DNA-PKcs, Rad51, XRCC1) auswirkt und dadurch Einfluss auf die zelluläre Reparaturkapazität nach Bestrahlung nimmt. Damit sollte die Hypothese überprüft werden, ob EGFR-überexprimierende Tumorzelllinien mehr Reparaturproteine (wie z.B. DNA-PKcs) exprimieren, dadurch eine bessere Reparatur strahleninduzierter DSBs aufweisen und somit strahlenresistenter sind, als Tumorzelllinien, die wenig EGFR exprimieren.

Eingesetzt wurde die MDA-MB-468-WT Brustkrebszelllinie sowie drei davon abgeleitete Subklone, die sich durch lang andauernde Modulation der Kultivationsbedingungen in ihrer EGFR-Genexpression und dadurch auch EGFR-Proteinexpression deutlich unterscheiden und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. B. Brandt (Tumorbiologie, UKE) zur Verfügung gestellt wurden. Die MDA-MB-468-wt Zelllinie ist der Ursprung der anderen Zelllinien und trägt eine ca. 30

fache EGFR-Genamplifikation. Der MDA-MB-468-0106 Subklon hat eine ca. 13,5 fache, der MDA-MB-468-0107 Subklon eine ca. 2,5-3,5 fache und der MDA-MB-468-+EGF Subklon eine ca. 2-3 fache EGFR-Genamplifikation. Mit diesem isogenetischen Zellsystem kann der Einfluss unterschiedlicher EGFR-Proteinlevel optimal untersucht werden. Mittels Western Blot soll die Expression und Aktivierung von EGFR und EGFR-abhängiger Signalproteine (AKT, MAPK) und die Expression wichtiger DNA-Reparaturproteine (DNA-PKcs, Ku70, Rad51, XRCC1) in den vier Zelllinien untersucht werden. Die Reparatur strahleninduzierter DSBs soll mit der  $\gamma$ H2AX Foci Technik bestimmt werden. Um zu überprüfen, ob die EGFR-Menge Einfluss auf eine potentielle Radiosensitivierung durch EGFR-Inhibition hat, sollen die Zellen mit den Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib vorinkubiert werden, bevor die DSB-Reparatur bestimmt wird.

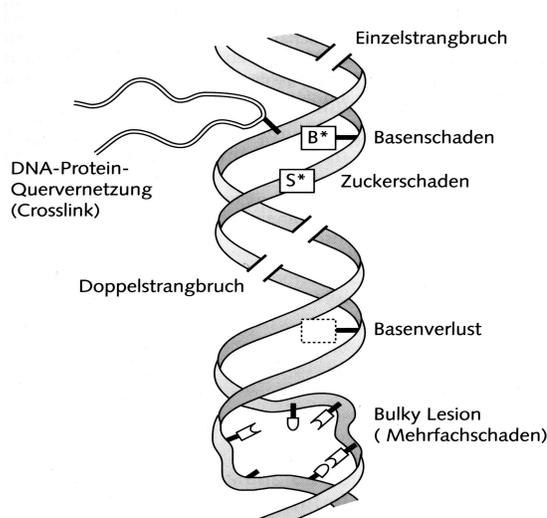
## **2. EINLEITUNG**

Bösartige Tumoren stellen in Deutschland nach den Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Jährlich erkranken in Deutschland etwa 395.000 Menschen an Krebs, davon rund 195.000 Frauen und 200.000 Männer. Im Mittel stirbt einer von vier Deutschen an einer bösartigen Neubildung (Statistisches Bundesamt, 2007). Je nach betroffenem Organsystem sowie Stadium der Krebserkrankung ergeben sich unterschiedliche Therapieoptionen. Eine Therapiemöglichkeit stellt die Bestrahlung der Tumoren dar. Ziel der Strahlentherapie ist es durch ionisierende Strahlen DNA-Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüche, bei den Tumorzellen zu erzeugen. DNA-Schäden, die durch Reparaturprozesse nicht beseitigt werden können, hindern die Zelle an der Vermehrung oder führen zum Absterben der Zelle (Herrmann und Baumann, 1997). Je größer die Strahlendosis desto wahrscheinlicher ist es, alle Tumorzellen letal zu schädigen. Das Problem hierbei ist jedoch das im Bestrahlungsfeld liegende tumorumgebende Normalgewebe, welches ebenfalls eine Schädigung erfährt und den limitierenden Faktor bei der Dosiswahl darstellt. Dadurch beschäftigen sich neue Therapieansätze damit, Tumorzellen für die Strahlentherapie zu sensibilisieren, ohne das Normalgewebe zusätzlich zu schädigen. Ein therapeutisches Angriffsziel (Target) für die Strahlensensibilisierung von Tumorzellen stellt der epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) dar. Der EGFR wird in vielen soliden Tumoren überexprimiert oder weist eine veränderte Aktivität auf. Diese verstärkte EGFR-Aktivität kann eine Ursache für die häufig beobachtete Radioresistenz von Tumoren sein und ist deshalb mit einer schlechten Prognose assoziiert (Rodemann et al., 2007). Das Ziel dieses Target-orientierten Therapieansatzes ist es, durch eine Hemmung des EGFR eine Strahlensensibilisierung der Tumorzellen zu erreichen. Dafür stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Zwei wichtige und für die Therapie bereits zugelassene Substanzen sind monoklonale Antikörper wie Cetuximab (Erbix) und Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Erlotinib (Tarceva) (Nyati et al., 2006).

### **2.1 DNA-Schäden nach ionisierender Bestrahlung**

Bei der Strahlentherapie verursacht eine Bestrahlung mit 1 Gy ca. 4.000-5.000 DNA-Schäden in einer Zelle (Herrmann und Baumann, 1997). Die Schäden können alle

Bausteine der DNA betreffen, jedoch variiert die Häufigkeit und vor allem die biologische Bedeutung (Kaufmann et al., 2001). Eine Übersicht der strahleninduzierten DNA-Schäden ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abb.1: Strahleninduzierte DNA-Schäden**

Übersicht der strahleninduzierten DNA-Schäden (Kaufmann et al., 2001)

Die häufigsten Läsionen stellen die Basenschäden mit ca. 3.000 erzeugten Schäden pro Zelle und Gy dar, gefolgt von den Einzelstrangbrüchen mit etwa 1.000 Schäden pro Zelle und Gy. DNA-Protein-Vernetzungen (160/Zelle und Gy) und gehäufte Läsionen (400/Zelle und Gy) treten weniger häufig auf. Doppelstrangbrüche (DSB) sind mit ca. 40 Schäden pro Zelle und Gy ein eher seltenes Ereignis, ihnen kommt jedoch trotz der geringen Häufigkeit die größte biologische Bedeutung zu (Kaufmann et al., 2001).

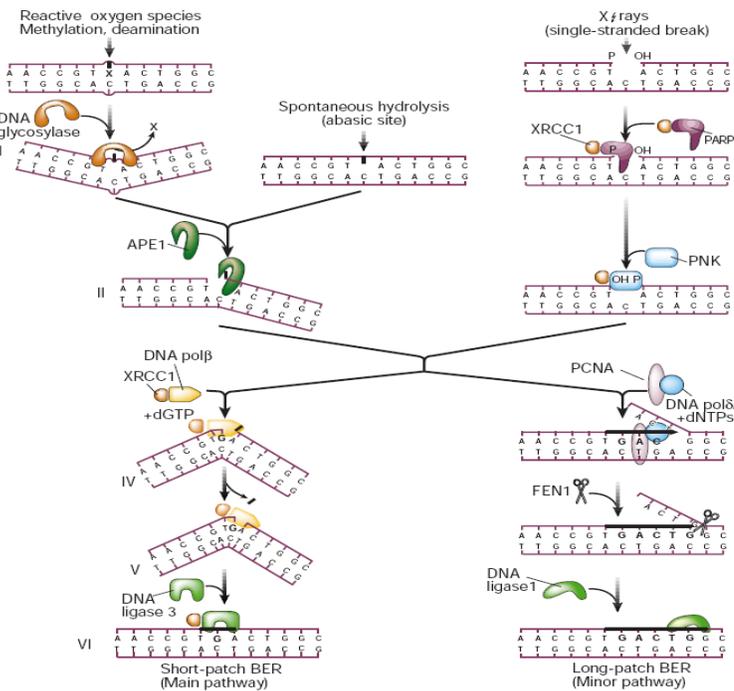
Werden strahleninduzierte DSB nicht oder inkorrekt repariert, können diese während der Replikation in Chromosomenaberrationen überführt werden (Pfeiffer et al., 2000; Dikomey et al., 2003), die sich letal oder nicht letal auswirken. Nicht-letale Chromosomenaberrationen wie Translokationen können Funktionsstörungen oder Fehlregulationen bewirken, während letale Chromosomenaberrationen, wie terminale oder interstitielle Deletionen und dizentrische Chromosomen über die Bildung azentrischer Fragmente den mitotischen Zelltod herbeiführen. Diese azentrischen Fragmente führen während der Mitose über die Bildung eines Mikrokerns zum Verlust von DNA, so dass die darauf codierten essentiellen Proteine nicht mehr synthetisiert

werden können und es aufgrund des Proteinmangels zur Zellinaktivierung, dem mitotischen Zelltod, kommt (Borgmann et al., 2004).

Der Zelle stehen jedoch viele DNA-Reparaturmechanismen zur Verfügung, um sich vor DNA-Schäden und nachfolgenden Mutationen und Chromosomenaberrationen zu schützen.

## 2.2 DNA-Reparaturmechanismen

Alle durch ionisierende Strahlen erzeugten Einzelstrangschäden wie Einzelstrangbrüche und Basenschäden werden über die Basenexzisionsreparatur (BER) beseitigt. Ein schematischer Ablauf der BER ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abb.2: Basenexzisionsreparatur (BER)**

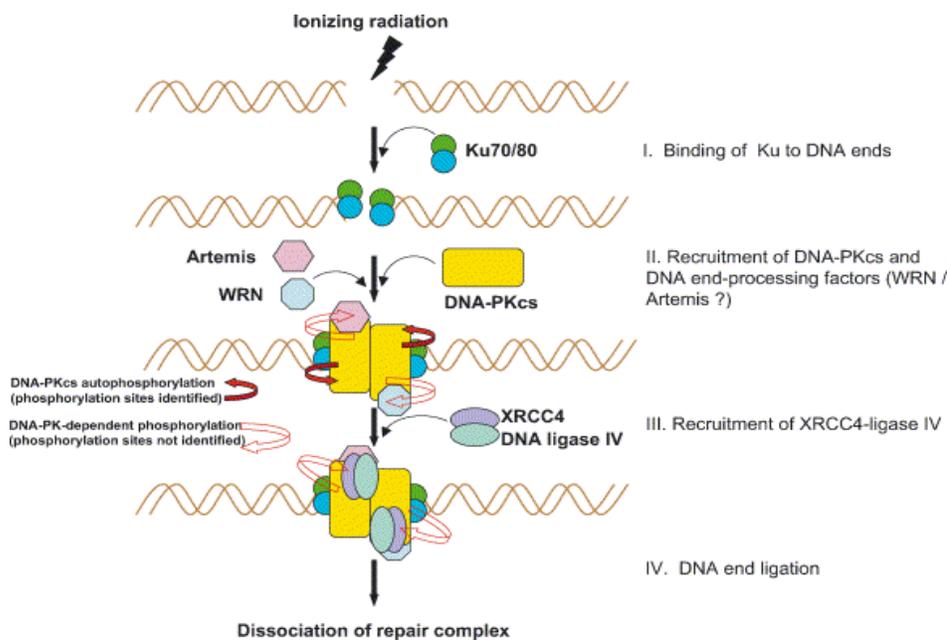
Schematischer Ablauf der Basenexzisionsreparatur (nach Hoeijmakers, 2001)

Tritt ein Einzelstrangbruch auf, so bindet nach erfolgter Erkennung ein Reparaturkomplex, bestehend unter anderem aus PARP und XRCC1, an den Läsionsort. Anschließend wird zunächst die 5' Seite des Bruches durch eine AP-Endonuklease so

modifiziert, dass ein 3' OH-Ende entsteht. An dieses Ende setzt eine Exonuklease an und entfernt 2-4 Nukleotide. Eine DNA-Polymerase synthetisiert dann, abhängig von dem komplementären fehlerfreien Strang, die korrekten Nukleotide und eine Ligase verschließt den DNA-Strang. Basenschäden werden von spezifischen DNA-Glykosylasen (oder unspezifischen AP-Endonukleasen) erkannt und durch eine Spaltung der N-glykosidischen Bindung vom Zucker abgetrennt. Hierdurch entsteht eine abasische Stelle, auch AP-Stelle genannt. Danach schneidet eine AP-Endonuklease die Zuckerphosphatkette ein, bevor eine Exonuklease einige Nukleotide entfernt und die Lücke durch die DNA-Polymerase und eine Ligase geschlossen wird (Friedberg et al., 2006; Hoeijmakers, 2001).

Die Reparatur von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen (DSBs) erfolgt vor allem über das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) (Hoeijmakers, 2001; Christmann et al., 2003).

Das NHEJ, bei dem die Enden des DSB direkt miteinander verknüpft werden, ist der dominante Mechanismus und kann in allen Phasen des Zellzyklus stattfinden (Burma und Chen, 2004). Hierfür werden keine oder nur kurze Homologien von wenigen Basenpaaren benötigt (Hoeijmakers, 2001). Ein schematischer Ablauf des NHEJ ist in Abbildung 3 dargestellt.

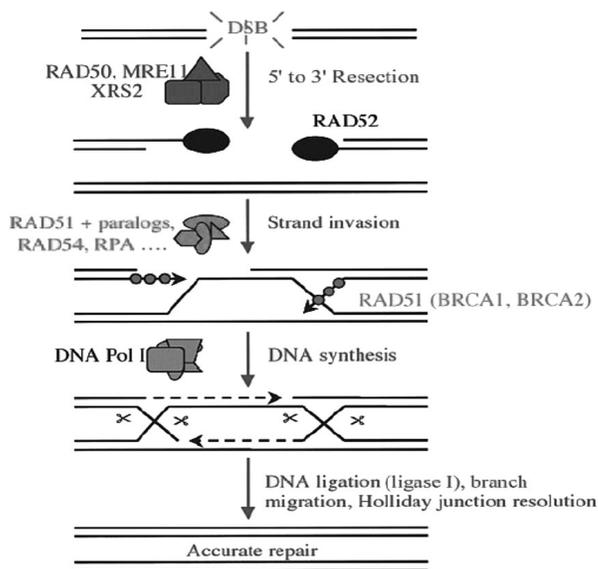


**Abb.3: Nicht homologes Endjoining (NHEJ)**

Schematischer Ablauf des nicht homologen Endjoinings (nach Burma und Chen, 2004).

Beim NHEJ nimmt die DNA-abhängige Proeinkinase (DNA-PK) eine zentrale Rolle ein. Sie besteht aus den beiden DNA-bindenden Proteinen Ku70 und Ku 80 sowie der katalytische Untereinheit DNA-PKcs. Zuerst bindet das Ku70/Ku80-Heterodimer an die Bruchenden des DSB und führt zur Rekrutierung der DNA-PKcs. Durch Anlagerung der DNA-PKcs an das Ku70/80-Dimer werden die Bruchenden zusammengehalten und die Kinaseaktivität des Komplexes aktiviert (Burma und Chen, 2004). Es folgt die Prozessierung der Bruchenden mit Hilfe des MRE11/NBS1/Rad50-Proteinkomplexes (Featherstone und Jackson, 1998; Kanaar et al., 1998). Die Proteine Artemis und WNR sind wahrscheinlich ebenfalls an diesem Prozess beteiligt (Burma und Chen, 2004). Durch die Prozessierung der Enden kann es zum Verlust von wenigen Nukleotiden kommen, so dass das NHEJ zu einer fehlerhaften Reparatur des DNA-DSB führen kann (Pfeiffer et al., 2000; Hoeijmakers, 2001). Zuletzt erfolgt die Ligation der bereinigten Bruchenden durch den LigaseIV/XRCC4-Proteinkomplex (Grawunder et al., 1997; Lee et al., 2000).

Bei der HR wird eine Matrize in Form des Schwesterchromatids oder des homologen Chromosoms benötigt, so dass dieser Reparaturvorgang ausschließlich in der späten S- oder G<sub>2</sub>-Phase stattfinden kann (Takata et al., 1998). Der schematische Ablauf der HR ist in Abbildung 4 dargestellt.



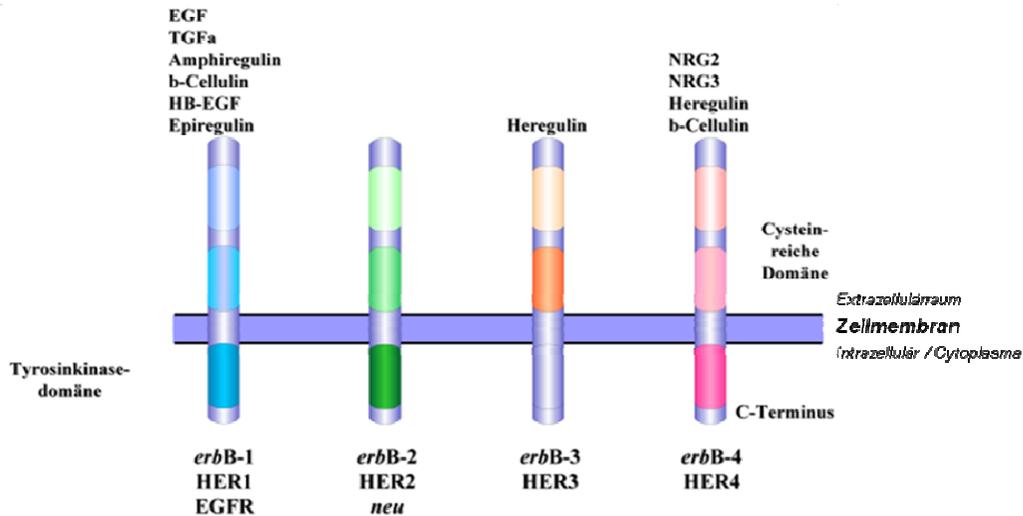
**Abb.4: Homologe Rekombination (HR)**

Schematischer Ablauf der homologen Rekombination (nach Jackson, 2002)

An diesem Prozess sind u.a. Rad51, Rad52, Rad54 sowie die Rad51-Paraloge Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 und XRCC3 und der MRN-Komplex (bestehend aus MRE11, NBS1 und Rad50) beteiligt (Symington, 2002; Thompson & Schild, 2002). Der DSB wird durch den MRN-Komplex erkannt und so prozessiert, dass einzelsträngige 3'-Überhänge entstehen (Valerie und Povirk, 2003). Rad51 lagert sich an die Einzelstrangüberhänge an und bewirkt die Ausbildung eines Nukleofilaments, das die Invasion des Einzelstranges in den homologen unbeschädigten Doppelstrang des Schwesterchromatids ermöglicht. Dieser Schritt erfordert neben Rad51 und dessen Paralogen ein koordiniertes Zusammenspiel von Rad52, Rad54, BRCA1, BRCA2 und dem Replikationsenzym A (RPA) (Sung et al., 2003). Es kommt zur Ausbildung eines Heteroduplex, bei der sich homologe Einzelstränge zu einem Doppelstrang zusammenlagern und deren Zweigstellen Holiday Junctions genannt werden. Anschließend werden die freien Enden durch Neusynthese der DNA anhand der homologen Matrize durch die DNA-Polymerase I verlängert. Zuletzt werden die neusynthetisierten Stränge mit den alten Strängen durch die Ligase I verbunden und die Holiday Junctions aufgelöst. Die Reparatur über die HR verläuft fehlerfrei.

### **2.3 Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)**

Der epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), auch als ErbB-1 und HER1 bezeichnet, ist ein 170 kDa großes transmembranäres Glykoprotein und gehört zusammen mit den 3 Mitgliedern ErbB-2 (HER2 oder Neu), ErbB-3 (HER3) und ErbB-4 (HER4) zur Klasse I der Rezeptor-Tyrosinkinase. Der EGFR besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungs-Domäne, einem membranständigen Teil und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne (Gullick et al. 1985). Die verschiedenen Mitglieder der EGFR-Familie zeigen untereinander eine hohe strukturelle Homologie und unterscheiden sich durch ihre Liganden und in ihrer Tyrosinkinaseaktivität (Earp et al., 1995). Die Rezeptoren der EGFR Familie sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abb.5: Rezeptoren der EGFR Familie**

Schematische Darstellung der 4 Mitglieder der EGFR-Familie und ihrer Liganden (nach Lüftner, 2003)

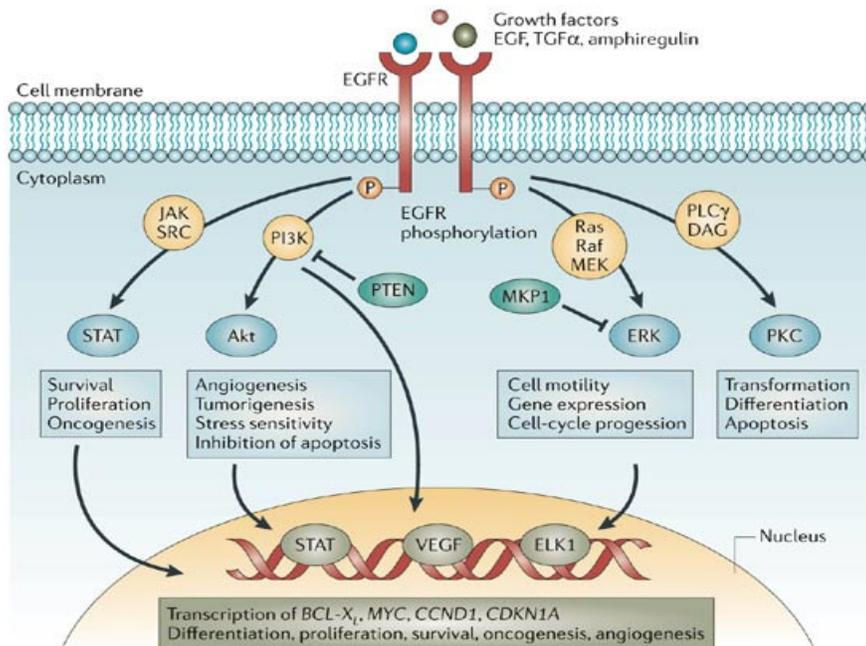
### 2.3.1 Funktion

Der EGFR wird in einer Reihe von Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs exprimiert und spielt u.a. eine Rolle im Rahmen der Embryonalentwicklung (Miettinen et al., 1995). Seine Funktion und die seiner Liganden in adulten Vertebraten bestehen in der Vermittlung von Wachstumssignalen. Binden spezifische externe Signalstoffe (Liganden) an den Tyrosinkinase-Rezeptor, werden in der Zelle definierte Signalwege in Gang gesetzt und ermöglichen der Zelle auf ihre Umgebung zu reagieren. Eine primäre Aufgabe von EGFR besteht in seiner Fähigkeit das zelluläre Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung zu beeinflussen (Nyati et al., 2006).

### 2.3.2 Signaltransduktion

Die Aktivierung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion beginnt mit der Bindung des spezifischen Liganden. Eine Vielzahl von Liganden wurde bisher für EGFR identifiziert, darunter der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der transformierende Wachstumsfaktor (TGF- $\alpha$ ), Amphiregulin,  $\beta$ -Cellulin sowie Heparin-bindendes EGF

(HB-EGF) und Epiregulin (Lüftner, 2003). Die Bindung von EGFR-spezifischen Liganden wie beispielsweise EGF an die extrazelluläre Domäne führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors mit einem anderen Rezeptor aus der EGFR-Familie (Burgess et al., 2003). Die Dimerisierung wiederum führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und damit zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne (Schlessinger, 2000; Warren et al., 2006). Durch Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste der intrazellulären Domäne werden Bindungsstellen für unterschiedliche Effektorproteine geschaffen, welche dann eine Kaskade an Signalen vom Zytoplasma bis zum Nukleus einleiten, die letztendlich die Transkription von bestimmten Zielgenen und das Auslösen zellulärer Antworten wie Zellüberleben, Proliferation, Migration, Differenzierung und Hemmung von Apoptose beeinflussen (Hackel et al., 1999; Jorissen et al., 2003; Prenzel et al., 2001). Zwei wichtige Signalwege sind der Ras/Raf/MAPK-Signalweg, der zur Aktivierung der Kinasen ERK1-2 führt (Nishinaka and Yabe-Nishimura, 2001; Sebolt-Leopold and Herrera, 2004) und der PI3K-abhängige AKT-Signalweg (Hennessy et al., 2005; Wendel et al., 2004). Eine vereinfachte Übersicht über die verschiedenen EGFR-abhängigen Signalwege zeigt Abbildung 6.



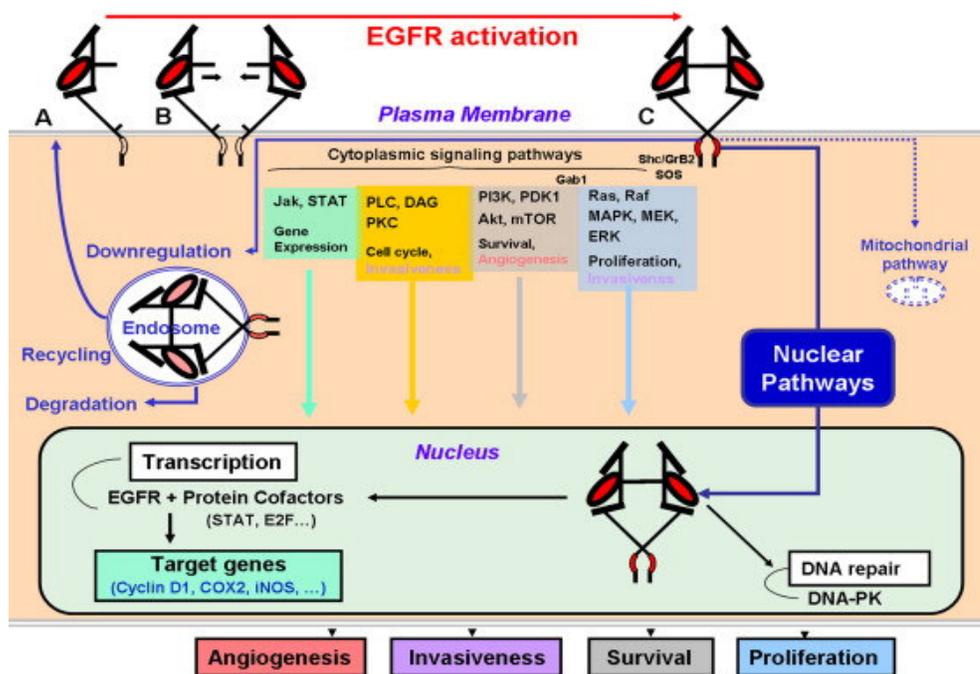
**Abb.6: EGFR-abhängige Signalwege**

Schematisch dargestellte Aktivierung des EGFR und Signalweiterleitung mit entsprechender Zellantwort (nach Nyati et al., 2006).

Neben der Aktivierung durch spezifische natürliche Liganden können auch unphysiologische Stimuli wie z.B. ionisierende Strahlung eine EGFR-Aktivierung mit nachfolgender Signalweiterleitung hervorrufen (Park et al. 2006, Yacoub et al. 2006).

### 2.3.3 Zusammenhang zwischen EGFR-Lokalisation und DNA-Reparatur

Der EGFR ist überall in der Zelle lokalisiert. Eine schematische Übersicht über die Lokalisation des Rezeptors ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abb.7: Lokalisation und Funktion des EGFR**

Dargestellt sind die Lokalisationen des EGFR nach Aktivierung sowie potentielle Funktionen (nach Thariat et al., 2007).

Der Großteil des EGFR befindet sich auf der Zelloberfläche, wo er für die Aufnahme und Weiterleitung von Signalen verantwortlich ist und Einfluss auf Zellwachstum und Proliferation nehmen kann (Nyati *et al.*, 2006; Thariat et al., 2007). Darüberhinaus ist der EGFR (in Organellen) im Zytoplasma zu finden. Die Internalisierung des Rezeptors erfolgt dabei Liganden-abhängig und dient der Inaktivierung Liganden-abhängiger EGFR-Signalgebung. Dabei kommt es über Clathrin-vermittelte Endozytose zur

Bildung von Endosomen, die dann in Abbau oder Recycling des Rezeptors münden (Warren et al., 2006; Wang et al., 2002).

Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass der EGFR im Zellkern lokalisiert und über eine Interaktion mit der DNA-PK an der Reparatur von DSBs beteiligt ist (Dittmann et al., 2005a, 2005b; Rodemann et al. 2007; Szumiel, 2006) bzw. im Kern als Transkriptionsfaktor fungiert (Lin et al., 2001; Lo et al., 2006).

Es wurde beschrieben, dass der Liganden-unabhängige nukleäre Transport von EGFR durch Stressoren wie ionisierende Strahlen hervorgerufen wird und zu einer erhöhten DNA-PK Aktivität führt, wodurch es zu einer besseren Reparatur von DSBs über das NHEJ kommt (Dittmann et al., 2005a, 2005b, Chen und Nirodi, 2007). Die Daten von Dittmann et al. (2005a) zeigen, dass der gegen den EGFR gerichtete monoklonale Antikörper Cetuximab die strahleninduzierte nukleäre EGFR-Translokation verhindert und über die ausbleibende Aktivierung der DNA-PK eine signifikante Erhöhung der residuellen DSBs und damit eine Reduktion im Zellüberleben gegenüber der Kontrolle hervorruft.

Es wird außerdem diskutiert, dass der EGFR als Co-Faktor für Transkriptionsfaktoren dient, die die Regulation von proliferationsrelevanten Genen wie Cyclin D1, iNOS und B-Myb beeinflussen (Lin et al., 2001; Lo et al., 2005; Hanada et al., 2006). Ob der EGFR als Transkriptionsfaktor für DNA-Reparaturproteine (wie beispielsweise die DNA-PK) fungiert, ist nicht klar.

Desweiteren soll der EGFR über seine regulierende Rolle in der Genexpression von XRCC1 an der Basenexzisionsreparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen beteiligt sein (Yacoub et al. 2001, 2003).

#### **2.3.4 Bedeutung des EGFR in humanen Tumoren**

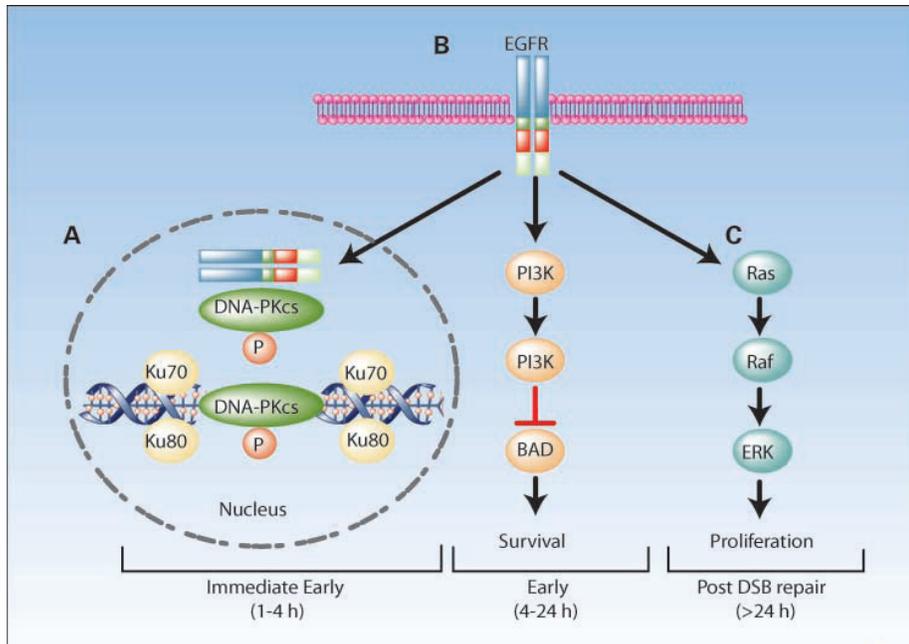
Eine Vielzahl von Daten zeigt, dass der EGFR in humanen soliden Tumoren wie Mamma-, Bronchial-, Kopf-Hals-Tumoren, Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen überexprimiert ist (Klijn et al., 1992; Bucci et al., 1997; Salomon et al., 1995; Grandis et al., 1996; Rieske et al., 1998; Goike et al., 1999; Messa et al., 1998). Eine Überexpression des EGFR ist häufig mit aggressivem Tumorwachstum, schlechter Prognose und sowohl Chemo- als auch Radioresistenz assoziiert (Ang et al. 2002;

Krause et al. 2006; Das et al. 2007; Nakamura, 2007). Als Folge der erhöhten EGFR-Konzentration kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des Rezeptors mit einer unkontrollierten Signalweiterleitung, die zu einer verstärkten Proliferation, Angiogenese, Metastasierung und anti-apoptotischen Effekten in humanen Tumorzellen führt (Song et al. 2005; Nyati et al. 2006).

Neben der Überexpression kann eine durch Mutation hervorgerufene EGFR-Hyperaktivität ähnliche zyto- und radioprotektive Effekte hervorrufen (Lammering et al., 2003).

### 2.3.5 Zusammenhang zwischen EGFR und Strahlenresistenz

Es gibt viele Hinweise dafür, dass der EGFR eine wichtige Rolle in der zellulären Strahlenantwort einnimmt und radioprotektive Funktionen hat (Akimoto et al., 1999; Bonner et al., 2006; Huang und Harari, 2002; Milas et al., 2003; Raben et al., 2004, 2005). Ein Model für EGFR-vermittelte Radioprotektion bietet die Abbildung 8 von Chen und Nirodi (2007).



**Abb.8: Model der EGFR-vermittelten Radioprotektion**

Vereinfacht dargestellt sind 3 Mechanismen der Radioprotektion nach strahleninduzierter EGFR-Aktivierung (nach Chen und Nirodi, 2007).

Nach strahleninduzierter Aktivierung des EGFR werden 3 zeitlich voneinander getrennte Mechanismen dargestellt, die eine Radioprotektion und damit verbundene Strahlenresistenz von EGFR-überexprimierenden Tumoren hervorrufen. Es wird angenommen, dass in der ersten Phase, ca. 1-4 Stunden nach Bestrahlung, die Translokation des EGFR in den Zellkern erfolgt, wo über eine Interaktion mit der DNA-PK die strahleninduzierten DNA-DSBs über das NHEJ verstärkt repariert werden (Dittmann et al., 2005a, 2005b). Desweiteren sollen hauptsächlich zwei EGFR-abhängige Signalwege, der PI3K-AKT- und der Ras-MAPK-Signalweg, verantwortlich für die Strahlenresistenz von Tumorzellen sein (Schmidt-Ullrich et al. 1997, Xing and Orsulic 2005, Kim et al. 2006, Tokunaga et al. 2006). In der zweiten Phase, ca. 4-24 Stunden nach Bestrahlung, wird über EGFR der PI3K-AKT-Signalweg aktiviert, der das Zellüberleben durch eine Hemmung der strahleninduzierten Apoptose fördert (Toulany et al., 2005b; Dent et al., 1999; Zhan et al., 2004; Contessa et al., 2002). In der späten Phase, mehr als 24 Stunden nach Bestrahlung, soll der EGFR-vermittelte Ras-MAPK-Signalweg die schnelle Zellproliferation und Tumorrepopulierung begünstigen (Schmidt-Ullrich et al., 1997; Withers et al., 1988; Dent et al., 2003).

Darüberhinaus zeigen Daten, dass die Radioresistenz von K-Ras-mutierten Tumorzellen ein Ergebnis von autokriner EGFR-Ligandenproduktion und damit verbundener verstärkter EGFR Aktivierung ist (Toulany et al. 2005b, 2006; Cengel et al. 2007).

### **2.3.6 EGFR-basierte Therapieansätze**

Ziel von EGFR-basierten Therapieansätzen in Kombination mit der Strahlentherapie ist es, durch eine Blockade des EGFR die verstärkte Weiterleitung der Signale zu inhibieren. Dadurch könnten die proliferativen und anti-apoptotischen Effekte des EGFR in Tumorzellen aufgehoben und damit eine verstärkte Radiosensitivierung hervorgerufen werden. Das Ergebnis der Strahlentherapie könnte dadurch verbessert werden, ohne das Normalgewebe zusätzlich zu schädigen.

Die Strategien zur Inhibition des EGFR sind vielfältig. Auf der extrazellulären Seite können monoklonale Antikörper (mAK) die Ligandenbindungs-Domäne blockieren und so eine Aktivierung des Rezeptors verhindern sowie zusätzlich die Tumorzelle für das Immunsystems markieren. Durch die Fusion von Radionukliden an EGFR-spezifische Antikörper soll die gezielte Applikation von interner Bestrahlung vermittelt werden.

Intrazellulär besetzen sogenannte "*small molecule*" EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (EGFR-TKIs) die ATP-Bindungsdomäne des Rezeptors und unterbinden dessen Aktivierung und dadurch die Phosphorylierung von Zielproteinen in der Signaltransduktion. Der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden verhindert die Expression des EGFR durch Hemmung seiner Transkription und Translation (Arteaga, 2001; Mendelsohn, 2001; Noonberg und Benz, 2000; Woodburn, 1999).

Am weitesten in der Entwicklung fortgeschritten sind einerseits die mAK mit Cetuximab (IMC-C225; Erbitux) und andererseits die EGFR-TKIs mit Gefitinib (ZD1839; Iressa) und Erlotinib (OSI-774; Tarceva). Alle drei Wirkstoffe befinden sich in Phase III klinischer Studien oder haben sie bereits durchlaufen. Gefitinib wurde im Jahr 2003 als erstes, gegen den EGFR gerichtetes, Therapeutikum für die Behandlung beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom zugelassen. Anfang 2004 erfolgte die Zulassung von Cetuximab beim metastasierenden Kolonkarzinom (Blackledge und Averbuch, 2004; Janmaat und Giaccone, 2003; Nyati et al., 2006).

Sowohl Antikörper als auch Inhibitoren können in Kombination mit der Strahlentherapie eingesetzt werden. Die große randomisierte Phase-III-Studie von Bonner et al. (2006) zeigt, dass Cetuximab in Kombination mit Strahlentherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (SCCHN) die Dauer der lokoregionären Krankheitskontrolle signifikant verlängert und zu einem 10%igen Gesamtüberlebensvorteil nach fünf Jahren, im Vergleich zur Bestrahlung allein, führt. Mehrere Mechanismen sind in präklinischen Studien identifiziert worden, die dazu beitragen könnten. Diese implizieren das direkte Abtöten von Krebszellen durch die EGFR-Hemmung via verstärkte Apoptose, zelluläre Radiosensitivierung durch modifizierte Signaltransduktion, Hemmung der DNA-Reparatur, reduzierte Repopulierung und verbesserte Reoxygenierung während der fraktionierten Strahlentherapie (Baumann et al., 2007). Einige Studien zeigen, dass es zu einer Zunahme der Strahlensensitivität *in vitro* und *in vivo* durch die EGFR-Antikörper und -Inhibitoren kommt (Bianco et al., 2000; Bonner et al., 2000; Huang et al., 1999; Milas et al., 2000; Nyati et al., 2004; Raben et al., 2002; Rao et al., 2000; Shintani et al., 2003). Die Mechanismen, die zur Radiosensitivierung von Tumorzellen beitragen, werden zurzeit kontrovers diskutiert. Es gibt Literaturdaten die zeigen, dass die Blockierung des EGFR durch Hemmung des Ras-MAPK-Signalwegs zur Beeinträchtigung der Zellzyklusprogression und Proliferation führt (Harari und Huang,

2006; Schmidt-Ullrich et al., 1997; Shintani et al., 2003). Andere Autoren gehen davon aus, dass eine verstärkte Apoptose und eine Verminderung der zellulären Überlebensmechanismen durch die Hemmung des PIK3-AKT-Signalweges die Mechanismen für die Strahlensensitivierung sind (Bianco et al., 2002; Huang et al., 1999; Nyati et al., 2006). Neueste Daten postulieren zusätzlich, dass die Radiosensitivierung durch mAK und TKIs das Ergebnis von herabgesetzter DNA-Reparatur, insbesondere der DSB-Reparatur, in bestrahlten Tumorzellen sein könnte (Chinnaiyan et al., 2005; Dittmann et al., 2005a, 2005b; Harari and Huang, 2002; Shintani et al., 2003; Toulany et al., 2006). Der dafür zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht geklärt, es wird jedoch angenommen, dass die Blockierung des EGFR über eine Reduktion der (nukleären) DNA-PK-Aktivität in bestrahlten Zellen zu einer verminderten DNA-Reparatur und damit zu einer Abnahme im Zellüberleben gegenüber der Kontrolle führt (Dittmann et al. 2005a; Toulany et al., 2006). Die Daten von Dittmann et al. (2005a, 2005b) zeigen, dass diese DNA-PK-Aktivitätsabnahme durch Cetuximab über eine verhinderte strahleninduzierte EGFR-Translokation in den Zellkern und die dadurch ausbleibende Aktivierung der DNA-PK begründet sein könnte. Andere Literaturhinweise deuten an, dass die EGFR-Blockade durch einen spezifischen mAK (Cetuximab) oder einen TKI (Gefitinib) zu einer Umverteilung der DNA-PK aus dem Zellkern in das Zytoplasma führt (Bandyopadhyay et al., 1998; Huang and Harari, 2000; Friedmann et al., 2006), wodurch eine reduzierte DNA-PK Aktivität im Zellkern resultiert (Bandyopadhyay et al., 1998).

### **2.3.7 Bedeutung der EGFR-Proteinmenge**

Die Daten bezüglich der Bedeutung der EGFR-Proteinmenge sind sehr heterogen. Es gibt sowohl Literaturhinweise dafür, dass das Ausmaß der EGFR-Expression in Tumorzellen positiv mit der Radioresistenz (Akimoto et al., 1999; Liang et al., 2003; Miyaguchi et al., 1998; Sheridan et al., 1997; Wollman et al., 1994) als auch mit der Radiosensitivität (Bonner et al., 2004) korreliert. Der erste Hinweis, dass die EGFR-Expression die zelluläre Radiosensitivität *in vivo* beeinflussen könnte, kam von einer Studie am Mäusemodell von Akimoto et al. (1999). Die Autoren fanden heraus, dass ionisierende Strahlen eine EGFR-Autophosphorylierung nur in murinen Karzinomen,

die einen hohen EGFR-Level haben, hervorrufen. Diese viel EGFR-exprimierenden Tumoren hatten einen höheren TCD50 (Tumor control dose 50%) Wert als die Tumoren mit einem niedrigen EGFR-Level, so dass eine positive Korrelation zwischen EGFR-Expressionsmenge, -Aktivierung und Radioresistenz zu verzeichnen war. Eine andere *in vitro* Studie konnte einen Zusammenhang zwischen EGFR-Expressionsmenge und Strahlenresistenz aufzeigen (Liang et al., 2003). Dabei führte die Transfektion eines humanen EGFR-Vektors in eine wenig EGFR-exprimierende Mauskarzinom-Zelllinie zu einer EGFR-Level-abhängigen Zunahme der Strahlenresistenz. Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von Bonner et al. (2004), die in einem ganz ähnlichen methodischen Ansatz eine positive Korrelation zwischen EGFR-Expressionsmenge und Strahlensensitivität zeigen konnten.

Es wird weiterhin diskutiert, ob der EGFR die Expression von DNA-Reparaturproteinen, wie der DNA-PKcs, modulieren kann. So zeigen die Daten von Um et al. (2004), dass Krebszelllinien, die viel EGFR exprimieren, auch eine höhere Expression von DNA-PKcs und Ku80 aufweisen, als die wenig EGFR-exprimierenden Sublinien. Desweiteren deuten die Daten darauf hin, dass die DNA-PK-Aktivität vom EGFR-Level abhängig sein könnte, denn es wurde eine höhere DNA-PK-Aktivität in Tumoren mit hohem EGFR-Level als in Tumoren mit niedrigem EGFR-Level beobachtet.

Zusätzlich gibt es Hinweise dafür, dass die DNA-PK durch eine Hemmung des EGFR beeinflusst werden könnte und dass dabei auch die EGFR-Proteinmenge eine Rolle spielen könnte. So konnte Friedmann et al. (2006) die Gefitinib-induzierte Hemmung der DNA-PK-Expression und -Aktivität nur in EGFR-überexprimierenden Krebszelllinien finden, die außerdem im Gegensatz zu der wenig EGFR-exprimierenden Zelllinie nach Gefitinib-Behandlung eine Migration der DNA-PKcs vom Zellkern ins Zytosol zeigten.

Obwohl noch nicht geklärt ist, ob der absolute EGFR-Proteinlevel die radiosensitivierenden Eigenschaften einer EGFR-basierten Therapie beeinflusst, finden sich in der Literatur einige Angaben dafür, dass das Ausmaß der EGFR-Expression in Tumorzellen positiv mit der Radiosensitivierbarkeit nach EGFR-Hemmung korreliert (Balaban et al., 1996; Bianco et al., 2000; Bonner et al., 2004; Huang and Harari, 2000, 2002; Huang et al., 1999; Milas et al., 2000; Liang et al., 2003). Ein Hinweis, dass die EGFR-Menge bedeutend für die Radiosensitivierbarkeit von Krebszellen ist, bieten die

Daten von Bonner et al. und Liang et al. (2004; 2003). In beiden führte die Transfektion eines EGFR-Vektors in eine wenig EGFR-exprimierende Tumorzelllinie zu einer EGFR-Mengen-abhängigen Zunahme der Radiosensitivierbarkeit nach der Behandlung mit dem Antikörper Cetuximab.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Zelllinien**

Folgende humane Brustkrebszelllinien wurden untersucht:

MDA-MB-468-WT (~30 fache EGFR-Genamplifikation)

MDA-MB-468-+EGF (~2-3 fache EGFR-Genamplifikation)

MDA-MB-468-0106 (~13,5 fache EGFR-Genamplifikation)

MDA-MB-468-0107 (~2,5-3,5 fache EGFR-Genamplifikation)

Eingesetzt wurde die MDA-MB-468-WT Brustkrebszelllinie sowie drei davon abgeleitete Subklone, die sich durch lang andauernde Modulation der Kultivationsbedingungen in ihrer EGFR-Genamplifikation deutlich unterscheiden und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. B. Brandt (Tumorbiologie, UKE) zur Verfügung gestellt wurden. Die MDA-MB-468-WT Zelllinie ist der Ursprung der anderen Zelllinien und trägt eine ca. 30 fache EGFR-Genamplifikation. Dieser Wildtyp-Linie wurden über einen längeren Zeitraum (> ein Jahr) bei jeder Passage 5 nM EGF zum Medium hinzugefügt. Dadurch entstand (durch einen noch unbekanntem Mechanismus) die MDA-MB-468-+EGF Zelllinie, die eine auf ca. 2-3 fach reduzierte EGFR-Genamplifikation hat. Entzog man der EGFR supprimierten MDA-MB-468-+EGF Zelllinie nun wieder EGF aus dem Medium, wurde eine erneute EGFR Amplifikation beobachtet. So entstand durch den EGF Entzug seit Januar 2006 die MDA-MB-468-0106 Zelllinie, die nun wieder eine ca. 13,5 fache EGFR-Genamplifikation aufweist. Der EGF Entzug seit Januar 2007 führte zur MDA-MB-468-0107 Zelllinie, die eine ca. 2,5-3,5 fache EGFR-Genamplifikation trägt.

#### **3.2 Zellkultur**

Die Zelllinien wurden in 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 10% CO<sub>2</sub>, 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert.

Als Wachstumsmedium für die MDA-MB-468-WT/-0106/-0107 Zellen diente DMEM unter Zusatz von 5% hitzeinaktiviertem FCS, 2% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Hitzeinaktivierung des FCS erfolgte für eine Stunde bei 65°C im Wasserbad. Für die MDA-MB-468-+EGF Zelllinie wurde DMEM mit 5%

hitzeinaktiviertem FCS, 2% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin mit zusätzlich 5 nM EGF verwendet.

Das Passagieren der Zellen erfolgte vor dem Erreichen der Konfluenz, alle vier bis fünf Tage. Dafür wurde das Medium abgesaugt und 4-8 ml EDTA-Trypsin in die Zellkulturflaschen pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 10-20 Sekunden wurde das EDTA-Trypsin abgesaugt und die Zellkulturflasche verschlossen in den Wärmeschrank gelegt. Nachdem sich die Zellen vom Boden der Flasche gelöst hatten, wurden diese in 5-15 ml frischen Mediums aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung dieser Zellsuspension erfolgte mit Hilfe des Coulter-Counters. Nun konnte die gewünschte Zellzahl mit frischem Medium in die neuen Zellkulturflaschen ausgesät werden.

### **3.3 Wachstumskinetik**

Das Wachstumsverhalten der vier MDA-MB-468 Zelllinien wurde zum einen unter deren Standardkultivationsbedingungen mit einer Wachstumskurve für jede Zelllinie untersucht.

Um den Einfluss des EGF im Medium auf das Wachstumsverhalten der Zellen charakterisieren zu können, wurde zum anderen für jede Zelllinie eine Wachstumskurve mit und ohne EGF-Zugabe (5 nM) im Medium erstellt.

Für beide Ansätze wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen pro 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Im Abstand von 24 Stunden wurden die Zellen einer Zellkulturflasche abtrypsinisiert und die Zellzahl insgesamt pro Flasche mit Hilfe des Coulter-Counters bestimmt.

### **3.4 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie**

Die Zellzyklus-Bestimmung der Zellen erfolgte mit dem Flusszytometer FACScan. Bei dieser Analyse wird der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) eingesetzt, welcher in die DNA einer Zelle interkaliert. Passiert die Zelle nun den Laserstrahl des Flusszytometers, emittiert sie Fluoreszenzlicht, das proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. Dadurch können Zellen mit einfachem DNA-Gehalt von Zellen mit doppeltem

DNA-Gehalt unterschieden werden, so dass es möglich ist, Rückschlüsse auf die Zellzyklusverteilung zu ziehen.

Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Zellen mit Trypsin geerntet, in Medium aufgenommen und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1500 U und Raumtemperatur für 5 Minuten wurde das Zellpellet in 1×PBS aufgenommen. Die Zelldichte sollte ca.  $10^6$  Zellen pro ml betragen. Nachdem dieser Schritt wiederholt wurde, wurde 1 ml Zellsuspension unter permanentem Vortexen in 6 ml 80% Ethanol (-20°C) eingetropt. Die Fixierung erfolgte über Nacht bei -20°C. Für die DNA-Fluoreszenzfärbung am nächsten Tag wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 1500U zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 3 ml 1×PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (1500 U, RT, 5 min.). Nach dem Abgießen des Überstandes wurde in jedes Röhrchen 1 ml PI-RNase Lösung hinzugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die RNase ist notwendig, um die RNA der Zellen zu verdauen, da PI in jede Nukleinsäure interkaliert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben durch eine Nylon-Gaze mit einer Porengröße von 43 µm gefiltert und in FACS Messröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die flusszytometrische Messung mit dem FACScan. Dabei wurde das PI-Signal im Fluoreszenzkanal 2 (FL2) im Bereich von 564-606 nm aufgenommen. Für die Zellzyklus-Analyse wurden ca. 5.000 Zellen erfasst. Die gemessenen Daten wurden mit einem Macintosh V 3.0 Betriebssystem und der Software Cell Quest Pro aufgenommen und mit der Software Mod Fit LT ausgewertet.

### **3.5 Nachweis spezifischer Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot**

Die SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ermöglicht es die im Gesamtzellextrakt enthaltenen Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Um Proteine ausschließlich ihrer Größe nach aufzutrennen zu können, müssen die Sekundär-/Tertiärstrukturen entfernt werden. Dazu werden die Proben mit DTT und SDS versetzt. DTT löst die Schwefelbrücken in den Proteinen, wodurch diese linearisiert werden. SDS ist ein negativ geladenes Detergenz, das die Proteine mit einer negativen Ladung umhüllt, so dass die Proteineigenladung kompensiert wird. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an das Gel wandern die Proteine in Richtung Anode und werden

ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die kleinen Proteine schneller durch das Gel wandern als die großen. Mittels Western Blot werden die Proteine aus dem Gel auf eine Trägermembran überführt und dort fixiert. Für den immunologischen Nachweis des Zielproteins wird ein spezifischer Antikörper eingesetzt, der gegen genau dieses Protein gerichtet ist und an dieses bindet. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper eingesetzt, der an das Fc-Fragment des ersten Antikörpers bindet. An dem zweiten Antikörper ist die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche bei Zugabe eines entsprechenden Substrates eine Lichtreaktion auslöst, die dann durch eine Kamera oder über lichtempfindliche Filme sichtbar gemacht werden kann. Ein während der Gelelektrophorese mitgeführter Molekulargewichtsmarker ermöglicht eine Größenordnung der Proteine.

### **3.5.1 Gesamtzell-Proteinextraktion mit Ultraschall**

Gesamtzellproteinextrakte enthalten alle Proteine einer Zelle. Für die Gesamtzell-Proteinextraktion mit Ultraschall wurden 12-well-Platten benutzt. Dabei wurden 5 Tage vor Extraktion  $1,5 \times 10^5$  Zellen in insgesamt 1 ml Volumen Medium angesetzt. Nach der Wachstumszeit von 5 Tagen wurde das Medium abgesaugt. Danach erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l SDS-Lysepuffer in jedes Well. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und in Eppendorfcups überführt. Jedes Zellextrakt wurde dann mit Ultraschall (Cycle 1, Amplitude: 100%) bei Raumtemperatur für ca. 5-10 Sekunden behandelt, um die DNA zu fragmentieren. Anschließend wurden die Extrakte für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und danach für 3 Minuten im Wasserbad aufgekocht. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

### **3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA-Assay. Diese Methode beruht darauf, dass Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen dieses Komplexes werden zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert, die mit Bicinchinon-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden.

Die Absorption dieses Farbkomplexes wird im Photometer bei 562 nm gemessen. Der Messbereich dieser Methode liegt in einem Proteinkonzentrationsbereich von 20 – 2000 µg/ml. Als Eichreihe diente BSA in den Konzentrationen von 0 – 1000 µg/ml.

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 2 µl Zellextrakt mit 48 µl destilliertem Wasser verdünnt. Als Leerwert diente 2 µl Extraktionspuffer mit 48 µl destilliertem Wasser. Die Proben und die Leerprobe wurden mit 1 ml Farbreagenz gemischt, welches zu 50 Teilen aus Reagenz A und einem Teil aus Reagenz B besteht. Anschließend kamen die Proben für 30 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad. Je nach Proteingehalt verfärbten sich die Probe von grün nach violett. Danach wurden die Proben in Küvetten überführt und die Absorption im Photometer bei 562 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration in µg/ml war nun anhand der Eichreihe möglich.

### **3.5.3 SDS-PAGE**

Durch die SDS-PAGE wurden die im Gesamtzellextrakt enthaltenen Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Verwendet wurden Fertiggele, die nach dem Auspacken in destilliertem Wasser gespült wurden. Danach wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt, welche mit Lauffpuffer gefüllt in den Kühlschrank gestellt wurde. Anschließend wurden 20 oder 30 µg Zellextrakt mit 5 µl 5×Probenpuffer versetzt und mit destilliertem Wasser auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden durchmischt, kurz bei 4°C zentrifugiert und dann für 5 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen. Nach dem Aufkochen wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und nochmals für eine Minute bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Dabei wurde je eine Geltasche mit einem Farb-Molekulargewichtsmarker (Kaleidoskop) und einem ECL-Molekulargewichtsmarker (Magic Mark) beladen. Der sichtbare Farbmarker zeigte die Proteinauftrennung im Gel und anschließend die Effizienz des Blots an. Der andere Marker wurde erst unter der Reaktion mit ECL sichtbar und diente dazu das Molekulargewicht der einzelnen Proteinbanden bestimmen zu können. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit der Sammelphase für 5 Minuten bei 100 V und der Trennphase mit 200 V für ca. 50 Minuten.

### **3.5.4 Western Blot (Proteintransfer)**

Der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine erfolgte auf eine PVDF-Trägermembran. Hierfür wurde die PVDF-Membran zunächst auf Gelgröße zurechtgeschnitten, kurz in Methanol aktiviert, dann 5 Minuten in destilliertem Wasser geschwenkt und 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Zwei Blotschwämme und zwei auf Gelgröße zurechtgeschnittene Filterpapiere wurden ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Gelkammer herausgenommen, der Gelplastikrahmen aufgebrochen und die Sammeltaschen und der untere Rand des Gels entfernt. Das Gel wurde in Transferpuffer äquilibriert und anschließend mit Hilfe eines Filterpapieres in die Blothaltung überführt. Die Blotschichtung bestand aus Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier und Schwamm. Diese wurde dann so zwischen die Elektroden der Blotkammer gesteckt, dass die zur Anode wandernden Proteine auf der Oberfläche der anliegenden PVDF-Membran gebunden werden. Die Blotkammer wurde nun mit eisgekühltem Transferpuffer gefüllt. Der Western Blot erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 10 V und einer Temperatur von 4°C.

### **3.5.5 Detektion und Auswertung der Proteinsignale**

Nach dem Proteintransfer wurde eine Kontrollfärbung des Gels durchgeführt. Dafür wurde das Gel für 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung geschwenkt, für eine Minute in Methanol fixiert und anschließend mit Entfärber entfärbt. Dadurch konnte man die im Gel verbliebenen Proteine darstellen und auf die Qualität des Western Blots schließen. Parallel dazu wurde die Membran mit TBS-Tween 20 gewaschen und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Blockierung erfolgte mit Magermilch und/oder BSA und diente dazu alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Nach der Blockierung wurde die Membran einige Minuten in TBS-Tween 20 gewaschen und anschließend mit dem ersten Antikörper über Nacht unter leichtem Schwenken bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mehrmals in TBS-Tween 20 gewaschen bevor die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur folgte. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Membran für eine Minute mit dem ECL-Reagenz benetzt, welches zu gleichen Teilen aus ECL-Reagenz 1 und 2 besteht. Dann wurde die Membran zwischen zwei durchsichtige

Plastikfolien gelegt und das überschüssige ECL-Reagenz entfernt. Die Detektion der Proteinsignale erfolgte über die Belichtung von lichtempfindlichen Röntgenfilmen und mit einer lichtsensitiven Kamera (Night Owl). Die Kamera ermöglicht die Quantifizierung und die Auswertung der Proteinsignale durch Aufnahme der Chemilumineszenz, die durch die Meerrettichperoxidase-vermittelte (gekoppelt an den zweiten Antikörper) Umwandlung des Substrats erzeugt wird. Die Zuordnung der Proteinsignale zu den jeweiligen Proteinen konnte anhand des Molekulargewichtsmarkers bestimmt werden. Für die Auswertung mit der Software Winlight wurden gleich große Rahmen um die einzelnen Proteinsignale und deren Hintergrund gelegt, in denen die abgegebene Lichtemission pro Fläche bestimmt wurde. Anschließend wurden die Proteinsignale um das Hintergrundsignal korrigiert. Um Messfehler durch unterschiedliche Gelbeladungen auszuschließen, wurden die korrigierten Proteinsignale durch die entsprechenden  $\beta$ -Actinsignale dividiert. Actin ist ein Protein, welches unter allen Bedingungen konstant in der Zelle exprimiert wird. Um die Aktivierung des EGF-Rezeptors und dessen Signalproteinen zu bestimmen, wurden die korrigierten phosphorylierten Proteinsignale durch die korrigierten Proteinsignale im Basallevel dividiert. Für die Detektion mehrerer Proteine auf der gleichen Membran wurde das beschriebene Vorgehen mit dem jeweils spezifischen Antikörper wiederholt.

**Tabelle 1: Nachweisbedingungen des EGFR (Basallevel und aktiviert)**

Zielprotein	EGFR	Phospho-EGFR
Blockierung: 1h bei RT	5%MM + 5%BSA	5%MM + 5%BSA
1.Waschen	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 5×5min
1.AK Über Nacht (4°C)	Anti-EGFR aus Kaninchen Cell Signalling #2232 1:2000 (5%BSA)	Anti-Phosphotyrosine MAb = PY20 aus Maus BD Biosciences Pharmingen #610000 1:1 000 (5%BSA)
2.Waschen	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 5×5min
2.AK 1h bei RT	Anti-Kaninchen Amersham: NA934 1:1500 (5%BSA)	Anti-Maus Amersham: NA931 1:000 (5%BSA)
3.Waschen	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 6×5min
Molekulargewicht	~ 170 kDa	~ 170 kDa

**Tabelle 2: Nachweisbedingungen der DNA-Reparaturproteine**

Zielprotein	DNA-PKcs	XRCC1	Ku70	$\beta$ -Actin	Rad51
Blockierung 1h bei RT	10%MM	5% MM	10%MM	5%MM	15%MM
1.Waschen	1×kurz, 1×10min	1×kurz, 1×10min	1×kurz, 1×10min	1×kurz, 1×10min	1×kurz, 1×10min
1.AK  Inkubation:	Anti-DNA- PKcs aus Kaninchen Calbiochem Ab-1/PC127 1:800 (5%MM) Über Nacht (4°C)	Anti-XRCC1 aus Kaninchen Serotec AHP832 1:1000 (5%MM) Über Nacht (4°C)	Anti-Ku70 aus Maus Novus: 2C3.11 NB 100-102 1:1000 (5% MM) Über Nacht (4°C)	Anti-Actin aus Maus Sigma A5441  1:10000 (5%MM) 20 min (RT)	Anti-Rad51 aus Kaninchen Calbiochem Ab-1/PC130 1:3000 (15%MM) Über Nacht (4°C)
2.Waschen	1×kurz, 3×10min	1×kurz, 3×10min	1×kurz, 3×10min	1×kurz, 3×10min	1×kurz, 3×10min
2.AK 1h bei RT	Anti- Kaninchen Amersham: NA934 1:1500 (5%MM)	Anti- Kaninchen Amersham: NA934 1:1500 (5%MM)	Anti-Maus Amersham: NA931  1:000 (5%MM)	Anti-Maus Amersham: NA931  1:000 (5%MM)	Anti- Kaninchen Amersham: NA934 1:1500 (5%MM)
3.Waschen	1×kurz, 4×15min	1×kurz, 4×15min	1×kurz, 4×15min	1×kurz, 4×15min	1×kurz, 4×15min
Molekulargewicht	~ 400 kDa	~ 90 kDa	~ 70 kDa	~ 42 kDa	~ 38 kDa

**Tabelle 3: Nachweisbedingungen der EGFR-Signalproteine (Basallevel und aktiviert)**

Zielprotein	AKT	Phospho-AKT	MAPK	Phospho-MAPK
Blockierung: 1h bei RT	5%MM + 5%BSA	5%MM + 5%BSA	5%MM	5%BSA
1.Waschen	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 5×5min
1.AK Über Nacht (4°C)	Anti-AKT  aus Kaninchen Cell Signalling #9272 1:1000 (5%MM+5%BSA)	Anti-P-AKT (Ser473) aus Kaninchen Cell Signalling #9272S 1:1000 (5%BSA)	Anti-MAPK  aus Maus Cell Signalling #9107 1:1000 (5%MM)	Anti-P-MAPK (p44/42) aus Kaninchen Cell Signalling #4370S 1:1000 (5%BSA)
2.Waschen	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 5×5min
2.AK 1h bei RT	Anti-Kaninchen Amersham: NA934  1:2000 (5%BSA)	Anti-Kaninchen Amersham: NA934  1:2000 (5%BSA)	Anti-Maus Amersham: NA931  1:2000 (5%BSA)	Anti- Kaninchen Amersham: NA934 1:2000 (5%BSA)
3.Waschen	1×kurz, 6×5min	1×kurz, 6×5min	1×kurz, 5×5min	1×kurz, 5×5min
Molekularge wicht	~ 60 kDa	~ 60 kDa	~ 40 kDa	~ 40 kDa

### 3.6 Bestrahlung und Dosimetrie

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einer Gulmay-Röntgenröhre bei einem Röhrenstrom von 15 mA, einer Röhrenspannung von 200 kV und einem 0,5 mm Kupferfilter. Die Zellen wurden mit einer Dosisleistung von 1,2 Gy/min bei Raumtemperatur bestrahlt.

### **3.7 Nachweis von residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen mittels $\gamma$ H2AX-Foci Technik**

Die durch die ionisierenden Strahlen erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) wurden nach einer Reparaturzeit von 24 Stunden mittels  $\gamma$ H2AX-Foci Technik nachgewiesen.

Diese Technik macht sich zunutze, dass die DNA um basische Proteine, die Histone, gewickelt ist. Der Komplex aus DNA und Histonen wird als Chromatin bezeichnet. Die kleinste Untereinheit des Chromatins ist das Nucleosom, welches aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 besteht, um das die DNA 1,8-mal gewickelt ist. Das Histon H1 ist an der Bildung des Nucleosom nicht beteiligt, sondern lagert sich von außen an die DNA (Löffler, 2002).

Zum indirekten Nachweis von DSBs eignet sich das Histon H2AX. Es macht etwa 10% der H2A Fraktion aus und ist innerhalb des Chromatins gleichmäßig verteilt (van Attikum *et al.*, 2005). Entsteht ein DSB, so werden innerhalb weniger Minuten mehrere Tausend H2AX im Bereich von mehreren Megabasenpaaren um den Bruch am Ser139 phosphoryliert. Die phosphorylierte Form von H2AX wird als  $\gamma$ H2AX bezeichnet. Da die  $\gamma$ H2AX im Bereich des Bruchs in so gehäufte Zahl auftreten, können sie nach einer Färbung mit spezifischen Antikörpern in der Fluoreszenzmikroskopie in Form von Foci sichtbar gemacht werden. Dabei bindet der erste Phosphorylierungs-spezifische Antikörper an  $\gamma$ H2AX. Der zweite Antikörper ist gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet und mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt, der mit den entsprechenden Fluoreszenzfiltern im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Bei dieser Färbung spiegelt ein  $\gamma$ H2AX-Focus einen DSB wieder. Mit zunehmender Reparaturzeit nimmt die Zahl  $\gamma$ H2AX-Foci im Zellkern aufgrund der mit der Reparatur der DSBs einhergehenden Dephosphorylierung ab.

#### **3.7.1 $\gamma$ H2AX Färbung**

Für die  $\gamma$ H2AX Färbung wurden 5 Tage vor Präparation 400.000 Zellen in 3 ml Medium pro Culture Slide angesetzt. Nach einer Wachstumszeit von 4 Tagen wurden die Zellen für die Bestrahlung aus dem Brutschrank entnommen. War eine Beimpfung

mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib vorgesehen, wurde diese 2 Stunden vor Bestrahlung durchgeführt. Anschließend hatten die Zellen 24 Stunden Zeit, um ihre DSB zu reparieren, bevor das Medium abgesaugt und die Zellen auf dem Slide fixiert wurden. Die Fixierung erfolgte in 2% Formaldehyd in 1×PBS bei RT für 15 Minuten und führte dazu, dass die Zellen in ihrem Zustand unverändert blieben. Nach dreimaligem Waschen in 1×PBS folgte die Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,2% Triton X-100 in 1×PBS + 1% BSA für 5 Minuten auf Eis, wodurch die Zellmembran für die Antikörper durchlässig wurde. Ab jetzt wurde im Dunkeln gearbeitet. Um unspezifische Antigenstrukturen zu beseitigen, wurden die Zellen in 1×PBS + 3% BSA für eine Stunde bei RT blockiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Feuchtkammer mit 50 µl der ersten Antikörper-Lösung (anti- $\gamma$ H2AX, 1:100 in 1×PBS + 1% BSA + 0,5% Tween 20) überschichtet und mit einem Plastikdeckgläschen versehen. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei RT wurde der nicht gebundene Antikörper durch 3×10 minütiges Waschen mit 1×PBS + 1% BSA + 0,5% Tween 20 entfernt. Danach erfolgte die Inkubation des zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörpers für eine Stunde bei RT. Dafür wurden die Zellen in der Feuchtkammer mit 50 µl der zweiten Antikörper-Lösung (Alexafluor 594, 1:600 in 1×PBS + 1% BSA + 0,5% Tween 20) versehen und mit Plastikdeckgläschen bedeckt. Anschließend wurden die Slides mit 0,5% Tween 20 in 1×PBS 4×10 Minuten gewaschen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Dafür wurden die Slides mit 15 µl DAPI versehen, mit Glasdeckgläschen bedeckt und zwischen einen Trockenblock gelegt, um überschüssiges DAPI herauszudrücken. Abschließend wurden die Slides mit Nagellack versiegelt und konnten so bis zur Auswertung im Dunkeln bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

### **3.7.2 Auswertung der $\gamma$ H2AX-Foci**

Die kodierte Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit dem Filter 5 (FITC) und 6 (FITC, DAPI) und einer 100 fachen Vergrößerung. Pro Slide wurden die Foci von 100 Zellen ausgezählt. Dabei wurde das Präparat mäanderförmig durchsucht und es wurden alle Zellen pro Blickfeld ausgezählt. Voraussetzung dafür war, dass pro Blickfeld mindestens eine Zelle einen Focus hatte, so konnte man davon ausgehen, dass an dieser Stelle die Färbung korrekt funktioniert

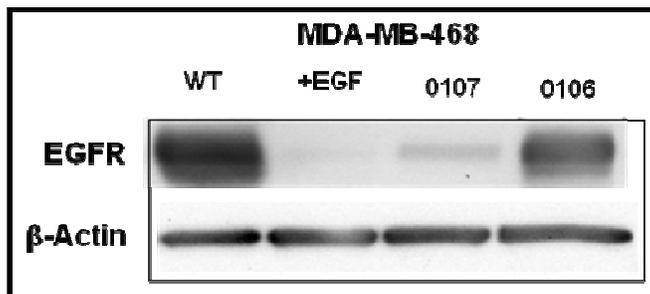
hat. Zellen mit 0-29 Foci wurden einzeln ausgezählt. Zellen mit mehr als 30 Foci wurden nicht genauer ausgezählt, sondern mit 30 Foci/Zelle angegeben.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 EGFR-Expression

Die unterschiedliche EGFR-Expression der vier MDA-MB-468 Zelllinien wurde zu Beginn der Arbeit mittels Western Blot überprüft. Hierzu wurden Gesamtzellextrakte der Zelllinien (unter den entsprechenden Standardkultivationsbedingungen gewachsen) mit der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und der EGFR mittels Western Blot detektiert. Um unterschiedliche Gelbeladungen auszuschließen, wurde die Expression von  $\beta$ -Actin mitbestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt und zeigen, dass bei gleicher Gelbeladung starke Unterschiede in der EGFR-Expression zwischen den Zelllinien bestehen. Die MDA-MB-468-WT Zelllinie (WT) zeigt dabei die stärkste (10 fache) und die MDA-MB-468-+EGF Zelllinie (+EGF) die schwächste (1 fache) EGFR-Expression. Die MDA-MB-468-0107 Zelllinie (0107) und MDA-MB-468-0106 Zelllinie (0106) befinden sich dazwischen und haben eine 1,7 fache und 8,6 fache EGFR-Expression.



**Abb.9: EGFR-Expression der vier MDA-MB-468 Zelllinien**

20  $\mu$ g Gesamtzellextrakt wurden von jeder Zelllinie (unter Standardkultivation gewachsen) eingesetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expression des EGFR wurde mittels Western Blot detektiert. Der Nachweis von  $\beta$ -Actin diente als Kontrolle zur gleichmäßigen Gelbeladung.

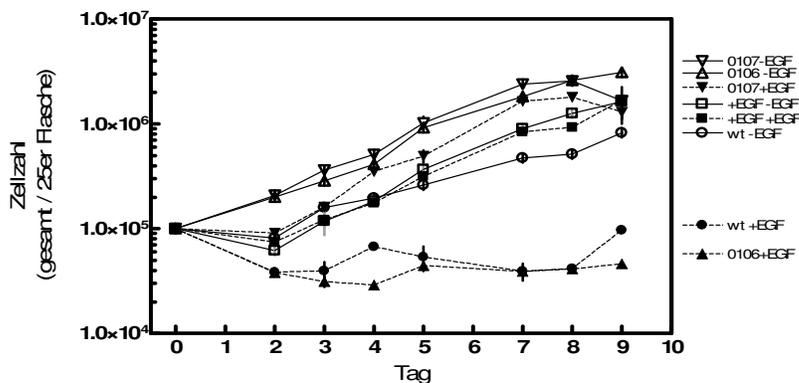
### 4.2 Wachstumskinetik

Das Wachstumsverhalten der vier MDA-MB-468 Zelllinien wurde zunächst unter den Standardkultivationsbedingungen mit einer Wachstumskurve für jede Zelllinie untersucht. Da die +EGF Zelllinie als einzige standardmäßig in EGF-haltigem Medium kultiviert wurde, wurde zusätzlich der Einfluss des EGF im Medium auf das

Wachstumsverhalten der übrigen Zellen untersucht. Parallel dazu wurde auch der Entzug des EGF aus dem Medium der +EGF Zelllinie auf ihr Wachstumsverhalten bestimmt. Es wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen pro  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflasche mit und ohne EGF-Zugabe (5 nM) ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Im Abstand von 24 Stunden wurde die Zellzahl bestimmt.

Abbildung 10 zeigt die Wachstumskinetik der vier MDA-MB-468 Zelllinien mit und ohne EGF Zugabe ins Medium. Alle vier Zelllinien zeigen unter Standardkultivation ein ähnliches Wachstumsverhalten. Die Zellzahl steigt bei allen mit der Zeit an, wobei die WT Zelllinie mit ca. 250.000 Zellen am Tag 5 und ca. 800.000 Zellen am Tag 9 am langsamsten wächst. Die schnellste Wachstumskinetik zeigen die 0107 und 0106 Zelllinien, die am Tag 5 ca. 900.000 Zellen und am Tag 9 ca. 1.500.000 Zellen aufweisen. Die +EGF Zelllinie liegt mit ihrer Wachstumskinetik zwischen der WT Zelllinie und den 0107/0106 Zelllinien. Der Entzug des EGF aus dem Medium der +EGF Zelllinie verursacht kein verändertes Wachstumsverhalten. Die Wachstumskurven der +EGF Zelllinie mit und ohne EGF Stimulation sind nahezu identisch.

Die EGF Zugabe bringt keine Veränderung der Wachstumskinetik bei der 0107 Zelllinie. Im Gegensatz dazu führt die EGF Zugabe bei der WT und der 0106 Zelllinie zu einem deutlichen antiproliferativen Effekt. Die Zellzahl der beiden Zelllinien nimmt mit der Zeit nicht zu, sondern bleibt relativ konstant bei ca. 50.000 Zellen. Aufgrund dieses antiproliferativen Effekts und der Tatsache, dass die +EGF Zelllinie ihr Wachstumsverhalten durch den EGF Entzug aus dem Medium nicht ändert, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit alle Versuche ohne EGF Zugabe im Medium durchgeführt.



**Abb.10: Wachstumskinetik der MDA-MB-468 Zelllinien +/- EGF- Zugabe (5 nM)**

Es wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflasche mit und ohne EGF-Zugabe (5 nM) zum Zeitpunkt 0 ausgesät. Die Zellzahlbestimmung erfolgte alle 24 Stunden mittels Coulter Counter.

### 4.3 Zellzyklus-Analyse

Für die weitere Charakterisierung der Zellen wurde die Zellzyklusverteilung der Zelllinien mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür wurden die Zelllinien unter deren Standardkultivationsbedingungen eingesetzt, nach gleicher Wachstumszeit geerntet, fixiert und mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt. Anschließend erfolgte die Messung mit dem Flusszytometer FACScan. Dabei emittiert jede Zelle Fluoreszenzlicht, das proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist. Da Zellen in der G1-Phase einen einfachen, in der S-Phase einen erhöhten und in der G2-Phase einen doppelten DNA-Gehalt haben, ist es möglich Rückschlüsse auf ihre Zellzyklusverteilung zu ziehen.

In Tabelle 1 sind die ausgewerteten Daten der Zellzyklus-Analyse jeder Zelllinie dargestellt. Die Zellzyklusverteilung der vier Zelllinien ist sehr ähnlich mit einem Anteil von ca. 62% in der G1-Phase, ca. 23% in der S-Phase und ca. 16% in der G2-Phase.

<b>Zelllinie:</b>	<b>%G1</b>	<b>%S</b>	<b>%G2</b>
WT	62,68	24,90	12,41
+EGF	59,93	21,46	18,61
0107	61,04	22,47	16,49
0106	62,94	21,70	15,35

**Tab. 1: Zellzyklusverteilung der MDA-MB-468-Zelllinien**

Die Zellen (unter Standardkultivation gewachsen) wurden geerntet, fixiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Messung erfolgte mit dem Flusszytometer FACScan. In die Auswertung gingen 5.000 Zellen pro Zelllinie ein.

### 4.4 Expression und Aktivierung von EGFR und EGFR-abhängigen Signalproteinen

Die Expression und Aktivierung/Phosphorylierung von zwei wichtigen EGFR-abhängigen Signalproteinen, AKT und MAPK, wurde für die vier MDA-MB-468 Zelllinien mittels Western Blot bestimmt. Zusätzlich wurde auf der gleichen Membran die EGFR-Expression und Aktivierung nachgewiesen. Die Detektion von  $\beta$ -Actin diente als Kontrolle für gleiche Gelbeladung. Es wurden Gesamtzellextrakte der Zellen ohne EGF-Zusatz im Medium eingesetzt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels

Western Blot auf eine Membran übertragen. Die basale Expression von EGFR, AKT und MAPK sowie die aktivierte Form als P-EGFR, P-AKT und P-MAPK wurden mit Hilfe spezifischer/phospho-spezifischer Antikörper mit der Immunreaktion detektiert.

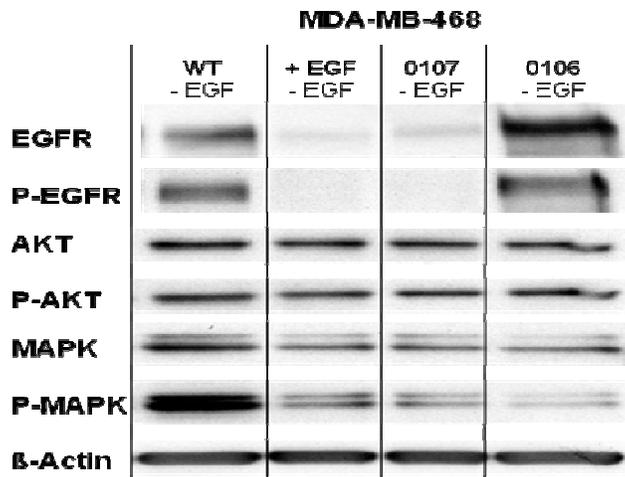
Es sollte untersucht werden, ob sich der Unterschied in der EGFR-Expression der vier Zelllinien zum einen auf die Aktivierung des EGFR und zum anderen auf die Expression und Aktivierung davon abhängiger Signalproteine AKT und MAPK überträgt.

In Abbildung 11A ist die Expression und Phosphorylierung der Proteine in einem exemplarischen Western Blot abgebildet. Die Abbildung 11B zeigt den aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelten Proteinbasallevel von EGFR, AKT und MAPK der vier Zelllinien, das um den Hintergrund korrigiert und auf  $\beta$ -Actin normiert wurde. Die Proteinphosphorylierung ist in Abbildung 11C dargestellt, hierbei sind die um den Hintergrund korrigierten phosphorylierten Proteinsignale P-EGFR, P-AKT und P-MAPK durch die korrigierten Proteinsignale im Basallevel dividiert und aus zwei unabhängigen Experimenten gemittelt.

Aus Abbildung 11A und B wird deutlich, dass sich der starke Unterschied in der EGFR-Expression zwischen den vier Zelllinien nicht in der Expression der Signalproteine AKT und MAPK fortsetzt. Obwohl die +EGF und die 0107 Zelllinien eine um den Faktor 7 reduzierte EGFR-Expression gegenüber den WT und 0106 Zelllinien aufweisen, kann man entsprechende Unterschiede nicht in der Expression von AKT und MAPK beobachten.

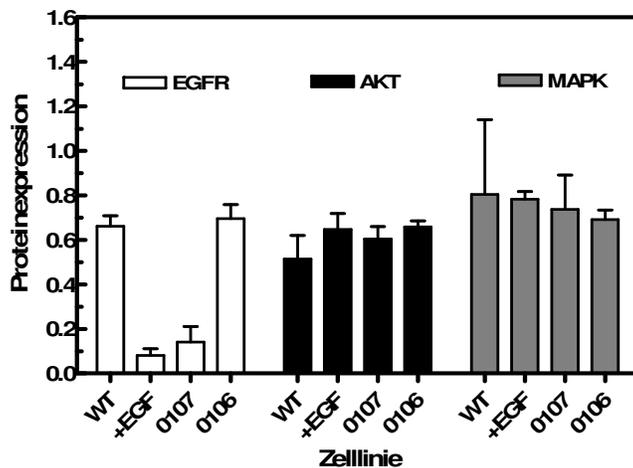
Die Abbildung 11C zeigt, dass sich der starke Unterschied in der EGFR-Expression der Zelllinien auch auf die Phosphorylierung des EGFR (P-EGFR) überträgt. Die WT und 0106 Zelllinien, die eine 7 fache EGFR-Expression haben, weisen eine entsprechend stärkere EGFR-Phosphorylierung (9 fach) auf. Die +EGF und die 0107 Zelllinien, die eine 1 fache EGFR-Expression zeigen, haben dementsprechend eine schwache Phosphorylierung des EGFR (0,4 fach).

Zum anderen wird zusätzlich deutlich, dass sich die unterschiedliche EGFR-Aktivierung nicht auf die Aktivierung von AKT (P-AKT) und MAPK (P-MAPK) überträgt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ist die Phosphorylierung von AKT (P-AKT) und MAPK (P-MAPK) innerhalb der vier Zelllinien relativ konstant.



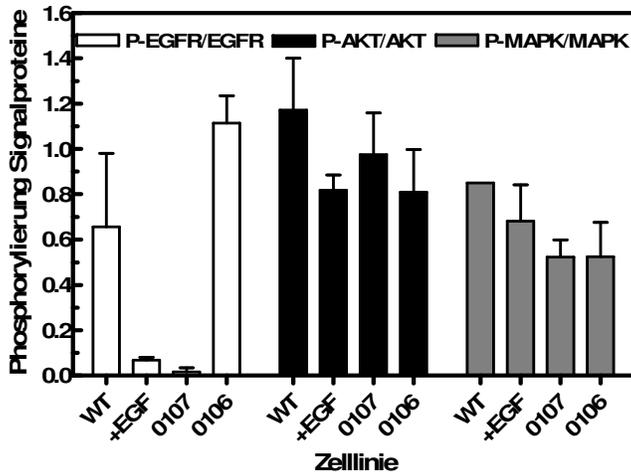
**Abb.11A: Expression und Aktivierung von EGFR und den EGFR-abhängigen Signalproteinen AKT und MAPK**

30 µg Gesamtzelleextrakt wurden von jeder Zelllinie (gewachsen ohne EGF-Zusatz im Medium) eingesetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expression von EGFR, AKT und MAPK (Basallevel) sowie deren Phosphorylierung P-EGFR, P-AKT und P-MAPK wurde mittels Western Blot detektiert. β-Actin wurde als Beladungskontrolle verwendet.



**Abb. 11B: Basallevel von EGFR, AKT und MAPK**

Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus 2 unabhängigen Western Blot Experimenten. Die Proteinsignale wurden um den Hintergrund korrigiert und auf β-Actin normiert.



**Abb. 11C: Aktivierung/Phosphorylierung von EGFR, AKT und MAPK**

Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus 2 unabhängigen Western Blot Experimenten. Es wurden die um den Hintergrund korrigierten phosphorylierten Proteinsignale P-EGFR, P-AKT und P-MAPK durch die korrigierten Proteinsignale im Basallevel dividiert.

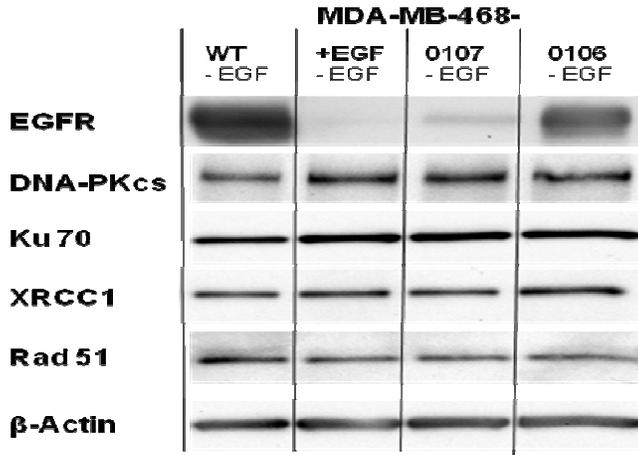
#### 4.5 Expression von DNA-Reparaturproteinen

Die Expression der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs, Ku70, XRCC1 und Rad51 wurde bei den vier MDA-MB-468 Zelllinien mittels Western Blot untersucht. Zusätzlich wurde auf der gleichen Membran die EGFR-Expression nachgewiesen. Die Detektion von  $\beta$ -Actin diente als Kontrolle für gleiche Gelbeladung. Es wurden Gesamtzellextrakte der Zellen (gewachsen ohne EGF-Zusatz im Medium) eingesetzt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot detektiert.

Es sollte untersucht werden, ob das Ausmaß der EGFR-Expression die Expressionsstärke der Reparaturproteine beeinflusst. In Abbildung 12A ist die Expression von EGFR und den DNA-Reparaturproteinen DNA-PKcs, Ku70, XRCC1 und Rad51 in einem exemplarischen Western Blot dargestellt. Abbildung 12B zeigt die aus drei unabhängigen Experimenten ausgewerteten Daten, die um den Hintergrund korrigiert und auf  $\beta$ -Actin normiert sind.

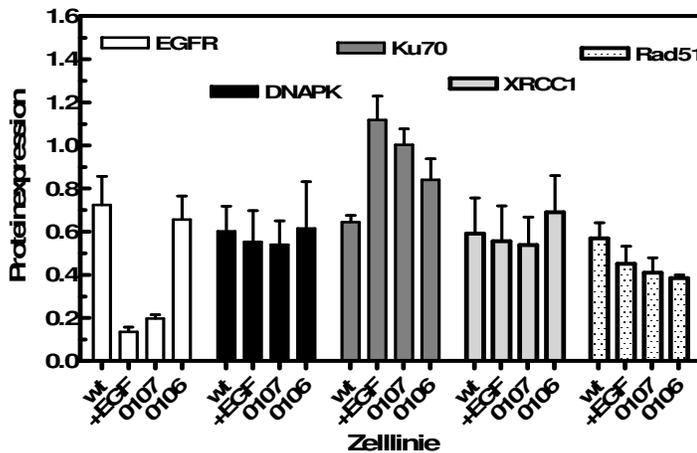
Aus den Abbildungen 12A und B geht hervor, dass trotz der großen Unterschiede in der EGFR-Expression der vier Zelllinien die Expression der untersuchten DNA-Reparaturproteine relativ konstant ausgeprägt ist. Die +EGF und die 0107 Zelllinien weisen eine wie in Abbildung 11B ähnlich reduzierte EGFR-Expression gegenüber der

WT und der 0106 Zelllinien auf. Alle Zelllinien exprimieren annähernd gleich viel DNA-PKcs und XRCC1 und die Rad51-Expression ist unter Berücksichtigung der Standardbedingungen innerhalb der Zelllinien relativ ähnlich. Die Expression von Ku70 scheint bei den Zelllinien +EGF und 0107 (exprimieren wenig EGFR) um Faktor 1,7 und 1,5 erhöht gegenüber der WT Zelllinie.



**Abb.12A: Expression von EGFR und den DNA-Reparaturproteinen DNA-PKcs, Ku70, XRCC1 und Rad51**

Es wurden 20 µg Gesamtzellextrakt von jeder Zelllinie (gewachsen ohne EGF-Zusatz im Medium) eingesetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Western Blot detektiert. β-Actin diente als Beladungskontrolle.



**Abb. 12B: Expression von EGFR und den DNA-Reparaturproteinen DNA-PKcs, Ku70, XRCC1 und Rad51**

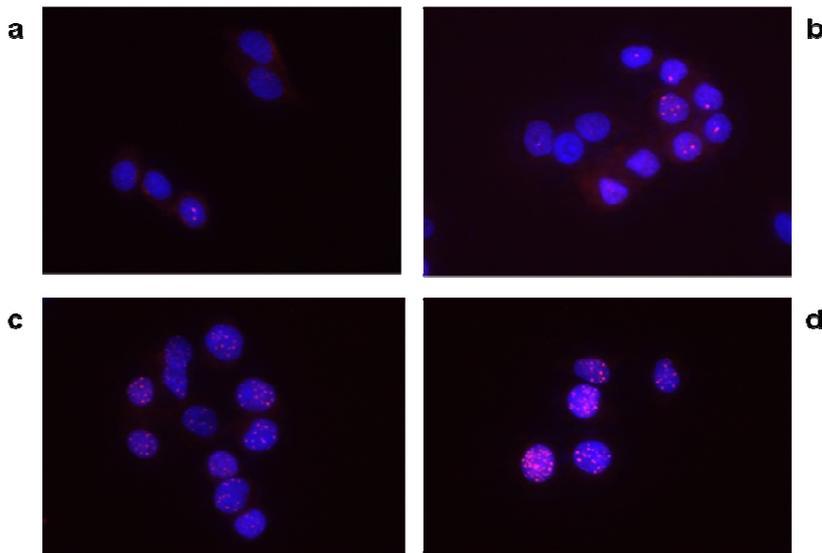
Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Western Blot Experimenten. Die Proteinsignale wurden um den Hintergrund korrigiert und auf β-Actin normiert.

#### 4.6 Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüche

Die Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüche (DSBs) wurde bei den vier Zelllinien mit der  $\gamma$ H2AX Foci Technik nachgewiesen. Dafür wurden die Zellen mit einer Strahlendosis von 0, 2, 4 und 6 Gy bestrahlt und hatten anschließend 24 Stunden Zeit ihre DSBs zu reparieren. Danach wurden die Zellen entsprechend dem methodischen Protokoll präpariert, bevor die kodierte Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci am Fluoreszenzmikroskop erfolgte.

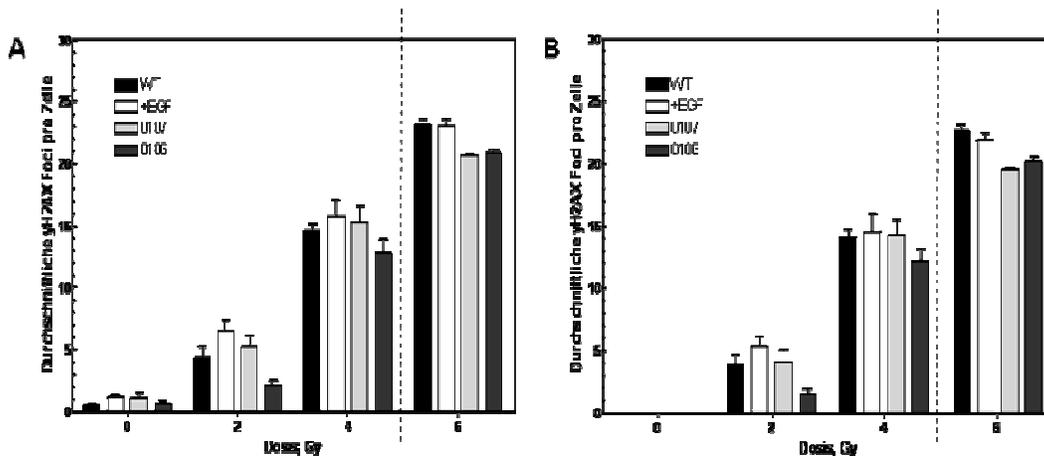
Es sollte untersucht werden, ob sich die Zellen in der Reparatur strahleninduzierter DSBs unterscheiden. Abbildung 13 zeigt immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unbestrahlten WT Zellkernen (a) und von WT Zellkernen nach 24-stündiger Reparaturzeit, die mit 2 Gy b, 4 Gy (c) und 6 Gy (d) bestrahlt wurden. Dabei sind die  $\gamma$ H2AX Foci rosa gefärbt und die DNA mit DAPI blau gegengefärbt. Die Aufnahmen zeigen, dass die Anzahl der  $\gamma$ H2AX Foci mit steigender Strahlendosis zunimmt und dass auch in unbestrahlten Zellen spontan auftretende  $\gamma$ H2AX Foci nachweisbar sind. In Abbildung 14A ist die Anzahl der durchschnittlichen  $\gamma$ H2AX Foci pro Zelle aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen in Abhängigkeit von der Strahlendosis für jede Zelllinie dargestellt. Die Abbildung 14B zeigt die Anzahl der  $\gamma$ H2AX Foci pro Zelle aus Abbildung 13B mit Abzug der spontan auftretenden  $\gamma$ H2AX Foci bei 0 Gy. Die unbestrahlten Zellen zeigen spontan durchschnittlich zwischen 0,5 (WT und 0106) und 1 Focus (+EGF und 0107) pro Zelle. Nach dem Abzug des Hintergrundes zeigen die mit 2 Gy bestrahlten Zellen durchschnittlich 4 Foci pro Zelle, wobei die +EGF Zelllinie mit 5 Foci pro Zelle minimal mehr residuelle DSBs aufweist und die 0106 Zelllinie mit 2 Foci pro Zelle etwas weniger hat. Dieser sich leicht andeutende Trend, dass die +EGF Zelllinie, die wenig EGFR exprimiert auch schlechter repariert als die viel EGFR-exprimierende Zelllinie 0106, wird bei 4 und 6 Gy nicht beobachtet. Die Zellen, die mit einer Dosis von 4 Gy bestrahlt wurden, zeigen nach Hintergrund-Abzug durchschnittlich 14 Foci pro Zelle. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung gibt es hier keine wesentlichen Unterschiede in der Anzahl der  $\gamma$ H2AX Foci zwischen den Zelllinien. Die mit 6 Gy bestrahlten Zellen haben nach Abzug des Hintergrundes durchschnittlich 21 Foci pro Zelle, wobei die WT und +EGF Zelllinien mit 23 und 22 Foci pro Zelle, einige Foci mehr haben als die 0107 und 0106 Zelllinien, die beide im Durchschnitt 20 Foci pro Zelle aufweisen. Die Auswertung der  $\gamma$ H2AX Foci bei 6 Gy

könnte jedoch Ungenauigkeiten enthalten, da bei dieser hohen Foci Anzahl die einzelnen Foci zum Teil nicht optimal voneinander differenziert werden konnten.



**Abb. 13: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von  $\gamma$ H2AX Foci in MDA-MB-468-WT Zellen**

Die Zellen wurden mit 0 (a), 2 (b), 4 (c), 6 (d) Gy bestrahlt und nach 24 Stunden Reparatur fixiert. Anschließend folgte die Färbung von  $\gamma$ H2AX (rosa). Die DNA wurde mit DAPI (blau) gegengefärbt und stellt die Zellkerne dar. Die Aufnahmen wurden bei 100 facherer Vergrößerung am Mikroskop gemacht.



**Abb. 14A und B: Doppelstrangbruchreparatur in Abhängigkeit von der Strahlendosis**

Die Reparatur strahleninduzierter DSBs wurde mittels der  $\gamma$ H2AX Foci Technik nachgewiesen. A stellt Mittelwert und Standardabweichung der  $\gamma$ H2AX Foci aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen dar. Dafür wurden die Zellen mit 0-6 Gy bestrahlt und nach 24-stündiger Reparaturzeit entsprechend dem methodischen Protokoll präpariert, bevor die kodierte Auswertung der  $\gamma$ H2AX Foci am Fluoreszenzmikroskop erfolgte. B stellt den Mittelwert der  $\gamma$ H2AX Foci nach Abzug der spontan auftretende  $\gamma$ H2AX Foci bei 0 Gy dar.

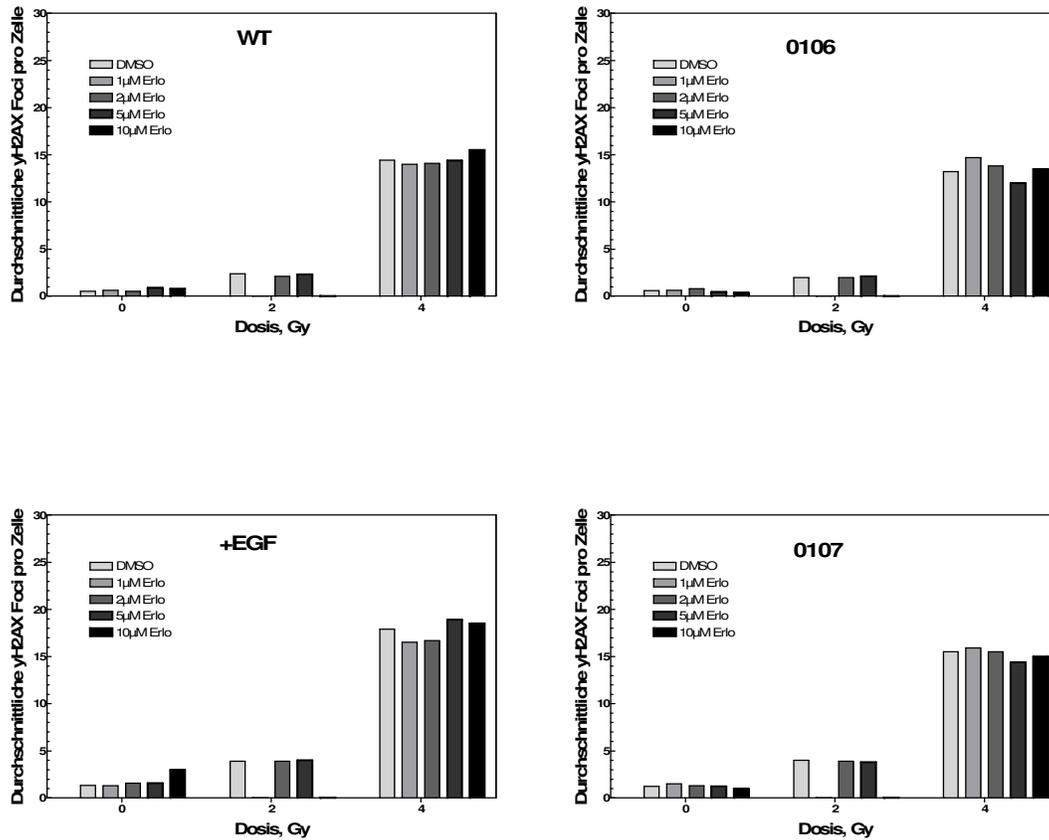
#### **4.7 Reparatur strahleninduzierter DSBs nach Inhibition des EGFR mittels Erlotinib**

Um den Einfluss des EGFR-Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs in den vier MDA-MB-468-Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen 2 Stunden vor Bestrahlung mit verschiedenen Erlotinib Konzentrationen behandelt. Zur Kontrolle wurde stattdessen DMSO zum Medium hinzugefügt. Nach Bestrahlung und 24-stündiger Reparaturzeit (in Anwesenheit des Inhibitors) wurden die Zellen entsprechend dem methodischen Protokoll präpariert und die kodierte Auswertung der  $\gamma$ H2AX Foci wurde am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. In Abbildung 15 ist die Anzahl der durchschnittlichen  $\gamma$ H2AX Foci pro Zelle in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0, 2 und 4 Gy) und der Erlotinib Konzentrationen (1, 2, 5, und 10  $\mu$ M) für jede Zelllinie dargestellt.

Die unbestrahlten Zellen der viel EGFR exprimierenden Zelllinien (WT und 0106) haben ohne Erlotinib-Behandlung spontan durchschnittlich 0,5 und 0,6 Focus pro Zelle. Die unbestrahlten Zellen der wenig EGFR exprimierenden Zelllinien (+EGF und 0107) haben ohne Erlotinib-Behandlung spontan durchschnittlich 1,3 und 1,2 Foci pro Zelle. Damit ist der Trend, dass +EGF und 0107 minimal mehr Foci haben als WT und 0106, vergleichbar mit den Ergebnissen aus Abbildung 14A. Die Erlotinib-Behandlung (in allen getesteten Konzentrationen 1, 2, 5, 10  $\mu$ M) führt spontan in allen vier Zelllinien zu keiner Veränderung des Foci-Basalleveles. Die alleinige Bestrahlung der Zellen mit 2 und 4 Gy weist einen ähnlichen Verlauf wie in Abbildung 14A auf. Durch die Erlotinib-Behandlung mit allen getesteten Konzentrationen (1, 2, 5, und 10  $\mu$ M) wird die Reparaturkapazität strahleninduzierter DSBs in den vier Zelllinien nicht verändert. Dabei zeigen die mit 2 Gy bestrahlten WT und 0106 Zelllinien nach Hintergrund-Abzug durchschnittlich 1,7 und 1,4 und die +EGF und 0107 Zelllinien 2,2 und 2,6 Foci pro Zelle. Somit haben bei 2 Gy die wenig EGFR exprimierenden Zelllinien (+EGF und 0107) ca. 1 Focus mehr als die viel EGFR exprimierenden Zelllinien (WT und 0106). Dieser Trend wird bei 4 Gy und Hintergrund-Abzug nicht mehr beobachtet. Die WT und 0106 Zelllinien haben durchschnittlich 14 und 13 und die +EGF und 0107 Zelllinien 16 und 14 Foci pro Zelle.

Bei allen vier MDA-MB-468-Zelllinien hat der EGFR-Inhibitor Erlotinib keinen Einfluss auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs. Es konnte keine veränderte Anzahl

residueller DSBs nach Erlotinib-Behandlung in allen getesteten Konzentrationen beobachtet werden.



**Abb. 15: Reparatur strahleninduzierter DSBs nach EGFR-Inhibition mittels Erlotinib**

Die Reparatur strahleninduzierter DSBs wurde mittels der  $\gamma$ H2AX Foci Technik mit und ohne Erlotinib-Behandlung nachgewiesen. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der  $\gamma$ H2AX Foci aus einem Versuch. Dafür wurden die Zellen mit 1, 2, 5, 10  $\mu$ M Erlotinib bzw. DMSO für 2 Stunden vorinkubiert und mit 0, 2 und 4 Gy bestrahlt. Nach 24-stündiger Reparaturzeit wurden die Zellen entsprechend dem methodischen Protokoll präpariert und es folgte die kodierte Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci am Fluoreszenzmikroskop.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Variationen der EGFR-Genamplifikation

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. B. Brandt (Tumorbiologie, UKE) konnte beobachten, dass eine lang andauernde (> zwei Jahre) Kultivierung in hitzeinaktiviertem Medium mit definierter Zugabe von 5 nM EGF bei jeder Passage zu einer Reduktion der ursprünglich sehr hohen EGFR-Genamplifikation (~30-fach) bei der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-468-WT (WT) führte. Entzog man dieser EGFR-supprimierten MDA-MB-468-+EGF-Zelllinie (+EGF) (~2-3-fache EGFR-Genamplifikation) nun wieder EGF aus dem Medium, wurde eine erneute Zunahme der EGFR-Genamplifikation beobachtet. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt des EGF-Entzugs entstanden zuerst die MDA-MB-468-0106-Zelllinie (0106) (~13,5-fache EGFR-Genamplifikation) und dann die MDA-MB-468-0107-Zelllinie (0107) (~2,5-3,5-fache EGFR-Genamplifikation). Der dafür zugrunde liegende Entstehungsmechanismus ist noch nicht genau geklärt und Thema intensiver Untersuchungen (Theorie der „fragile sites“).

Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in der Literatur beschrieben, die zeigen, dass einige EGFR-überexprimierende Zelllinien durch EGF in ihrer Proliferation gehemmt werden und dass Zellkolonien, die nach langfristiger EGF-Zugabe resistent gegenüber EGF-induzierter Wachstumshemmung sind, einen Verlust des amplifizierten EGFR-Gens aufweisen (Hirai et al., 1988). Studien mit EGFR-überexprimierenden Zelllinien wie der epidermalen A431-Zelllinie (Gill et al., 1985), der Plattenepithelzelllinie NA (Hirai et al., 1988) und der in meiner Arbeit untersuchten MDA-MB-468-Zelllinie (Filmus et al., 1987) konnten ebenfalls eine EGF-vermittelte Abnahme der EGFR-Expression durch den Verlust des amplifizierten EGFR-Gens beobachten.

Die Variationen in der EGFR-Genamplifikation bei den in meiner Arbeit untersuchten vier MDA-MB-468-Zelllinien führten, wie erwartet zu Unterschieden in der EGFR-Proteinexpression. So wurde bei den WT und 0106-Zelllinien, die eine hohe EGFR-Genamplifikation haben, eine 7,5-fache und 7,0-fache EGFR-Proteinexpression mittels Western Blot nachgewiesen. Die Zelllinien +EGF und 0107, mit der niedrigen EGFR-Genamplifikation, zeigten dagegen eine 1,2-fache und 1,7-fache EGFR-Proteinexpression im Western Blot.

## 5.2 Einfluss der EGFR-Expressionsmenge

### 5.2.1 Zellproliferation

Die Funktion des EGFR ist die Vermittlung von Wachstumssignalen (Nyati et al., 2006), daher wurde mittels einer Wachstumskurve für jede Zelllinie untersucht, ob die EGFR-Expressionsmenge Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen hat. Da die +EGF Zelllinie als einzige standardmäßig in EGF-haltigem Medium (5 nM) kultiviert wird, wurde das Wachstumsverhalten der vier Zelllinien zum einen nur in hitzeinaktiviertem Medium (Standardkultivationsbedingung von drei Zelllinien) und zum anderen in hitzeinaktiviertem Medium mit EGF-Zugabe (5 nM) bestimmt.

Die Ergebnisse aus 4.2 zeigen, dass alle vier Zelllinien in hitzeinaktiviertem Medium (ohne EGF) ein ähnliches Wachstumsverhalten aufweisen. Die Zellzahl stieg bei allen Zelllinien mit der Zeit an, wobei die 0107 und 0106 Zelllinien am schnellsten gewachsen sind, gefolgt von der +EGF und der WT Zelllinie. Diese Ergebnisse zeigen, dass die EGFR-Expressionsmenge in diesen Zellen keinen größeren Einfluss auf die Proliferation nimmt. Ein möglicher Grund dafür könnte das hitzeinaktivierte Medium sein, in dem wenig aktive Liganden vorhanden sind, wodurch in den viel EGFR-exprimierenden Zelllinien (WT und 0106) nicht alle EGFR-Bindungsstellen besetzt und alle Rezeptoren aktiviert werden konnten, so dass sich kein EGFR-abhängiger Effekt zeigen konnte. Der Einsatz von FKS-Medium ohne Hitzeinaktivierung hätte möglicherweise zu Unterschieden im Wachstumsverhalten geführt.

Der Effekt von EGF, dem natürlichen Liganden des EGFR, auf die Proliferation der Zelllinien war zunächst überraschend. Normalerweise hat EGF eine proliferationsfördernde Wirkung (Schlessinger et al., 1983). Die Zugabe von 5 nM EGF zeigte jedoch bei den wenig EGFR-exprimierenden Zelllinien (+EGF und 0107) kein verändertes Wachstumsverhalten. Die Wachstumskurven waren mit und ohne EGF Inkubation nahezu identisch. Bei den viel EGFR-exprimierenden Zelllinien (WT und 0106) führte die EGF Zugabe sogar zu einem deutlichen antiproliferativen Effekt. Dieses Resultat könnte darauf zurückzuführen sein, dass EGFR überexprimierende Zellen bereits maximal aktiviert sind und keine weiteren Stimulationen benötigen. Die Zugabe von EGF könnte somit zu Überreaktionen und Fehlregulationen der EGFR-Signalwege führen, die sich dann antiproliferativ oder apoptotisch auswirken. Während meiner Arbeit konnte ich beobachten, dass die EGF-Zugabe bei den EGFR-

überexprimierenden Zelllinien (WT und 0106) nicht zu einem vermehrten Abschwimmen der Zellen geführt hat, was ein Hinweis auf Apoptose gewesen wäre, sondern zu einer Proliferationshemmung mit ruhenden Zellen (möglicherweise Zellzyklus-Arrest) führte. In weiterführenden Experimenten könnte mit spezifischen Markern getestet werden, ob es unter EGF-Bedingungen bei den WT und 0106 Zelllinien zu einem Zellzyklus-Arrest kommt.

Ähnliche Ergebnisse, die zeigen, dass EGFR-überexprimierende Tumorzelllinien häufig mit einer Proliferationshemmung nach EGF-Stimulation reagieren, wurden auch für die epidermale Zelllinie A431 (Gill et al., 1985; Grudinkin et al., 2003), die Plattenepithelzelllinie PC-10 (Gardner ad Shimizu, 1994), die Glioblastomzelllinie T-CAR1 (Helseth et al., 1989) und die Plattenepithelzelllinie NA (Hirai et al., 1988) beschrieben. Der antiproliferative Effekt von EGF bei der MDA-MB-468-WT Zelllinie wurde bereits von Filmus et al. (1987) beobachtet. Der Mechanismus der Wachstumshemmung ist jedoch unklar.

Aufgrund des antiproliferativen Effektes von EGF bei der WT und 0106 Zelllinie und der Tatsache, dass die +EGF Zelllinie ihr Wachstumsverhalten durch den EGF Entzug aus dem Medium nicht ändert, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit alle Versuche ohne EGF Zugabe im Medium durchgeführt, um Proliferationseffekte zu vermeiden. Die folgenden Ergebnisse geben somit den Einfluss des Basallevels der MDA-MB-468-Zelllinien an und sind Liganden-unabhängig.

### **5.2.2 Expression und Aktivierung von EGFR und EGFR-abhängiger Signalproteine**

Die vier MDA-MB-468-Zelllinien unterscheiden sich stark in ihrer EGFR-Proteinexpression, so dass mit diesem isogenetischen Zellsystem optimal der Einfluss unterschiedlicher EGFR-Proteinlevel untersucht werden kann. Zunächst sollte geklärt werden, ob EGFR-überexprimierende Tumorzelllinien (WT und 0106) ein stärkeres EGFR-Signaling (AKT und MAPK) haben als Tumorzelllinien, die wenig EGFR exprimieren (+EGF und 0107). Ein stärkeres EGFR-Signaling könnte ein Grund dafür sein, warum bei EGFR-überexprimierenden Tumorzellen sehr häufig eine Strahlenresistenz beobachtet wird (Rodemann et al., 2007).

Dazu sollte mittels Western Blot überprüft werden, ob sich der Unterschied in der EGFR-Expression der vier Zelllinien zum einen auf den Aktivierungszustand des EGFR und zum anderen auf die Expression und Aktivierung der zwei nachgeschalteten Signalproteine AKT und MAPK auswirkt.

Die Ergebnisse aus 4.4 zeigen, dass sich der starke Unterschied in der EGFR-Expression der Zelllinien auch in der Aktivierung des EGFR (P-EGFR) widerspiegelt. Dafür wurde der Antikörper PY20 eingesetzt, der an alle phosphorylierten Tyrosinkinasen bindet. Die WT und 0106 Zelllinien, die eine deutlich erhöhte EGFR-Expression haben, zeigen auch eine deutlich höhere Phosphorylierung des Rezeptors als die +EGF und 0107 Zelllinien. Die Aktivierung des Rezeptors bei den Zelllinien mit einem hohen EGFR-Level ist um den Faktor 22,5 höher als bei denen mit niedrigem EGFR-Level. Da die Zellen in hitzeinaktiviertem Medium kultiviert wurden, geben die Ergebnisse den basalen Aktivierungszustand des EGFR für jede Zelllinie an. Die starke Phosphorylierung des EGFR bei den WT und 0106 Zelllinien ist wahrscheinlich zu einem großen Teil Liganden-unabhängig und spontan durch die räumliche Nähe der Rezeptoren hervorgerufen worden. Bei einer hohen Dichte an Rezeptoren besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für spontane Dimerisierung. Ob es dadurch auch zu einer effektiven Aktivierung der nachfolgenden Signalweiterleitung kommt, ist unklar.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass sich der starke Unterschied in der EGFR-Expression zwischen den vier Zelllinien nicht direkt in der Expression der Signalproteine AKT und MAPK fortsetzt, da diese bei den vier Zelllinien nahezu identisch sind. Eigentlich wären entsprechende Unterschiede zu erwarten gewesen. Dieses Resultat könnte darauf hindeuten, dass die basale Expression von AKT und MAPK unabhängig von EGFR reguliert wird oder dass es zu einer Hochregulation dieser Signalproteine in den wenig EGFR-exprimierenden Zelllinien gekommen ist, um das EGFR-Defizit funktionell auszugleichen.

Darüberhinaus wird aus den Ergebnissen deutlich, dass die starken Unterschiede in der EGFR-Phosphorylierung nicht zu entsprechenden Unterschieden in der Phosphorylierung der nachgeschalteten Signalproteine AKT und MAPK führen. Es wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass die WT und 0106 Zelllinien, die eine stärkere Aktivierung des EGFR haben, durch eine verstärkte Signalweiterleitung auch eine erhöhte Aktivierung von AKT und MAPK aufweisen, als die +EGF und 0107 Zelllinien. Möglicherweise ist die Expression und Aktivierung von AKT und MAPK in

allen vier Zelllinien deshalb gleich, weil die drei Subklone (+EGF, 0106, 0107) aus der WT Zelllinie entstanden sind. Die Kultivationsbedingungen unter denen die Subklone hervorgegangen sind, haben sich eventuell nur auf den EGFR ausgewirkt und nicht auf die nachgeschalteten Signalproteine. Da die WT Zelllinie EGFR überexprimiert, ist die Expression und Phosphorylierung von AKT und MAPK möglicherweise sowohl beim WT als auch bei den drei Subklonen maximal und kann nicht weiter gesteigert werden. Damit haben die vier Zelllinien trotz unterschiedlicher EGFR-Expression ein identisches Signaling und zeigen damit auch ähnliches Zellverhalten (siehe Zellproliferation (5.2.1)).

Als Ausblick für nachfolgende Arbeiten könnte man die Expression und Aktivierung von AKT und MAPK in normalem, also nicht hitzeinaktiviertem FKS-Medium oder nach kurzer EGF-Stimulation untersuchen. Damit könnte getestet werden, ob dann Unterschiede in der Aktivierung von AKT und MAPK zu verzeichnen sind, die sich dann in unterschiedlichem Zellverhalten widerspiegeln würden.

### **5.2.3 Expression wichtiger DNA-Reparaturproteine**

Ausgehend von den Ergebnisse von Um et al. (2004), die zeigen, dass einige humane Tumorzelllinien (malignes Melanom, Prostatakrebs, Kolorektalkrebs) mit starker EGFR-Expression ebenfalls erhöhte Expression von DNA-PKcs und Ku80 zeigen und umgekehrt, wurde untersucht, ob bei den MDA-MB-468 Brustkrebszelllinien ein Zusammenhang zwischen der Expression von EGFR und den DNA-Reparaturproteinen DNA-PKcs, Ku70, XRCC1 und Rad51 besteht. Theoretisch gibt es zwei Möglichkeiten wie der EGFR die Expression der oben genannten Proteine modulieren kann. Zum einen über das EGFR-Signaling, welches eine Kaskade an Signalen vom Zytoplasma bis zum Nukleus weiterleitet und letztendlich die Transkription von bestimmten Zielgenen auslöst (Nyati et al., 2006). Zum anderen wurde beschrieben, dass der EGFR als Transkriptionsfaktor die Expression von Proteinen beeinflussen kann (Lin et al., 2001). Daher könnte es theoretisch möglich sein, dass der EGFR als Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Expression der oben genannten DNA-Reparaturproteine nehmen kann. Obwohl es sich bereits andeutet, dass die vier MDA-MB-468 Zelllinien keine Unterschiede im EGFR-Signaling haben (siehe 5.2.2), könnte man vermuten, dass

Zellen, die viel EGFR exprimieren (WT und 0106) auch vermehrt EGFR internalisieren und im Zellkern haben (wo der Rezeptor theoretisch als Transkriptionsfaktor fungieren kann), als Zellen, die wenig EGFR exprimieren (+EGF und 0107). Deshalb wurde nun mittels Western Blot die Expression der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs, Ku70, XRCC1 und Rad51 bei den vier Zelllinien bestimmt. Die hier mittels Western Blot untersuchten Proteine sind Vertreter von Reparaturproteinen wichtiger DNA-Reparaturwege. DNA-PKcs und Ku70 sind Hauptproteine des NHEJ, Rad51 ist bedeutend für die HR und XRCC1 spielt eine wichtige Rolle bei der BER. Außerdem soll XRCC1 ein Co-Faktor von DNA-PKcs sein (Lévy et al., 2006).

Die Ergebnisse aus 4.5 zeigen, dass trotz Unterschieden in der EGFR-Expression alle Zelllinien annähernd gleich viel DNA-PKcs und XRCC1 exprimieren und dass die Rad51-Expression unter Berücksichtigung der Standardbedingungen innerhalb der Zelllinien auch ähnlich ist. Die Expression von Ku70 scheint bei den Zelllinien +EGF und 0107 (exprimieren wenig EGFR) um Faktor 1,7 und 1,5 erhöht gegenüber der WT Zelllinie. Daraus lässt sich schließen, dass die EGFR-Expressionsmenge im MDA-MB-468 Zellsystem keinen Einfluss auf die Expression der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs, XRCC1 und Rad51 hat und dass möglicherweise ein umgekehrter Zusammenhang zwischen EGFR-Level und Ku70-Expression bestehen könnte. Der Mechanismus sowie die Bedeutung für letzteres sind noch unklar und müssen genauer untersucht werden.

Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen von Um et al. (2004), die zeigen, dass Krebszelllinien (malignes Melanom, Prostatakrebs, Kolorektalkrebs), die viel EGFR exprimieren auch eine höhere Expression von DNA-PKcs aufweisen, als die wenig EGFR-exprimierenden Sublinien. Unter Umständen ist dieser Zusammenhang abhängig vom Zelltyp und kann nicht auf die MDA-MB-468 Brustkrebszelllinien übertragen werden.

Ein möglicher Grund dafür, warum die vier MDA-MB-468 Zelllinien trotz unterschiedlicher EGFR-Expression keine Unterschiede in der Expression der untersuchten DNA-Reparaturproteine zeigen, könnte die identische EGFR-vermittelte Signaltransduktion sein (die Expression und Aktivierung von AKT und MAPK ist in allen Zelllinien gleich). Daher konnte der Einfluss eines unterschiedlichen EGFR-Signaling auf die Transkription der DNA-Reparaturproteine mit diesem Zellsystem nicht genauer untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit, wie EGFR die Reparaturproteine in ihrer Expression modulieren könnte, ist als Transkriptionsfaktor bzw. Co-Faktor für Transkriptionsfaktoren wie es z.B. für Cyclin D1, iNOS und B-Myb beschrieben ist (Lin et al., 2001; Lo et al., 2005; Hanada et al., 2006). Ob die Expression von DNA-Reparaturproteinen auf diese Art beeinflusst werden könnte, ist unklar. Die eigenen Daten sprechen jedenfalls dagegen, da alle vier MDA-MB-468 Zelllinien eine identische Expression von DNA-PKcs, XRCC1 und Rad51 haben. Wenn EGFR jedoch als Transkriptionsfaktor die Expression der Reparaturproteine modulieren könnte, sprechen meine Ergebnisse dafür, dass das Ausmaß der Internalisierung bzw. intrazellulären Verteilung des EGFR nicht unbedingt von der EGFR-Gesamtmenge abhängig ist. Also haben wahrscheinlich die EGFR-überexprimierenden Zelllinien (WT und 0106) nicht viel mehr EGFR im Zellkern, als die wenig EGFR-exprimierenden Zelllinien (+EGF und 0107). Diese Hypothese könnte als Ausblick in weiterführenden Experimenten durch fraktionierte (Membran/Zytoplasma/Kern) Extrakte überprüft werden und ist bereits in Planung.

Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass der EGFR Transport in den Zellkern Liganden-abhängig beschrieben wird (Lin et al., 2001). Da die Experimente mit den vier MDA-MB-468 Zelllinien jedoch in hitzeinaktiviertem Medium durchgeführt wurden, konnte eventuell keine Kerntranslokation des EGFR erfolgen.

Möglicherweise ist der EGFR kein Transkriptionsfaktor für die Expression der untersuchten DNA-Reparaturproteine. Die Zunahme der Ku70-Expression in den wenig EGFR-exprimierenden Zelllinien +EGF und 0107 könnte auf Kompensationsvorgänge zurückzuführen sein. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist unklar und muss näher untersucht werden. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu den Daten von Um et al. (2004), die zeigen, dass in Ku-überexprimierenden Zellen die EGFR-Expression erhöht und bei Zellen mit Ku- und DNA-PKcs-Mangel erniedrigt ist.

#### **5.2.4 Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) durch den EGFR beeinflusst wird (Toulany et al., 2006). Dafür sprechen auch die noch unveröffentlichten Daten der eigenen Arbeitsgruppe, die

belegen, dass EGF die Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) stimuliert und dass eine EGFR-Inhibition zu einem Anstieg der residuellen DSBs führt. Chen und Nirodi (2007) beschreiben nach strahleninduzierter EGFR-Aktivierung drei theoretische Mechanismen, die eine Strahlenresistenz von EGFR-überexprimierenden Tumoren hervorrufen könnten. Dabei sollen neben der Internalisierung des EGFR in den Zellkern und einer Aktivierung zentraler DNA-Reparaturproteine (vor allem der DNA-PKcs) (Dittmann et al., 2005a), hauptsächlich zwei EGFR-abhängige Signalwege, der PI3K-AKT- und der Ras-MAPK-Signalweg, verantwortlich für die Strahlenresistenz von Tumorzellen sein (Schmidt-Ullrich et al. 1997, Xing and Orsulic 2005, Kim et al. 2006, Tokunaga et al. 2006).

Obwohl meine Ergebnisse bereits gezeigt haben, dass sich MDA-MB-468 Zellen weder in ihrer basalen Expression und Aktivierung von AKT und MAPK (siehe 5.2.2), noch in der basalen Expression von DNA-Reparaturproteinen (siehe 5.2.3) unterscheiden, könnte es nach Bestrahlung Unterschiede in der EGFR-Kerntranslokation geben (Dittmann et al., 2005a), die sich über eine entsprechende Aktivierung der DNA-PK in unterschiedlicher Reparatur strahleninduzierten DNA-DSBs zeigen könnte. Daher wurde mittels der  $\gamma$ H2AX Foci Technik untersucht, ob sich die EGFR-Expressionsmenge innerhalb der vier Zelllinien auf die DSB-Reparatur nach Bestrahlung auswirkt. Damit sollte überprüft werden, ob der EGFR im MDA-MB-468 Zellsystem durch ionisierende Strahlen aktiviert und vermehrt in den Zellkern transloziert wird.

Die Ergebnisse aus 4.6 zeigen, dass sich die vier MDA-MB-468 Zelllinien nicht auffällig in der Reparatur strahleninduzierter DSBs unterscheiden. Es deutet sich bei den unbestrahlten Zelllinien mit dem niedrigen EGFR-Level (+EGF und 0107) an, dass sie spontan minimal mehr Foci haben, als die Zelllinie mit dem hohen EGFR-Level (WT und 0106). Nach Abzug des Hintergrundes und unter Berücksichtigung der Standardabweichungen haben die Zelllinien annähernd gleich viele residuelle DSBs nach einer Bestrahlung mit 2, 4 und 6 Gy. Daraus lässt sich schließen, dass die EGFR-Expressionsmenge in diesem MDA-MB-468 Zellsystem keinen Einfluss auf die Reparaturkapazität nach Bestrahlung nimmt.

Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Literaturdaten, die einen Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression in Tumorzellen und der Radioresistenz zeigen (Akimoto et al., 1999; Liang et al., 2003; Miyaguchi et al., 1998; Sheridan et al.,

1997; Wollman et al., 1994). Obwohl meine Experimente nicht die Radioresistenz, sondern die Reparaturkapazität nach Bestrahlung und EGFR-Hemmung überprüfen, kann ein Bezug zu den oben genannten Literaturdaten hergestellt werden, da gezeigt werden konnte, dass die residuellen DSBs mit der Überlebensfraktion (SF) nach Bestrahlung korrelieren (Dikomey et al., 1998, 2000, Kasten-Pisula et al., 2005). Die *in vivo* Studie von Akimoto et al. (1999) zeigte, dass nach Bestrahlung EGFR-überexprimierende murine Karzinome einen höheren TCD50 Wert hatten, als die Tumore mit einem niedrigen EGFR-Level. Bei der *in vitro* Studie von Liang et al. (2003) führte die Transfektion eines humanen EGFR-Vektors in eine wenig EGFR-exprimierende Mauskarzinom-Zelllinie zu einer EGFR-Level-abhängigen Zunahme der Strahlenresistenz.

Wenn hauptsächlich die zwei EGFR-abhängigen Signalwege AKT (über eine Hemmung der Apoptose) (Toulany et al., 2005b) und MAPK (über schnelle Zellproliferation und Tumorrepopulierung) (Schmidt-Ullrich et al. 1997) verantwortlich für die Strahlenresistenz von Tumorzellen sind, können meine Ergebnisse erklären, warum die MDA-MB-468 Zelllinien keine Unterschiede zeigen. Denn alle vier Zelllinien haben, wie bereits beschrieben, eine identische Expression und Aktivierung von AKT und MAPK.

Obwohl in der Literatur diskutiert wird, dass EGFR und seine nachgeschalteten Signalwege zusätzlich durch ionisierende Strahlen Liganden-unabhängig aktiviert werden können (Dent et al. 2003; Yacoub et al. 2006), scheint das für das MDA-MB-468 Zellsystem nicht zuzutreffen. Denn es wäre zu erwarten gewesen, dass sich die erhöhte Menge an EGFR in den WT und 0106 Zelllinien durch die strahleninduzierte Aktivierung des Rezeptors in einer besseren zellulären DSB-Reparatur widerspiegelt. Dies ist jedoch nicht der Fall, was vermuten lässt, dass AKT und MAPK bereits in allen vier Zelllinien maximal aktiviert sind. Dadurch gäbe es keine Unterschiede in der Signalweiterleitung auch wenn der EGFR durch ionisierende Strahlen aktiviert werden würde. Es ist bereits geplant mittels Western Blot zu überprüfen, ob der EGFR bei den vier MDA-MB-468 Zelllinien durch ionisierende Strahlen aktiviert werden kann. Zusätzlich könnten fraktionierte (Membran/Zytoplasma/Kern) Extrakte eine Auskunft über die Translokation des EGFR nach Bestrahlung geben.

Dittmann et al. (2005a, 2005b) postulieren, dass Tumorzellen eine Strahlenresistenz ausbilden können, da nach Bestrahlung die Translokation des EGFR in den Zellkern

erfolgt, wo über eine Interaktion mit der DNA-PK die strahleninduzierten DNA-DSBs über das NHEJ verstärkt repariert werden. Diese Annahme scheinen meine Ergebnisse mit den MDA-MB-468 Zelllinien nicht zu unterstützen. Denn es wäre zu erwarten gewesen, dass die WT und 0106 Zelllinien eine höhere DNA-PK-Aktivität und damit eine bessere Reparatur strahleninduzierten DNA-DSBs aufweisen, als die +EGF und 0107 Zelllinien. Das war jedoch nicht der Fall, so dass auch die Beobachtungen von Um et al. (2004), die zeigen, dass Tumoren mit hohem EGFR-Level eine höhere DNA-PK-Aktivität haben, als Tumoren mit niedrigem EGFR-Level, bei dem MDA-MB-468 Zellsystem unwahrscheinlich erscheinen.

Meine Ergebnisse zeigen, dass alle vier MDA-MB-468 Zelllinien annähernd die gleiche Menge von den untersuchten DNA-Reparaturproteinen exprimieren, so dass es auch in sich schlüssig ist, dass keine Unterschiede bei den residuellen DSBs nachweisbar waren. Die Expression von DNA-PKcs, die ein Hauptprotein des NHEJ ist, unterscheidet sich kaum innerhalb der vier Zelllinien. Die Expression von Ku70, das ebenfalls ein Protein des NHEJ ist, scheint zwar bei den Zelllinien +EGF und 0107 etwas höher gegenüber der WT und 0106 Zelllinie, doch die Bedeutung dieser Beobachtung ist unklar und zeigt in den durchgeführten Versuchen keine Konsequenz. Die Expression von Rad51, das ein zentrales Protein der HR ist, und die Expression von XRCC1, das eine wichtige Rolle bei der BER einnimmt, sind innerhalb der vier Zelllinien nahezu identisch.

Darüberhinaus beobachtet Akimoto et al. (1999), dass die Korrelation zwischen EGFR-Überexpression und Strahlenresistenz eine hohe Signifikanz bei Tumoren mit wildtyp p53 zeigt, die MDA-MB-468 Zelllinien haben jedoch ein mutiertes p53 (Shi et al., 2000), wodurch eventuell das EGFR-Signaling und die EGFR-Translokation verändert wird.

### **5.2.5 Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche nach EGFR-Hemmung mittels Erlotinib**

Auch wenn die Reparaturkapazität der vier MDA-MB-468 Zelllinien identisch ist (siehe 5.2.4), sollte zusätzlich mittels der  $\gamma$ H2AX Foci Technik untersucht werden, ob die EGFR-Menge Einfluss auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs nach EGFR-

Inhibition hat. Da sich eine EGFR-Hemmung theoretisch auf die DSB-Reparatur auswirken könnte. Es wurde Erlotinib in unterschiedlichen Konzentrationen (1 ,2 ,5 ,10  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Erlotinib ist ein "*small molecule*" EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor, der intrazellulär an die ATP-Bindungsdomäne des Rezeptors bindet und dadurch dessen Aktivierung unterbindet. Dieser Tyrosinkinase-Inhibitor hat in noch unveröffentlichten Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe eine strahlensensitivierende Wirkung auf die Bronchialkarzinomzelllinie A549 gezeigt. Für das MDA-MB-468 Zellsystem wurde angenommen, dass Erlotinib einen stärkeren Effekt auf die Zelllinien mit einer hohen EGFR-Expression (WT und 0106) hat, da diese mehr potentielle Bindungsstellen haben, als die Zelllinien mit der niedrigen EGFR-Expression (+EGF und 0107). So wurde theoretisch erwartet, dass WT und 0106 24 Stunden nach Bestrahlung mehr residuelle DSBs zeigen, als +EGF und 0107.

Aus den Ergebnissen von 4.7 geht hervor, dass bei allen vier MDA-MB-468-Zelllinien Erlotinib in den getesteten Konzentrationen (1 ,2 ,5 ,10  $\mu\text{M}$ ) zu keinen Unterschieden in den residuellen DSBs 24 Stunden nach Bestrahlung geführt hat. So dass die Ergebnisse dafür sprechen, dass die EGFR-Inhibition mittels Erlotinib die DSB-Reparaturkapazität im MDA-MB-468 Zellsystem nicht beeinflusst und dass diese auch nicht abhängig von der EGFR-Menge ist.

Die Beobachtungen mit den MDA-MB-468 Zelllinien stehen im Gegensatz zu den Literaturangaben, dass das Ausmaß der EGFR-Expression in Tumorzellen positiv mit der Radiosensitivierbarkeit nach EGFR-Hemmung korreliert (Balaban et al., 1996; Bianco et al., 2000; Bonner et al, 2004; Huang and Harari 2000, 2002; Milas et al., 2000; Liang et al., 2003). Obwohl nicht die Radiosensitivierbarkeit untersucht wurde, können die oben genannten Literaturangaben zum Vergleich herangezogen werden, da die residuellen DSBs mit der Überlebensfraktion nach Bestrahlung korrelieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die EGFR-Menge in dem MDA-MB-468 Zellsystem unbedeutend für DSB-Reparatur ist. Da der EGFR in diesem Zellsystem anscheinend keinen Einfluss auf die Reparatur strahleninduzierter DSBs hat, können die MDA-MB-468 Zellen auch nicht durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib sensitiviert werden. Toulany et al. (2006) konnten zeigen, dass die Reparatur strahleninduzierter DSBs durch eine EGFR-Hemmung beeinflusst wird und in einer Abnahme der DSB-Reparaturkapazität mündet. Dieser Effekt konnte jedoch nur in K-Ras mutierten Zellen beobachtet werden, was mit einer autokrinen EGFR-Ligandenproduktion und ständiger

EGFR-Aktivierung erklärt wird, die dann durch eine EGFR-Inhibition verringert werden kann. Die MDA-MB-468 Zellen sind jedoch laut Literatur K-Ras wildtyp (Shi et al., 2000) und können daher eventuell nicht sensitiviert werden.

### **5.3 Fazit**

Die Untersuchungen mit den vier MDA-MB-468 Zelllinien konnten zeigen, dass Variationen in der EGFR-Genamplifikation zu Unterschieden in der EGFR-Proteinexpression führen. Die Zelllinien mit einer hohen EGFR-Genamplifikation (WT und 0106) hatten eine höhere EGFR-Proteinexpression, als die Zelllinien mit einer niedrigen EGFR-Genamplifikation (+EGF und 0107). Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass sich der starke Unterschied in der EGFR-Expression der Zelllinien auch in der Aktivierung des EGFR (P-EGFR) widerspiegelt. Der starke Unterschied in der EGFR-Expression zwischen den vier Zelllinien setzt sich jedoch nicht direkt in der Expression und Aktivierung der Signalproteine AKT und MAPK fort, da diese bei den vier Zelllinien nahezu identisch sind. Es gibt ebenfalls kaum Unterschiede in der Expression der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs, Ku70, XRCC1 und Rad51. Das identische EGFR-Signaling und die identische Expression der DNA-Reparaturproteine der Zellen passen zu dem Wachstumsverhalten und der DSB-Reparaturkapazität mit und ohne Erlotinib, die ebenfalls keine Unterschiede innerhalb der MDA-MB-468 Zelllinien zeigen.

Für dieses Zellsystem bedeuten die Ergebnisse, dass die EGFR-Menge weder mit der Expression von EGFR-Signalproteinen und DNA-Reparaturproteinen noch mit der DSB-Reparaturkapazität und EGFR-Hembarkeit assoziiert ist.

Neue, noch unveröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass die EGFR-Expression positiv mit der zellulären Radiosensitivität (SF) und der TCD50 (Tumor control dose 50%) korreliert. Diese Korrelation wird aber nur in Tumoren gesehen, die eine moderate EGFR-Expression haben. Bei Tumoren mit einer extremen EGFR-Überexpression wie bei der Ursprungszelllinie des hier untersuchten isogenetischen Zellsystems MDA-MB-468-WT werden keine Korrelationen mit der SF und TCD50 beobachtet. Möglicherweise sind bei einer extremen EGFR-Genamplifikation und -Expression die Zellen fehlreguliert, so dass die DSB-Reparatur

und das Zellüberleben nach Bestrahlung nicht beeinflusst werden können. Diese Fehlregulationen haben sich unter Umständen von der WT Zelllinie auch auf die davon abgeleiteten Subklone +EGF, 0106 und 0107 übertragen.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die MDA-MB-468-WT Brustkrebszelllinie sowie drei davon abgeleitete Subklone eingesetzt, die sich durch lang andauernde Modulation der Kultivationsbedingungen deutlich in ihrer EGFR-Genexpression und dadurch auch in der EGFR-Proteinexpression unterscheiden. Mit diesem isogenetischen Zellsystem wurde der Einfluss unterschiedlicher EGFR-Proteinlevel auf die Expression und Aktivierung von EGFR und EGFR-abhängiger Signalproteine (AKT, MAPK), sowie der Expression von wichtigen DNA-Reparaturproteinen (DNA-PKcs, Ku70, Rad51, XRCC1) als auch der Doppelstrangbruch-Reparaturkapazität mit und ohne EGFR-Inhibition (Erlotinib) untersucht.

Für die vier MDA-MB-468 Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass die stark unterschiedlichen EGFR-Expressionslevel zu einer verstärkten Aktivierung des EGFR, nicht aber zu einer gesteigerten Expression und Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalproteine AKT und MAPK führen. Es konnten ebenfalls keine deutlichen Unterschiede in der Expression der DNA-Reparaturproteine DNA-PKcs, Ku70, Rad51 und XRCC1 nachgewiesen werden, und ebenfalls kein Unterschied in der DSB-Reparaturkapazität mit und ohne EGFR-Inhibition (Erlotinib) zwischen den vier Zelllinien festgestellt werden.

Damit konnte für dieses Zellsystem die ursprüngliche Arbeitshypothese nicht bestätigt werden, dass Tumorzelllinien mit einer extremen Überexpression des EGFR mehr Reparaturproteine (wie z.B. DNA-PKcs) exprimieren und daher eine größere Reparaturkapazität für strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche aufweisen.

Es wird vermutet, dass eine solche extreme EGFR-Überexpression der Ursprungszelllinie MDA-MB-468-WT zu Fehlregulation im EGFR-Signalweg führt, die auch in den drei abgeleiteten Subklonen weiterbesteht. Die Kultivationsbedingungen, aus denen die Subklone hervorgegangen sind, haben sich vermutlich nur auf die EGFR-Expression ausgewirkt und nicht auf die nachgeschalteten Signalproteine. Die vier Zelllinien zeigen trotz unterschiedlicher EGFR-Expression ein identisches EGFR-Signaling und damit auch ein ähnliches Zellverhalten bezüglich Zellproliferation, Proteinexpression und DNA-Reparaturkapazität.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die noch unveröffentlichten Daten der Arbeitsgruppe, welche zeigen, dass nur bei Tumorzellen, die eine moderate EGFR-

Expression haben, die EGFR-Menge positiv mit der zellulären Radioresistenz und auch der Tumorkontrolldosis TCD50 der entsprechenden Tumorexografts korreliert. Bei Tumoren mit einer extremen EGFR-Expression wie bei der Ursprungszelllinie MDA-MB-468-WT wird diese Korrelation dagegen nicht beobachtet.

## 7. ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP-Stelle	Stelle in Nucleinsäuren, an denen Apurinsäuren oder Apyrimidinsäuren vorkommen
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
BCA	Bicinchoninic Acid
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNA PKcs	DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
ECL	Electrochemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
Gy	Gray
HR	homologe Rekombination
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
mAK	monoklonale Antikörper
MM	Magermilch
NHEJ	nicht-homologe Endjoining
PBS	Phosphate buffered saline

PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
Rpm	Revolutions per Minute
RT	Raumtemperatur
SDS PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SF	Surviving fraction (Überlebensfraktion)
TCD50	Tumor control dose 50%
TBS	Tris-Buffered Saline
TKIs	Tyrosinkinase-Inhibitoren
$\gamma$ H2AX	phosphoryliertes Histon H2AX

## 7.2 Materialien

### 7.2.1 Verwendete Laborgeräte

Blotkammer	Criterion Blotter Bio-Rad
Brutschrank	ICN Flow (Automatik CO <sub>2</sub> Incubator Model)
Coulter Counter	Beckmann
Elektrophoresekammer	Criterion Cell Bio-Rad
Entwicklermaschine	Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech
FACScan	Becton Dickinson, Mac V3.0 Betriebssystem, Cell Quest Pro Software, Mod Fit LT Software
Kamerasystem	Night Owl Molecular Light Imager, EG&G Berthold, Winlight Software
Mikroskop	Zeiss, Axioplan 2 Imaging
Photometer	Eppendorf
Röntgenröhre	Gulmay Medical RS 225
Zentrifuge	Beckmann (Microfuge) Heraeus Sepatech (Megafuge)

### 7.2.2 Verbrauchsmaterial

Blotschwamm	Bio-Rad
Culture Slide	BD Falcon
EinMalpipetten	Falcon
Eppendorfcup	Sarstedt
Filterpapier	Bio-Rad
Glasdeckgläschen	Marienfeld
Kulturflaschen	Sarstedt
Plastikdeckgläschen	NUNC
12-well-Platten	Falcon
Polyacrylamidgele	Criterion Tris-HCl Gel, 7.5%, 18-well, Bio-Rad Criterion Tris-HCl Gel, 4-15%, 18-well, Bio-Rad
PVDF-Membran	Amersham
Röntgenfilm	Thermo Scientific
Zellschaber	Costar
Zentrifugenröhrchen (PP-Test tubes)	Greiner Bio-One

### 7.2.3 Verwendete Puffer und Lösungen

#### Zellkultivierung:

EGF Stammlösung	5 µM EGF (Sigma: E9644) 10 mM Essigsäure 0,1% BSA (Albumin bovine Fraktion V, Serva)
L-Glutamine	GIBCO
Penicillin/Streptomycin	GIBCO
Trypsin-EDTA	GIBCO
DMEM	GIBCO
FKS	GIBCO (Hitzeinaktivierung erfolgte für eine Stunde bei 65°C im Wasserbad)

### Durchflusszytometrie:

80% Ethanol

10×PBS                      2,7 mM KCl (Merck)  
                                    2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)  
                                    137 mM NaCl (J.T. Baker)  
                                    10 mM Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O (Merck)

1×PBS                        10% 10×PBS

PI-RNase Lösung            0,001% Propidiumiodid  
                                    0,1% RNase (Serva #34390)

### Proteinextraktion:

SDS-Lysepuffer:            200 mM Tris/HCL (Sigma)  
                                    5 mM EDTA (Sigma)  
                                    10% Saccharose (Merck)  
                                    3,3% SDS (Carl Roth GmbH)  
                                    1Tabl. Complete-Mini-Proteaseinhibitoren (Roche)  
                                    100 µl Phosphatase-Cocktail I (Sigma)  
                                    100 µl Phosphatase-Cocktail II(Sigma)

### BCA-Assay:

Reagenz A                    Sigma

Reagenz B                    Sigma

### SDS-PAGE und Western-Blot:

5% BSA                        5% BSA (Albumin bovine Fraktion V, Serva)  
                                    in TBS-Tween 20

Coomassie-Färbelösung    2 mM Coomassie Brilliant Blue R250  
                                    0,5 mM Coomassie Brilliant Blue G250  
                                    42,5% Ethanol (Merck)  
                                    10% Eisessig (Merck)  
                                    5% Methanol (J.T Baker)

ECL Reagenz 1+2            Amersham Bioscience

Entfärber                     13% Methanol (J.T Baker)  
                                    10% Eisessig (Merck)

Film-Entwickler            10% Eukobrom (Tetenal)

Film-Fixierer	20% Superfix plus (Tetenal)
Kaleidoskope	Bio Rad
1×Laufpuffer	10% 10×TG-Puffer 0,1% SDS (Carl Roth GmbH)
5%, 10%, 15% Magermilch	5%, 10%, 15% Magermilchpulver (Naturaflor, Töpfer) in TBS-Tween 20
5% Magermilch+5% BSA	5% Magermilchpulver (Naturaflor, Töpfer) 5% BSA (Albumin bovine Fraktion V, Serva) in TBS-Tween 20
Magic Mark	invitrogen
5×Probenpuffer nach Lämmli	50 mM Tris-HCL (Sigma) 100 mM DTT (Sigma) 2% SDS (Carl Roth GmbH) 0,1% Bromphenolblau (Sigma) 10% Glycerol (Sigma)
SDS (10%)	10% SDS (Carl Roth GmbH)
10×TBS-Puffer	10 mM Tris-HCL (Sigma) 100 mM NaCl (J.T. Baker) pH Einstellen auf 7,5
TBS-Tween 20	0,1% Tween 20 (Sigma) in 1×TBS
10×TG-Puffer	192 mM Glycin (Carl Roth GmbH) 25 mM Tris Base (Sigma) pH sollte uneingestellt zwischen 8,1 und 8,5 liegen
1×Transferpuffer nach Towbin ohne SDS	10% 10×TG-Puffer 20% Methanol (J.T. Baker)
<u>γH2AX-Foci:</u>	
Blockierung	3% BSA (Albumin bovine Fraktion V, Serva) in 1×PBS
DAPI/Antifade	Q Bio Gene
Erlotinib-Stammlösung (=Tyrosinkinae-inhibitor)	5mM Erlotinib (Roche, Tarceva Ro-508231001) DMSO
1×PBS	10% 10×PBS

1×PBS+1% BSA	1% BSA (Albumin bovine Fraktion V, Serva) in 1×PBS
1×PBS+1% BSA+0,5%Tween 20	1% BSA (Albumin bovine Fraktion V, Serva) 0,5% Tween 20 (Sigma) in 1×PBS
1×PBS+0,5%Tween 20	0,5% Tween 20 (Sigma) in 1×PBS
Permeabilisierung	1% BSA (Albumin bovine Fraktion V, Serva) 0,2% Triton X-100 (Sigma) in 1×PBS
Fixierung	2% Formaldehyd (Merck) in 1×PBS

## 7.2.4 Verwendete Antikörper

### Western-Blot

Anti-Actin	Sigma A5441
Anti-AKT	Cell Signalling #9272
Anti-DNA-PKcs	Calbiochem Ab-1/PC127
Anti-EGFR	Cell Signalling #2232
Anti-MAPK	Cell Signalling #9107
Anti-P-AKT (Ser473)	Cell Signalling #9272S
Anti-Phosphotyrosine MAb =PY20	BD Biosciences Pharmingen #610000
Anti-P-MAPK (p44/42)	Cell Signalling #4370S
Anti-Maus	Amersham: NA931
Anti-Kaninchen	Amersham: NA934
Anti-Ku70	Novus: Ku70 2C3.11, #NB 100-102
Anti-Rad51	Calbiochem Ab-1/PC130
Anti-XRCC1	Serotec, AHP832

$\gamma$ -H2AX-Foci:

Alexafluor 594

Anti- $\gamma$ H2AX

Molekular Probes: A11005

Upstate: 05-636

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Ang K.K., Berkey B.A., Tu X., Zhang H.Z., Katz R., Hammond E.H., Fu K.K., Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Research* 2002; 62:7350-7356.

Akimoto T., Hunter N.R., Buchmiller L., Mason K, Ang K.K., Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2884-2890.

Arteaga, C.L. The epidermal growth factor receptor: from mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol* 2001; 19: 32-40.

Balaban N., Moni J., Shannon M., Dang L., Murphy E., Goldkorn T. The effect of ionizing radiation on signal transduction: Antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1314:147-156.

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; 273:1568-1573.

Baumann M, Krause M, Dikomey E, Dittmann K, Dorr W, Kasten-Pisula U, Rodemann HP  
EGFR-targeted anti-cancer drugs in radiotherapy: Preclinical evaluation of mechanisms. *Radiother Oncol* 2007; 83: 238-248.

Bianco C., Bianco R., Tortora G., Tortora G., Damiano V., Guerrieri P., Montemaggi P., Mendelsohn J., De Placido S, Bianco A.R., Ciardiello F. Antitumor activity of combined treatment of human cancer cells with ionizing radiation and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 plus type I protein kinase A antisense oligonucleotide. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4343–4350.

Bianco C., Tortora G., Bianco R., Caputo R., Veneziani B.M., Caputo R., Damiano V., Troiani T., Fontanini G., Raben D., Pepe S., Bianco A.R., Ciardiello F. Enhancement of antitumor activity of ionizing radiation by combined treatment with selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Clin Cancer Res* 2002; 8:3250-3258.

Blackledge G., Averbuch S. Gefitinib ('Iressa', ZD1839) and new epidermal growth factor receptor inhibitors. *Br J Cancer* 2004; 90:566-572.

Bonner J.A., Buchsbaum D.J., Rogers B., Grizzle W., Trummell H., Curiel D., Fiveash J., Ove R., Raisch K. Adenoviral vector-mediated augmentation of epidermal growth factor receptor (EGFR) enhances the radiosensitization properties of anti-EGFR treatment in prostate cancer cells. *International Journal of Radiation OncologyBiologyPhysics* 2004; 58:950-958.

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 the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354:567-78.

Bonner J.A., Raisch K.P., Trummell H.Q., Robert F., Meredith R.F., Spencer S.A., Buchsbaum D.J., Saleh M.N., Stackhouse M.A., LoBuglio A.F., Peters G.E., Carroll W.R., Waksal H.W. Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18:47S-53S.

Borgmann K., Dede M., Wrona A., Brammer I., Overgaard J., Dikomey E. For x-irradiated normal human fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004; 58: 445-452.

Bucci B., D'Agnano I., Botti C., Mottolese M., Carico E., Zupi G., Vecchione A. EGFR expression in ductal breast cancer: Proliferation and prognostic implications. *Anticancer Res* 1997; 17:769-774.

Burgess A.W., Cho H.S., Eigenbrot C., Ferguson KM., Garrett T.P., Leahy D.J., Lemmon M.A., Sliwkowski M.X., Ward C.W., Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003; 12:541-552.

Burma S., Chen D.J. Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3:909-918.

Cengel K.A., Voong K.R., Chandrasekaran S., Maggiorella L., Brunner T.B., Stanbridge E., Kao G.D., McKenna W.G., Bernhard E.J. Oncogenic K-Ras signals through epidermal growth factor receptor and wild-type H-Ras to promote radiation survival in pancreatic and colorectal carcinoma cells. *Neoplasia* 2007; 9:341-348.

Chen D.J. and Nirodi C.S. The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007; 13:6555-6560.

Chinnaiyan P., Huang S., Vallabhaneni G., Armstrong, E., Varambally, S., Tomlins, S. A., Chinnaiyan, A. M., Harari, P. M. Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res* 2005; 65:3328-3335.

Christmann M., Tomicic M.T., Roos W.P., Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003; 193: 3-34.

Contessa J.N., Hampton J., Lammering G., Mikkelsen R.B., Dent P., Valerie K., Schmidt-Ullrich R.K. Ionizing radiation activates Erb-Breceptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene* 2002; 21:4032-4041.

Das A.K., Chen B.P., Story M.D., Sato M., Minna J.D., Chen D.J., Nirodi C.S. Somatic mutations in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor (EGFR) abrogate EGFR-mediated radioprotection in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Research* 2007; 67:5267-5274.

Dent P., Reardon D.B., Park J.S., Bowers G., Logsdon C., Valerie K., Schmidt-Ullrich R. Radiation-induced release of transforming growth factor  $\alpha$  activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death. *Mol Biol Cell* 1999; 10:2493-2506.

Dent P., Yacoub A., Contessa J., Caron R., Amorino G., Valerie K., Hagan M.P., Grant S., Schmidt-Ullrich R. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiation Research* 2003; 159:283-300.

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. *Journal of Biological Chemistry* 2005a; 280:31182 – 31189.

Dittmann K., Mayer C., Rodemann H.P. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol* 2005b; 76:157-161.

Dikomey E., Borgmann K., Brammer I., Kasten-Pisula U. Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal human fibroblasts. *Toxicology*. 2003; 193: 125-135.

Dikomey E., Brammer I., Johansen J., Bentzen S.M., Overgaard J. Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 40: 481–490

Dikomey E., Dahm-Daphi J., Brammer I., Martensen R., Kaina B. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 269–278.

Earp H.S., Dawson T.L., Li X., Yu H. Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 35: 115-132.

Featherstone C. and Jackson S.P. DNA repair: The Nijmegen breakage syndrome protein. *Current Biology*. 1998; 8:R622-R625

Filmus, J., Trent J.M., Pollak M.N., Buick R.N. Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants. *Mol. Cell. Biol.* 1987; 7:251-257.

Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C., USA: ASM Press 2006.

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. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; 5:209-218.

Gardner D.P., Shimizu N. Loss of cytotoxic effect of epidermal growth factor (EGF) on EGF receptor overexpressing cells is associated with attenuation of EGF receptor tyrosine kinase activity. *J Cell Physiol*. 1994; 158:245-55

Gill G.N., Weber W., Thompson D.M., Lin C., Evans R.M., Rosenfeld M.G., Gamou S., Shimizu N. Relationship between production of epidermal growth factor receptors, gene amplification, and chromosome 7 translocation in variant A431 cells. *Somat. Cell Mol. Genet. I* 1985; 1:309-318.

Goike H.M., Asplund A.C., Pettersson E.H., Liu L., Ichimura K., Collins V.P. Acquired rearrangement of an amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in a human glioblastoma xenograft. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58:697-701.

Grandis J.R., Melhem M.F., Barnes E.L., Tweardy D.J. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor  $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1996; 78:1284-1292.

Grawunder U., Wilm M., Wu X., Kulesza P., Wilson Th.E., Mann M., Lieber M.R. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 1997; 388:492-495.

Grudinkin P.S., Bagaeva V.V., Nikol'skiĭ N.N. EGF-induced signal transduction in clonal cells of epidermoid carcinoma A431 *Tsitologiya*. 2003; 45:158-165.

Gullick W.J., Downward J., Parker P.J., Whittle N., Kris R., Schlessinger J., Ullrich A., Waterfield M.D. The structure and function of the epidermal growth factor receptor studied by using antisynthetic peptide antibodies. *Proceedings of the Royal Society London B: Biological Sciences* 1985; 226:127-134.

Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N., Ullrich, A., Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11:184-189.

- 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. *Molecular Carcinogenesis* 2006; 45:10-17.
- Harari P.M., Huang S.M. Epidermal growth factor receptor modulation of radiation response: preclinical and clinical development. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12:21-6.
- Harari P.M., Huang S.M. Radiation combined with EGFR signal inhibitors: head and neck cancer focus. *Semin Radiat Oncol* 2006; 16:38-44.
- Helseth, Are Dalen, Geirmund Unsgaard, Randi Vik and Are Helseth. Overexpression of the epidermal growth factor receptor gene in a human carcinoma cell line, derived from a brain metastasis. *Eirik Journal of Neuro-Oncology* 1989; 7: 81-89.
- Hennessy B.T., Smith D.L., Ram P.T., Lu Y., Mills G. B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* 2005; 4: 988-1004.
- Herrmann T., Baumann M. *Klinische Strahlenbiologie.* Gustav Fischer Verlag. 1997.
- Hoeijmakers J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001; 411: 366-374.
- Hirai M., Gamou S., Minoshima S., Shimizu N. Two independent mechanisms for escaping epidermal growth factor-mediated growth inhibition in epidermal growth factor receptor-hyperproducing human tumor cells. *J Cell Biol.* 1988; 107:791-799.
- Huang S.M., Bock J.M. and Harari P.M. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;5 9:1935-1940.
- Huang S.M., Harari P.M. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: Inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2166-2174.
- Huang S.M., Li J., Harari P.M. Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade. *Mol Cancer Ther* 2002; 1:507-514.
- Jackson S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002; 23: 687-696.
- Janmaat M.L. and Giaccone G Small-molecule epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Oncologist* 2003; 8:576-586.
- Jorissen R.N., Walker F., Pouliot N., Garrett T.P., Ward C.W., Burgess A.W. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* 2003; 284: 31-53.

Kanaar R., Hoeijmakers J.H.J., van Gent D.C. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:483-489.

Kasten-Pisula U., Tastan H., Dikomey E. Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *International Journal of Radiation Biology* 2005; 81:409-419.

Kauffmann G., Moser E., Sauer R. *Radiologie Grundlagen der Radiodiagnostik, Radiotherapie und Nuklearmedizin.* Urban und Schwarzenberg 2001.

Kim T.J., Lee J.W., Song S.Y., Choi J.J., Choi C.H., Kim B.G., Lee J.H., Bae D.S. Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *British Journal of Cancer* 2006; 94:1678-1682.

Klijn J.G., Berns P.M., Schmitz P.L., Foekens J.A. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 1992; 13:3-17.

Krause M., Zips D., Thames H.D., Kummermehr J., Baumann M. Preclinical evaluation of molecular-targeted anticancer agents for radiotherapy. *Radiotherapy & Oncology* 2006; 80:112-122.

Lammering G., Hewitt T.H., Valerie K., Contessa J.N., Amorino G.P., Dent P., Schmidt-Ullrich R.K. EGFRvIII-mediated radioresistance through a strong cytoprotective response. *Oncogene* 2003; 22:5545-5553.

Lee K.J., Huang J., Takeda Y., Dynan W. DNA ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end joining system. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:34787-34796.

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; 34:32-41.

Liang K., Ang K.K., Milas L., et al. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57:246-254.

Lin S.Y., Makino K., Xia W., Matin A., Wen Y., Kwong K.Y., Bourguignon L., Hung M.C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature Cell Biology* 2001; 3:802-808.

Lo H.W., Hsu S.C., Ali-Seyed M., Gunduz M., Xia W., Wei Y., Bartholomeusz G., Shih J.Y., Hung MC. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 2005; 7:575-589.

Lo H.W., Hsu S.C., Hung M.C. EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 95:211-218.

- Löffler G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Verlag. 2002.
- Lüftner D. Die Bedeutung des Serumantigens des Onkoproteins HER-2/neu für die Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, 2003.
- Mendelsohn, J., The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:3-9.
- Messa C., Russo F., Caruso M.G., DiLeo A. EGF, TGF $\beta$ a, and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol* 1998; 37:285-289.
- Miettinen P.J., Berger J.E., Meneses J., Phung Y., Pedersen R.A., Werb Z., Derynck R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1995; 376:337-341.
- Milas L., Mason K.A., Ang K.K. Epidermal growth factor receptor and its inhibition in radiotherapy: in vivo findings. *Int JRadiat Biol* 2003; 79:539-545.
- Milas L., Mason K., Hunter N., Petersen S., Yamakawa M., Ang K., Mendelsohn J., Fan Z. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 2000; 6:701-708.
- Miyaguchi M., Takeuchi T., Morimoto K., et al. Correlation of epidermal growth factor receptor and radiosensitivity in human maxillary carcinoma cell lines. *Acta Otolaryngol* 1998; 118:428-431.
- Nakamura J.L. The epidermal growth factor receptor in malignant gliomas: pathogenesis and therapeutic implications. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2007; 11:463-472.
- Nishinaka T., Yabe-Nishimura C. EGF receptor-ERK pathway is the major signalling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 205-216.
- Noonberg S.B., Benz C.C., Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* 2000; 59:753-767.
- Nyati M.K., Maheshwari D., Hanasoge S., Sreekumar A., Rynkiewicz S.D., Chinnaiyan A.M., Leopold W.R., Ethier S.P. and Lawrence T.S. Radiosensitization by pan ErbB inhibitor CI-1033 in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10:691-700.
- Nyati M.K., Morgan M., Feng F., Lawrence T. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:867-85.
- Park C.M., Park M.J., Kwak H.J., Lee H.C., Kim M.S., Lee S.H., Park I.C., Rhee C.H., Hong S.I. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling pathways. *Cancer Research* 2006; 66:8511-8519.

- Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*. 2000; 15:289-302.
- Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S., Ullrich, A., The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:11-31.
- Raben D., Helfrich B., Bunn P.A., Jr. Targeted therapies for non-small-cell lung cancer: biology, rationale, and preclinical results from a radiation oncology perspective. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59:27-38.
- Raben D., Helfrich B., Chan D.C., et al. The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:795-805.
- Raben, D., Bianco, C., Helfrich, B., Weng, E., Ciardiello, F., Harari, P. Interference with EGFR signaling: paradigm for improving radiation response in cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther* 2002; 2:461-471.
- Rao G. S., Murray S., Ethier S. P. Radiosensitization of human breast cancer cells by a novel ErbB family receptor tyrosine kinase inhibitor. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 2000; 48:1519-1528.
- Rieske P., Kordek R., Bartkowiak J., Debiec-Rychter M., Bienhat W., Liberski P.P. A comparative study of epidermal growth factor receptor (EGFR) and MDM2 gene amplification and protein immunoreactivity in human glioblastomas. *Pol J Pathol* 1998; 49:145-149.
- Rodemann H.P., Dittmann K., Toulany M. Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *International Journal of Radiation Biology* 2007; 83:11,781-791.
- Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19:183-232.
- Sebolt-Leopold, J. S., Herrera, R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Rev. Cancer* 2004; 4:937-947.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103:211-225.
- Schlessinger J., Schreiber A.B., Levi A., Lax I., Libermann T., Yarden Y. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *CRC Crit Rev Biochem*. 1983; 14:93-111.
- Schmidt-Ullrich R.K., Mikkelsen R.B., Dent P., et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997; 15:1191-1197.

Sheridan M.T., O'Dwyer T., Seymour C.B., et al. Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol Investig* 1997; 5:180-186.

Shi B, Yaremko B, Hajian G, Terracina G, Bishop WR, Liu M, Nielsen LL. The farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 synergizes with taxanes in vitro and enhances their antitumor activity in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000; 46:387-93.

Shintani S., Li C., Mihara M., Terakado N., Yano J., Nakashiro K., Hamakawa H. Enhancement of tumour radioresponse by combined treatment with gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer. *Int. J. Cancer* 2003; 107: 1030-1037.

Song G., Ouyang G., Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular & Molecular Medicine* 2005; 9:59-71.

Statistisches Bundesamt, 2007

<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Navigation/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.psml>

Sung P., Krejci L., Van Komen S., Sehorn M.G. Rad51 recombinase and recombination mediators. *J.Biol.Chem*. 2003; 278:42729-42732.

Symington L.S. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol.Mol.Biol.Rev* 2002; 66:630-670.

Szumiel I. Epidermal growth factor receptor and DNA double strand break repair: The cell's self-defence. *Cellular Signalling* 2006; 18:1537-1548

Takata M., Sasaki M. S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*. 1998; 17: 5497-508.

Thariat J., M.D., Milas L., M.D., Ph.D., and Ang K.K., M.D., Ph.D. 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; 69:974-984.

Thompson L.H., Schild D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat.Res*. 2002; 509:49-78.

Toulany M, Dittmann K, Kruger M, Baumann M, Rodemann HP. Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. *Radiotherapy & Oncology* 2005b; 76:143-150.

Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, et al. 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; 12:4119-4126.

Tokunaga E, Kataoka A, Kimura Y, Oki E, Mashino K, Nishida K, Koga T, Morita M, Kakeji Y, Baba H, Ohno S, Maehara Y. The association between Akt activation and resistance to hormone therapy in metastatic breast cancer. *European Journal of Cancer* 2006; 42:629-635.

Um Jee Hyun; Kwon Joong Keun; Kang Chi-Dug; Kim Mi Ju; Ju Dong Sik; Bae Jae Ho; Kim Dong Wan; Chung Byung Seon; Kim Sun Hee. 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. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2004; 311:1062-70.

van Attikum H., Gasser S.M. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nature reviews. Molecular cell biology* 2005; 6:757-765.

Valerie K., Povirk L.F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*. 2003; 22:5792-5812.

Wang Y., Pennock S., Chen X., et al. Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol Cell Biol* 2002; 22:7279-7290.

Warren C.M., Landgraf R. Signaling through ERBB receptors: Multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* 2006; 18: 923-933.

Wells A. The epidermal growth factor receptor (EGFR) - a new target in cancer therapy. *Signal* 2000; 1:4-11.

Wendel, H. G. et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 2004; 428:332-337.

Withers H.R., Taylor J.M., Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 1988; 27:131-46.

Wollman R., Yahalom J., Maxy R., et al. Effect of epidermal growth factor on the growth and radiation sensitivity of human breast cancer cells in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30:91-98.

Woodburn J.R., The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 82:241-250.

Xing D., Orsulic S. A genetically defined mouse ovarian carcinoma model for the molecular characterization of pathway- targeted therapy and tumor resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2005; 102:6936-6941.

Yacoub A, McKinstry R, Hinman D, Chung T, Dent P, Hagan MP. Epidermal growth factor and ionizing radiation upregulate the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 and LNCaP prostate carcinoma through MAPK signaling. *Radiation Research* 2003; 159:439-452.

Yacoub A., Miller A., Caron R.W., Qiao L., Curiel D.A., Fisher P.B., Hagan M.P., Grant S., Dent P. Radiotherapy-induced signal transduction. *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13:S99-S114

Yacoub A, Park JS, Qiao L, Dent P, Hagan MP. 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. *International Journal of Radiation Biology* 2001; 77:1067-1078.

Zhan M., Han Z.C. Phosphatidylinositide 3-kinase/AKT in radiation responses. *Histol Histopathol* 2004; 19:915-23.

## **9. DANKSAGUNG**

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und der übergeordneten Betreuung möchte ich Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Kasten-Pisula, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit hervorragend betreut hat. Nicht nur beim wissenschaftlichen Teil, sondern auch bei allen anderen Herausforderungen hat sie mir zur Seite gestanden und mich mit Rat und Tat unterstützt. Vielen Dank für die Geduld und die Korrektur meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei der Medizinisch-technischen Assistentin Frau Britta Riepen bedanken, die mich sehr gut in den Laboralltag eingeführt und während meiner praktischen Arbeit im Labor betreut hat.

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

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen liebevollen Eltern, die mich immer bei allem unterstützt und gefördert haben.

## **10. LEBENSLAUF**

## **11. EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG**

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.

Unterschrift.....

Hamburg, den.....