

# **Bedeutung der EGFRvIII-Expression für die Radio- und Chemosensitivität von humanen Glioblastomzellen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) des Fachbereichs Chemie, der  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Nina Struve**

aus Hamburg

Hamburg, Juli 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christian Betzel

Tag der Disputation: 17. Juli 2015

Die Dissertation wurde zwischen Mai 2012 und Mai 2015 im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Anleitung von Prof. Dr. Ekkehard Dikomey durchgeführt.





## Summary

The epidermal growth factor receptor EGFR is overexpressed in approximately 40-50% of glioblastomas (GBM), which is associated with *egfr* gene amplification. Additionally about 25-30% of these tumours display expression of the EGFR deletion mutant EGFRvIII. Pre-clinical studies, which used transfected cell cultures observed an association between EGFRvIII expression and increased resistance towards X-irradiation. Furthermore it was shown that EGFR inhibition leads to radiosensitization of cells, which were transfected with EGFRvIII. However, no clear association between EGFRvIII and resistance towards chemotherapeutics has been described so far.

Until now it is not clear if EGFRvIII is a prognostic factor for the overall survival of GBM patients, who are treated with radio- and temozolomide (TMZ) based chemotherapy. For that reason in the present thesis the impact of EGFRvIII expression on cellular radiosensitivity with and without EGFR inhibition was analyzed. Furthermore the influence of EGFRvIII expression on TMZ sensitivity was determined.

In this context O<sup>6</sup>-methylguanine-methyltransferase (MGMT) negative and EGFRvIII positive GBM cell lines were used to generate isogenetic sublines with either a very low (EGFRvIII<sup>-</sup>) or a very high fraction of EGFRvIII positive cells (EGFRvIII<sup>+</sup>). The characterization of the EGFRvIII<sup>+</sup> cells revealed only a moderate activation for the MAPK and AKT/PI3K signaling when compared to EGFRvIII<sup>-</sup> cells. In regard to proliferation no significant differences were recorded as well. Furthermore we observed no consistent EGFRvIII dependent effect in respect to DNA double strand break repair, which is crucial for the cellular survival after irradiation. Strikingly, no significant difference in cellular radiosensitivity was determined for either of the two pairs of EGFRvIII<sup>-</sup> and EGFRvIII<sup>+</sup> sublines. This observation suggests that endogenous EGFRvIII expression has no impact on cellular radiosensitivity in these GBM cell lines. In agreement with this EGFR inhibition did not lead to a robust radiosensitization irrespective of the EGFRvIII status.

In contrast to irradiation we were able to demonstrate that EGFRvIII<sup>+</sup> compared to EGFRvIII<sup>-</sup> cells are highly sensitive towards TMZ and a knock down of EGFRvIII was associated with increased TMZ resistance. The cytotoxic effect of TMZ in MGMT negative cells is predominately determined by intact mismatch repair (MMR). In line with

this we could show that EGFRvIII expressing cells display elevated MMR protein expression. As a consequence the specific knock down of EGFRvIII led to a reduction of the MMR protein MSH6. A possible explanation for the elevated MMR capacity in EGFRvIII+ cells is the presence of increased replication stress, which was analyzed by a fiber assay. This assay confirmed the hypothesis: increased replication stress was detected in EGFRvIII+ cells. In line with this untreated EGFRvIII+ cells displayed a higher phosphorylation of proteins H2AX, Chk1, ATM and Chk2 involved in DNA damage recognition.

Taken together, in the present study a model system consisting of two pairs of isogenic and not genetically modified EGFRvIII+ and EGFRvIII- sublines was established. This model system is an ideal tool to analyze the impact of EGFRvIII expression on central biological and clinical aspects of GBM cells. Based on this model system we could show, that endogenous EGFRvIII expression is not associated with increased radioresistance and that EGFR inhibition is not efficient for radiosensitization of EGFRvIII-/+ GBM cells. In contrast to these observations it was shown that EGFRvIII+ cells display an increased sensitivity towards TMZ. This is probably due to an enhanced MMR capacity, which seems to be the consequence of EGFRvIII induced replication stress.

This data are of great importance because also recent clinical data did not confirm an association of EGFRvIII expression and radioresistance and EGFR inhibition did not lead to the clinical success, which was expected. In contrast it was demonstrated, that EGFRvIII expression leads to an increased sensitivity towards TMZ, which is presumably caused by an elevated replication stress. EGFRvIII might therefore be a potential biomarker for the effective inactivation of MGMT negative GBM tumours by TMZ.

## Zusammenfassung

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) wird in 40-50% aller Glioblastome (GBM) aufgrund einer Genamplifikation überexprimiert. Ungefähr die Hälfte dieser Tumoren exprimiert außerdem die Deletionsmutante EGFRvIII. Erste Studien, die transfizierte Zellen nutzten zeigten, dass eine erhöhte EGFRvIII-Expression zu einer Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlen führt und dementsprechend eine Inhibition des EGFR eine Radiosensitivierung bewirkt. Hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika ist bisher jedoch kein eindeutiger entsprechender Zusammenhang beschrieben worden. Ausgehend von den klinischen Studien ist es bislang aber unklar, ob eine EGFRvIII-Expression eine prognostische Relevanz für das Überleben von GBM-Patienten nach Radiochemotherapie hat.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss der EGFRvIII zum einen auf die Strahlenempfindlichkeit von GBM-Zellen mit und ohne EGFR-Inhibition und zum anderen auf eine Chemotherapie mittels Temozolomid (TMZ) hat. Die Studien sollten jedoch in nicht transfizierten GBM-Zellen mit endogener EGFRvIII-Expression durchgeführt werden. Extra für diese Untersuchungen wurden daher aus zwei unabhängigen O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase- (MGMT) negativen und EGFRvIII-positiven GBM-Zelllinien (DKMG, BS153) isogenetische Subzelllinien mit geringer (EGFRvIII<sup>-</sup>) oder hoher (EGFRvIII<sup>+</sup>) EGFRvIII-Expression generiert.

Die Charakterisierung dieser Sub-Zelllinien zeigte für EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen lediglich eine moderate Aktivierung des MAPK- und des AKT/PI3K-Signalweges. In Hinblick auf die Proliferation zeigten sich keine bedeutenden Unterschiede. Nach Röntgenbestrahlung wurde zudem kein einheitlicher EGFRvIII-abhängiger Effekt bezüglich der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beobachtet, ein Mechanismus, der für das Überleben von Zellen nach Röntgenbestrahlung entscheidend ist.

Hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit an sich wurde kein signifikanter Unterschied zwischen EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen beobachtet. Demzufolge konnte auch weder für EGFRvIII<sup>-</sup>- noch für EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen eine signifikante Radiosensitivierung durch eine EGFR-Inhibition mittels Gefitinib erreicht werden. Diese Daten deuten



insgesamt an, dass anders als bisher vermutet eine endogene EGFRvIII-Expression keinen Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat.

Im Gegensatz zur Reaktion auf Röntgenbestrahlung konnte bezüglich einer Behandlung der Sub-Zelllinien mit TMZ erstmalig in einem endogenen und isogenen Modellsystem gezeigt werden, dass EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen deutlich sensitiver sind. Dementsprechend wurde beobachtet, dass eine gezielte Herunterregulation des EGFRvIII mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber TMZ einhergeht. Die zytotoxische Wirkung von TMZ wird in MGMT-negativen Zellen überwiegend durch intakte *Mismatch* Reparatur (MMR) vermittelt. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass in EGFRvIII-exprimierenden Zellen eine erhöhte Expression der MMR-Proteine vorliegt und eine gezielte Herunterregulation des EGFRvIII zu einer Reduktion des MMR-Proteins MSH6 führte. Als mögliche Ursache für die verstärkte MMR kann ein erhöhtes Level an Replikationsstress angenommen werden, wie durch Untersuchungen der Replikation mittels *Fiber Assay* in den EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden konnte. In Übereinstimmung damit wiesen die EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen zudem schon in unbehandelten Zustand eine stärkere Phosphorylierung von Proteinen der DNA-Schadensantwort wie H2AX, Chk1, ATM und Chk2 auf.

In dieser Arbeit konnte somit ein isogenetisches und nicht-gentechnisch verändertes Zellkulturmodellsystem bestehend aus verschiedenen EGFRvIII-positiven und -negativen Sub-Zelllinien etabliert werden, welches sich optimal eignet, um den Einfluss von EGFRvIII auf zentrale Aspekte der Biologie und Therapie von GBM-Zellen zu untersuchen. Mit Hilfe dieses Systems konnte erstmals gezeigt werden, dass eine endogene EGFRvIII-Expression nicht mit einer erhöhten Strahlenresistenz einhergeht und sich eine EGFR-Inhibition nicht für eine Radiosensitivierung eignet. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch in den EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber TMZ. Dies kann auf eine gesteigerte MMR zurückgeführt werden, welche durch einen erhöhten Replikationsstress in den EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen ausgelöst zu sein scheint.

Diese Ergebnisse sind deshalb von großer Bedeutung, da auch aktuelle klinische Studien zum einen eine Assoziation der EGFRvIII-Expression mit einer Radioresistenz nicht bestätigen konnten und zum anderen Ansätze zur EGFR-Inhibition nicht zu den gewünschten Erfolgen führten. Die Arbeiten zeigen aber auch, dass die EGFRvIII-Expression ein potentieller Biomarker für das effektive Ansprechen von MGMT-negativen GBM auf TMZ sein könnte.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Summary</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Glioblastom (Glioblastoma Multiforme).....	1
1.2 Molekularpathologie des Glioblastoms.....	2
1.3 Therapieoptionen beim Glioblastom.....	4
1.3.1 Standardtherapie beim Glioblastom.....	4
1.3.2 EGFR <i>targeting</i> beim Glioblastom.....	5
1.3.2.1 Anti-EGFR Therapie.....	6
1.3.2.2 Anti-EGFRvIII Therapie.....	7
1.4 Der EGF-Rezeptor.....	8
1.4.1 Die Erb-B-Familie.....	8
1.4.2 Der EGF-Rezeptor und EGFR-abhängige Signalwege.....	8
1.4.2.1 Der MAPK-Signalweg.....	10
1.4.2.2 Der PI3K/AKT-Signalweg.....	10
1.4.3 Die EGFR-Deletionsmutante EGFRvIII.....	11
1.5 DNA-Schädigung und DNA-Reparatur.....	13
1.5.1 Wirkungsweise von Strahlung.....	14
1.5.2 Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	15
1.5.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	16
1.5.3.1 Nicht-homologe Endverknüpfung.....	17
1.5.3.2 Homologe Rekombination.....	18
1.5.4 Wirkungsweise von Temozolomid.....	19
1.5.4.1 <i>Mismatch</i> Reparatur vermittelte Prozessierung von.....	20
O <sup>6</sup> -Methylguanin.....	20
1.6 Replikationsstress und genomische Instabilität in Tumoren.....	22
1.7 Ziel der Arbeit.....	24
<b>2 Materialien</b> .....	<b>25</b>
2.1 Zelllinien.....	25
2.2 Antikörper.....	26
2.2.1 Primäre Antikörper.....	26
2.2.2 Sekundäre Antikörper.....	27
2.3 Reagenzien und Medien für die Zellkultur.....	28

2.4	Chemikalien und Reagenzien .....	28
2.5	siRNAs .....	30
2.6	Puffer und Lösungen.....	30
2.7	Verbrauchsmaterialien.....	31
2.8	Geräte und Hilfsmittel .....	32
2.9	Software.....	34
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.1	Zellbiologische Methoden .....	35
3.1.1	Zellkultivierung.....	35
3.1.2	Bestrahlung von Zellen mit einer Röntgenröhre .....	36
3.1.3	Wachstumskurven.....	36
3.1.4	Herstellung von Ganzzelllysaten.....	36
3.1.5	Koloniebildungstest .....	37
3.1.5.1	Bestimmung des Zellüberlebens nach Bestrahlung.....	37
3.1.5.2	Bestimmung des Zellüberlebens nach Temozolomid- Behandlung.....	37
3.1.5.3	Bestimmung des Zellüberlebens nach EGFRvIII <i>knock down</i> und Temozolomid-Behandlung .....	38
3.1.5.4	Färbung und Analyse des Koloniebildungstests.....	38
3.1.6	Transfektion mit siRNA.....	38
3.2	Immunfluoreszenz.....	39
3.2.1	Nachweis der EGFRvIII-Expression.....	39
3.2.2	Nachweis von residuellen $\gamma$ H2AX/53BP1-Reparatur-Foci.....	40
3.2.3	DNA <i>Fiber Assay</i> .....	40
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	42
3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	42
3.3.2	<i>Western Blot</i> .....	43
3.4	Durchflusszytometrische Methoden.....	43
3.4.1	Analyse der EGFRvIII-Expression .....	43
3.4.2	Etablierung EGFRvIII <sup>-</sup> - und EGFRvIII <sup>+</sup> -Sub-Zelllinien .....	45
3.4.3	Analyse der Zellzyklusverteilung.....	45
3.5	Statistik .....	46
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
4.1	Einfluss des EGFRvIII auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit .....	47

---

4.1.1	EGFR- und EGFRvIII-Expression in humanen Glioblastomzellen.....	47
4.1.2	Strahlenempfindlichkeit EGFRvIII-negativer und EGFRvIII-positiver Glioblastomzellen .....	48
4.1.3	Etablierung und Charakterisierung EGFRvIII-positiver und EGFRvIII-negativer Sub-Zelllinien.....	49
4.1.4	Charakterisierung der EGFRvIII- und EGFRvIII+-Sub-Zelllinien.....	54
4.1.5	Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur und Strahlenempfindlichkeit .....	57
4.2	Einfluss des EGFRvIII auf eine EGFR-Inhibition mittels Gefitinib.....	59
4.2.1	Einfluss von Gefitinib auf die EGFR-Signaltransduktion, Zellwachstum und Klonogenität in EGFRvIII-/+ -Sub-Zelllinien.....	59
4.2.2	Einfluss von Gefitinib auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur und zelluläre Strahlenempfindlichkeit in EGFRvIII-/+ Sub-Zelllinien .....	62
4.3	Bedeutung einer EGFRvIII-Expression für die Empfindlichkeit gegenüber Temozolomid .....	65
4.3.1	Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die Temozolomid-Sensitivität.....	65
4.3.2	Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die <i>Mismatch</i> Reparatur.....	68
4.3.3	Einfluss des EGFRvIII auf die zelluläre Replikation.....	70
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
5.1	Bedeutung der EGFRvIII-Expression für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit .....	77
5.2	Einfluss des EGFRvIII auf eine EGFR-Inhibition mittels Gefitinib.....	85
5.3	Bedeutung einer EGFRvIII-Expression für die Empfindlichkeit gegenüber Temozolomid .....	89
5.4	Zusammenfassung.....	93
5.5	Modell und Ausblick .....	93
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>113</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>i</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>ii</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Glioblastom (Glioblastoma Multiforme)

Das Glioblastom (GBM) ist der häufigste maligne Gehirntumor bei Erwachsenen und stellt eine der aggressivsten Tumorentitäten überhaupt dar. Jährlich werden 3 bis 5 Fälle pro 100.000 Personen diagnostiziert. Es wird angesichts seiner sehr schlechten Prognose nach der WHO-Klassifikation als Grad IV Tumor eingestuft und macht etwa 20% aller intrakraniellen Tumore und über 50% aller Gliome aus [1,2]. GBM sind histologisch durch eine hohe Zelldichte sowie mitotische Aktivität, und eine diffuse Infiltration des Gewebes charakterisiert [3,4].

Gewöhnlich tritt das GBM bei Patienten im Alter zwischen 60 und 70 Jahren auf, wobei das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose bei 62 Jahren liegt. Trotz zahlreicher Fortschritte in der Neurochirurgie und der klinischen Neuroonkologie hat sich die Prognose von GBM-Patienten kaum verbessert; derzeit liegt die mittlere Überlebensrate bei durchschnittlich 15 Monaten [1,2]. Das GBM zeichnet sich durch ein schnelles, invasives und diffuses Wachstum aus, wodurch in der Regel eine vollständige Resektion des Tumors nicht möglich ist und in der Regel Rezidive auftreten. Die Mehrheit der Glioblastome entsteht spontan ohne das Auftreten von klinischen oder pathologischen Anzeichen eines vorangegangenen niedrig-gradigeren Glioms [3,4].

*De novo* entstehende Tumoren werden als primäre GBM bezeichnet. Sekundäre GBM, die im Allgemeinen bei jüngeren Patienten (ab 40 Jahren) auftreten, entstehen durch die maligne Progression eines diffusen Astrozytoms (WHO-Grad II) oder anaplastischen Astrozytoms (WHO-Grad III). Histomorphologisch sind diese Subtypen nicht zu unterscheiden, jedoch weisen sie unterschiedliche genotypische Veränderungen auf, so dass eine Differenzierung auf molekularpathologischer Ebene möglich ist (s. Abschnitt 1.2) [2,5]. Ausschlaggebend für die Diagnose des GBM und von entscheidender Bedeutung für die Abgrenzung gegenüber dem anaplastischen Astrozytom (WHO Grad III) ist nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems außerdem der Nachweis von Nekrosen innerhalb des Tumors [3,4].

## 1.2 Molekularpathologie des Glioblastoms

Beim GBM handelt es sich um eine sehr heterogene Tumorentität, die durch zahlreiche molekularpathologische Veränderungen charakterisiert ist. Es treten vor allem Mutationen in Proteinen zellulärer Signalwege auf, die an der Regulation des Zellzyklus, der Proliferation und der Apoptose beteiligt sind. Dazu zählen beispielsweise der EGFR/AKT/PI3K-, der p53/MDM2/p14ARF- und der P16INK4a/CDK4/RB1-Signalweg, zu dem treten in bis zu 80% der sekundären GBM-Mutationen des IDH1- (Isocitratdehydrogenase 1) Gens auf. Diese IDH1-Mutationen sind mit einem eindeutig besseren Überleben von GBM-Patienten assoziiert [2,6,7].

Mit 40-50% ist die Amplifikation des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (engl. *epidermal growth factor receptor*; EGFR) eine der häufigsten genetischen Veränderungen in primären GBM. Diese ist in etwa 50-60% der Fälle mit einer Mutation im Bereich der extrazellulären Domäne assoziiert. Hierdurch entsteht die EGFR-Deletionsmutante EGFRvIII (EGFR-Variante III; kurz EGFRvIII), die konstitutiv aktiv ist und vermutlich zum tumorigenen Potential EGFRvIII-positiver Tumoren beiträgt [2,8-10]. Die Aktivierung des EGFR-Signalweges führt zur Stimulation der Proliferation, der Invasion und der Migration und ist darüber hinaus mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika assoziiert [4,11,12].

In ca. 20-30% der primären GBM, aber nur 4% der sekundären GBM, tritt zudem eine Mutation des Tumorsuppressorgens PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) auf, welches ein Negativregulator des PI3K/AKT-Signalweg ist. Eine PTEN-Mutation resultiert somit in einer verstärkten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges, welcher u.a. anti-apoptotische Gene reguliert [2,13,14].

Veränderungen in dem Zellzyklus kontrollierenden P16INK4a/RB1-Signalweg, die zumeist auf homozygote Deletion von p16INK4a oder den vollständige Verlust des RB1-Gens zurückzuführen sind, kommen sowohl in primären als auch in sekundären GBM vor, wobei eine homozygote Deletion von p16INK4a wesentlich häufiger in primären GBM auftritt. Die Hypermethylierung des RB1-Gens wird sowohl in primären als auch in sekundären GBM beobachtet [15,16].

Eine weitere epigenetische Veränderung, die das Gen O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) betrifft, wird in 40-50% der GBM-Patienten beobachtet. Die Hypermethylierung des MGMT-Promotors führt zur Reduktion der MGMT-Expression. Dies ist von besonderer Bedeutung, da MGMT eine Resistenz gegenüber dem

Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) vermitteln kann. Eine genaue Beschreibung des Resistenzmechanismus sowie der prognostischen Relevanz für MGMT ist in Abschnitt 1.3.1 dargestellt [17,18].

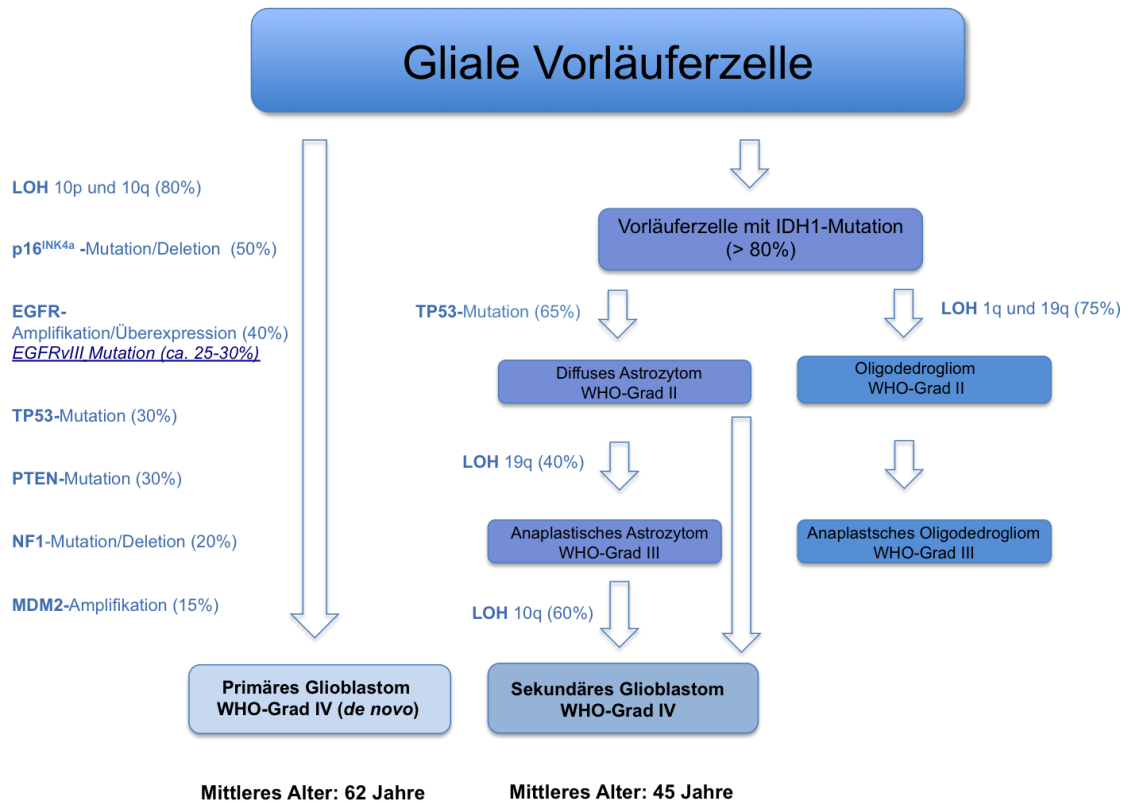
Mit einer Häufigkeit von ca. 80% tritt darüber hinaus in primären GBM der Verlust von DNA-Bereichen des Chromosoms 10 (*loss of heterozygosity* 10, LOH 10) auf. Hierbei handelt es sich vor allem um die Loci 10p14-15, 10q23-24 (PTEN) und 10q25. Es wird angenommen, dass neben dem PTEN-Gen weitere bisher unbekannte Tumorsuppressorgene betroffen sind, deren Deletion zur Tumorprogression beiträgt [19-21].

In etwa 20% der primären GBM werden zudem Mutationen bzw. Deletionen für das NF1 (Neurofibromin 1)-Gen beobachtet. Patienten, die Mutationen in diesem Gen besitzen, haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an Gliomen oder Leukämien zu erkranken [16,22].

Eine weitere molekularpathologische Veränderung, die vorwiegend in primären GBM vorkommt, ist die Überexpression (ca. 50%) und Genamplifikation (<15%) von MDM2 (*Mouse Double Minute 2*), welches ein Negativregulator des Tumorsuppressors p53 ist [23]. Eine Mutation von p53 tritt hingegen nur in ca. 30% in primären GBM auf, ist jedoch eine oftmals beobachtete genetische Veränderung in sekundären GBM [2,15].

Die häufigste genetische Veränderung in sekundären GBM, die auch in diffusen und anaplastischen Astrozytomen sowie Oligodendrogliomen vorkommt, ist mit über 80% die somatische IDH1-Mutation. Die IDH1 ist ein Enzym, welches Bestandteil des Citrat-Zyklus ist und somit eine wichtige Rolle im zellulären Metabolismus spielt. Diese Mutation kommt jedoch kaum in primären GBM vor [2,24-26]. Eine detaillierte Übersicht zur Molekularpathologie von primären und sekundären Glioblastomen ist in Abbildung 1.1 dargestellt.





**Abb. 1.1: Molekularpathologie primärer und sekundärer GBM.** Während das primäre GBM ohne vorherige molekularpathologische Veränderungen, d.h. *de novo* entsteht, entwickelt sich das sekundäre GBM durch die maligne Progression eines diffusen oder anaplastischen Astrozytoms. Es ist eine Auswahl wichtiger genetischer Veränderungen dargestellt. Die Abbildung wurde nach Oghaki *et al.* modifiziert [2].

### 1.3 Therapieoptionen beim Glioblastom

GBM weisen aufgrund ihres schnellen und invasiven Wachstums eine sehr schlechte Prognose auf und können in der Regel ausschließlich palliativ behandelt werden. Die Standardtherapie besteht in einer möglichst vollständigen Resektion des Tumors sowie einer adjuvanten Chemo- und Strahlentherapie [27]. Im folgenden Abschnitt soll auf die verschiedenen Therapieoptionen eingegangen, sowie die Wirkungsweise der Strahlen- und Chemotherapie näher beleuchtet werden.

#### 1.3.1 Standardtherapie beim Glioblastom

Die Standardtherapie des GBM nach Tumorresektion besteht aus einer fraktionierten Bestrahlung mit insgesamt 60 Gy und einer kombinierten TMZ-Therapie [27,28]. Die Fraktionierung dient im Wesentlichen der Schonung und Erholung des Normalgewebes und kann darüber hinaus zu einer Reoxygenierung des Tumors beitragen, was die Wirkung der Strahlentherapie gegenüber den Tumorzellen erhöht [29]. Durch die Behandlung mit

TMZ konnte eine 2,5-monatige Verlängerung des Überlebens im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie erreicht werden [30].

Die Wirkung von TMZ beruht auf der Alkylierung der DNA, in deren Folge DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen, wodurch ein G2-Arrest oder Apoptose induziert und die Zelle inaktiviert wird (s. Abschnitt 1.5.4) [31,32]. Eine Resistenz gegenüber TMZ wird durch das Enzym MGMT ermittelt, welches einer der wenigen zuverlässigen prognostischen Marker im GBM ist. MGMT entfernt TMZ-induzierte Alkylgruppen und kann somit dem zytotoxischen Effekt von TMZ entgegen wirken. Die MGMT-Expression wird durch den Grad der Methylierung des MGMT-Promotors beeinflusst. Je stärker der Promotor methyliert ist, umso geringer ist die MGMT-Expression. Demzufolge zeigen GBM-Patienten, die eine Hypermethylierung (ca. 40-50 %) des MGMT-Promotors aufweisen mit 21,7 Monaten ein deutlich besseres Ansprechen auf die TMZ-Therapie, als Patienten ohne Hypermethylierung (15,3 Monaten) [17,18,33,34]. Jedoch ist die Methylierung des MGMT-Promotors kein Therapie entscheidendes Kriterium, da in der Regel alle GBM-Patienten gleichermaßen mit TMZ und Strahlentherapie behandelt werden [27].

Wie TMZ induziert auch Bestrahlung DNA-Schäden. Hierbei entstehen neben einer Reihe von Einzelstrangbrüchen auch DSB, welche die toxischsten Schäden für die Zelle darstellen. Eine detaillierte Beschreibung der Wirkmechanismen von ionisierender Bestrahlung und TMZ ist in Abschnitt 1.5.1 und 1.5.4 gegeben.

### 1.3.2 EGFR *targeting* beim Glioblastom

In der Molekularpathologie des Glioblastoms spielt der EGFR eine große Rolle, da das EGFR-Gen in 50-60% der Patienten amplifiziert vorliegt. Del Vecchio *et al.* konnten zeigen, dass die EGFR-Amplifikation sowie das *Rearrangement* des EGFR-Gens, welche die Entstehung der EGFRvIII-Variante zur Folge hat, ein frühes Ereignis in der Tumorigenese ist [35]. Darüber hinaus beobachteten Shinojima *et al.*, dass eine EGFR-Amplifikation und EGFRvIII-Expression mit einer schlechteren Prognose für GBM-Patienten assoziiert ist, die mit Strahlen- und Chemotherapie behandelt wurden [36]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden in den letzten Jahren verschiedene Strategien entwickelt, um den EGFR-Signalweg zu inhibieren. Der Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib wurde bereits in klinischen Studien als Monotherapie oder in Kombination mit Bestrahlung und/oder Chemotherapie eingesetzt [37-39]. Prä-klinische Studien konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine Gefitinib-Behandlung zu einer Radiosensitivierung

sowohl von EGFRvIII-negativen und EGFRvIII-positiven Zellen führte [40,41]. Die unterschiedlichen therapeutischen Ansätze, die der Inhibition des EGFR und des EGFRvIII dienen, werden in den folgenden Abschnitten näher betrachtet.

### 1.3.2.1 Anti-EGFR Therapie

Um den EGFR-Signalweg zu inhibieren wurden EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren wie OSI-774 (Erlotinib, Tarceva®) und ZD1839 (Gefitinib, Iressa®), monoklonale Antikörper, Radioimmunkonjugate sowie Antisense-Oligonukleotide entwickelt. Zu den monoklonalen Antikörpern, die bereits in klinischen Studien getestet wurden, gehören beispielsweise der chimäre Antikörper IMC-C225 (Cetuximab, Erbitux®) und der humane Antikörper ABX-EGF (Panitumumab, Vectibix®), welche die Ligandenbindung blockieren und somit den EGFR inhibieren. Diese Antikörper werden vor allem beim Kolorektalen Karzinom sowie bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches eingesetzt [42,43]. Obwohl die Behandlung mit Cetuximab in GBM-Xenograftmodellen zu einer Inhibition der Proliferation sowie zu einer Zunahme von Apoptose führte, konnten klinische Erfolge bisher nicht beobachtet werden [3,44-46]. Eines der größten Hindernisse bei der Anwendung von Antikörpern und Tyrosinkinaseinhibitoren bei GBM-Patienten ist die Blut-Hirn-Schranke, welche ein Eindringen der Wirkstoffe in das Hirngewebe weitestgehend verhindert [12,47]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass fortgeschrittene Gliome zum Teil eine defekte Blut-Hirn-Schranke aufweisen, wodurch das Eindringen von Wirkstoffen teilweise ermöglicht wird [48].

Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib und Gefitinib, die reversibel die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase des EGFR blockieren, wurden in einer Reihe von klinischen Studien entweder als Monotherapie oder zusätzlich zu einer Strahlen- und Chemotherapie bei GBM-Patienten getestet. Allerdings blieben auch hier bisher größere klinische Erfolge aus. So kam es bei 20% der GBM-Patienten zu einem Ansprechen auf Erlotinib, während lediglich 13% der Patienten unter Gefitinib für mindestens sechs Monate Progressions-frei blieben [49,50]. Eine Studie von Mellinghoff *et al.*, in der sowohl Erlotinib als auch Gefitinib als Monotherapie eingesetzt wurden, zeigte auf, dass Patienten mit funktionalem PTEN und EGFRvIII-Expression besser auf die Therapie ansprachen, als Patienten, die diesen Genotyp nicht aufwiesen [39]. In der Studie von Brown *et al.* wurde Erlotinib mit Strahlen- und Chemotherapie kombiniert, allerdings konnte hierbei kein Überlebensvorteil für die Patienten beobachtet werden [37]. Chakravarti *et al.* kombinierten Strahlentherapie mit einer Gefitinib-Behandlung und konnten ebenfalls kein Effekt auf das Überleben

feststellen [38]. Darüber hinaus mussten andere klinische Studien aufgrund hoher Toxizitäten abgebrochen werden [51,52].

### 1.3.2.2 Anti-EGFRvIII Therapie

Da die EGFR-Variante EGFRvIII tumorspezifisch ist und nicht im gesunden Gewebe vorkommt, eignet sie sich optimal für eine zielgerichtete tumorspezifische Therapie. Die EGFRvIII-Mutation führt zu einer neuen individuellen Aminosäuresequenz, die nicht im EGFR vorkommt und darüber hinaus immunogen ist. Aus diesem Grund wurde EGFRvIII zum Angriffspunkt der Entwicklung einer Vakzinierungstherapie. Diese relativ neue Strategie sieht den Einsatz von EGFRvIII-Vakzinen vor, welche eine entsprechende Immunantwort im Patienten induzieren sollen. Ein Peptid-basierter Impfstoff (CDX-110, Rindopepimut), der die EGFRvIII-spezifische Aminosäuresequenz enthält, zeigte in drei verschiedenen Phase-II-Studien (ACTIVATE, ACT II und ACT III) anschließend an die Strahlentherapie vielversprechende Ergebnisse. Im Vergleich zu den historischen Kontrollkollektiven waren sowohl progressionsfreies Überleben als auch Gesamtüberleben verlängert, insbesondere bei Patienten bei denen spezifische Antikörper gegen EGFRvIII nachgewiesen werden konnten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde 2014 eine internationale, randomisierte Doppelblind-Phase-III-Studie initiiert, ACT IV, die derzeit Patienten auf mehreren Kontinenten rekrutiert. Erste Ergebnisse werden Mitte 2015 erwartet [53-57].

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass eine multimodale Therapie, die sich auch gegen andere Proteine bzw. Komponenten des Tumors richtet, der vielversprechendste Ansatz zur Behandlung des GBM ist. Ein einzelnes Therapeutikum nur gegen EGFRvIII wird wegen der intratumoralen Heterogenität vermutlich nicht zu einem langfristigen Erfolg führen, da selbst wenn EGFRvIII-exprimierende Zellen vollständig inaktiviert bzw. beseitigt werden, EGFRvIII negative Tumorzellen zu einem Rezidiv führen können [58].

## 1.4 Der EGF-Rezeptor

### 1.4.1 Die Erb-B-Familie

Der EGFR gehört zur Familie der Erb-Rezeptoren, die neben EGFR (Erb-B1), die Rezeptoren HER2/neu (Erb-B2), HER3 (Erb-B3) und HER4 (Erb-B4) umfasst.

Alle Erb-B-Rezeptoren sind membranständige Rezeptortyrosinkinasen bestehend aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne sowie einer cytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne. Nach Ligandenbindung dimerisieren die Rezeptoren, was die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne zur Folge hat und damit zur Aktivierung des Rezeptors führt [59]. Hierbei können sowohl Homo- als auch Heterodimere, d.h. Komplexe zwischen gleichen und verschiedenen Erb-Rezeptoren ausgebildet werden. Die Familie der Erb-Rezeptoren regulieren vor allem das Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellmigration.

### 1.4.2 Der EGF-Rezeptor und EGFR-abhängige Signalwege

Der EGFR ist eine 170 kDa große Tyrosinkinase, die nach umfangreicher terminaler Glykosylierung als Transmembranrezeptor in die Zellmembran eingebaut wird [59,60]. Das EGFR-Gen ist auf Chromosom 7p12.3-12.1 lokalisiert, und besteht aus 28 Exons.

In der carboxyterminalen Domäne befinden sich die Tyrosinreste, die nach Ligandenbindung und Dimersierung des Rezeptors phosphoryliert werden (u.a. Tyr992, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1101, Tyr1148 und Tyr1173). Zu den Liganden, die an den EGFR binden gehören u.a. EGF (*epidermal growth factor*), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor alpha*), Amphiregulin sowie HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*).

Im inaktiven Zustand liegt der Rezeptor als Monomer vor und wird durch Ligandenbindung aktiviert, welche eine Konformationsänderung induziert. Infolgedessen kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der entsprechenden Tyrosinreste im carboxyterminalen Bereich des EGFR. Die Phosphotyrosinreste dienen nun als Bindungsstellen verschiedener Signal- und Adapterproteine, die unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren. Zu den bekanntesten Signalwegen, die im Zuge der EGFR-Stimulation aktiviert werden, gehören der MAPK- (*mitogen activated kinase*), der PI3K(*phosphoinositid-3-kinase*)/AKT- sowie der STAT- (*signal transduces and activators of transcription*) Signalweg. Eine Stimulation dieser Signalwege kann zu einer direkten Phosphorylierung bestimmter Effektorproteine führen oder auch eine veränderte

Genexpression durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Folge haben [59-61]. Hierdurch können eine erhöhte Proliferation, Migration und Invasion induziert werden. Darüber hinaus reguliert der EGFR-Signalweg auch die Reparatur von DNA-Schäden [62,63]. Um das EGFR *signaling* abzuschalten wird der EGFR internalisiert und anschließend degradiert oder recycelt [64].

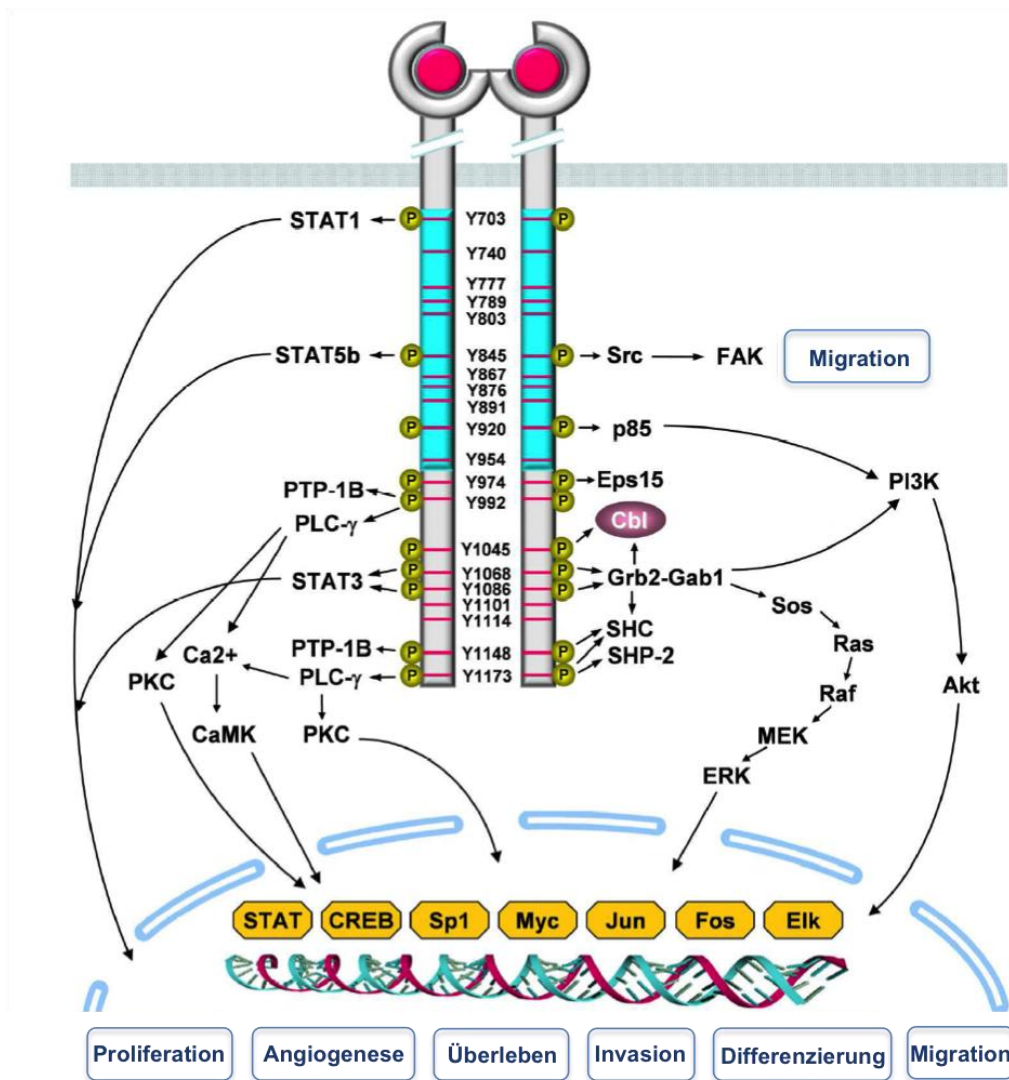


Abb. 1.2: Der EGFR-Signalweg. Dargestellt sind potentielle Tyrosinphosphorylierungsstellen im zytosolischen Teil des EGFR, mögliche Adapterproteine sowie EGF-vermittelte Signalkaskaden. Modifiziert nach Huang und Chang [65].

### 1.4.2.1 Der MAPK-Signalweg

Der Signalweg der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehört zu den bedeutendsten zellulären Signalwegen, die vom EGFR reguliert werden. Der MAPK-Signalweg ist in vielen Tumoren fehlreguliert, was zum Teil auf einer Überexpression spezifischer Signalproteine oder auch auf einer dauerhaften Aktivierung bestimmter Effektorproteine basieren kann. Aus diesem Grund spielt er eine wichtige Rolle für die Tumorigenese und für die Tumorthherapie [65,66]. Abhängig von der Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste des EGFR werden unterschiedliche Signalwege reguliert. Die durch EGF induzierte Aktivierung des MAPK-Signalwegs wird u.a. durch die Phosphorylierung von Tyr1048, Tyr1068, Tyr1086 sowie Tyr1173 vermittelt. Es kommt zur Bindung von Shc an den phosphorylierten Rezeptor, was wiederum die Rekrutierung von Grb2 zur Folge hat [67]. Schließlich kommt es zur Bindung des G-Proteins Ras, welches die Translokation von Raf an die Zellemembran vermittelt. Aktiviertes Raf phosphoryliert schließlich MEK1/2, was letztlich in einer Aktivierung von ERK1/2 resultiert [68]. Die ERK1/2-Kinasen phosphorylieren ihrerseits eine Reihe von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen, zu denen u.a. die Transkriptionsfaktoren c-Fos und Elk-1 gehören. Infolgedessen werden zahlreiche Gene transkribiert, die an der Regulation von Zellzyklus, Apoptose und Proliferation beteiligt sind [69].

### 1.4.2.2 Der PI3K/AKT-Signalweg

Ein weiterer wichtiger Signalweg, der durch die Stimulation des EGFR aktiviert werden kann und im primären GBM häufig fehlreguliert vorliegt, ist der PI3K/AKT-Signalweg. Hierbei nimmt das Enzym PI3K eine entscheidende Rolle ein. Es wird über eine vorausgegangene Phosphorylierung des EGFR durch das Adaptorprotein Src aktiviert und wandelt anschließend  $PI(4,5)P_2$  (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*) in  $PI(3,4,5)P_3$  (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) um, einen sekundären Botenstoff, welcher im Folgenden das Protein AKT (Synonym: Proteinkinase B, PKB) phosphoryliert. Dieses phosphoryliert und inaktiviert infolgedessen die pro-apoptotischen Proteine Bad (*Bcl-2-associated death promoter*), Bim (*bcl-2 interacting mediator of cell death*) und Bax (*Bcl-2-associated X protein*) [70,71]. Ein Negativregulator des PI3K/AKT-Signalwegs ist die Phosphatase PTEN, welches  $PI(3,4,5)P_3$  zu  $PI(4,5)P_2$  dephosphoryliert und somit der Aktivierung entgegenwirkt. Dieses Protein ist in ca. 30% aller primären GBM mutiert bzw. deletiert, wodurch eine verstärkte Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs resultieren kann [2,72,73].

### 1.4.3 Die EGFR-Deletionsmutante EGFRvIII

Die EGFR-Deletionsmutante EGFRvIII entsteht durch eine Deletion der Exons 2-7 (267 Aminosäuren) des EGFR-Gens, und weist ein Molekulargewicht von ca. 145 kDa auf [10]. Durch die Deletion fehlt ein Teil der Ligandenbindungsdomäne im extrazellulären Teil des Rezeptors, wodurch keine Liganden mehr an den EGFRvIII binden können und somit auch keine ligandenabhängige Aktivierung mehr möglich ist. Der EGFRvIII liegt konstitutiv aktiviert, d.h. dauerhaft phosphoryliert vor [74]. Bisher ist noch nicht abschließend geklärt, worauf die konstitutive Aktivierung von EGFRvIII zurückzuführen ist. Es gibt jedoch Studien, die darauf hinweisen, dass EGFRvIII im Gegensatz zu EGFR kontinuierlich dimerisiert vorliegt. Durch Änderungen in der Konformation des Rezeptors, die durch die Deletion der extrazellulären Domäne zustande kommen, wird der EGFRvIII zudem nur verzögert internalisiert und degradiert. EGFRvIII-Homodimere weisen eine ähnliche Tyrosinkinaseaktivität wie der Wildtyp EGFR auf. Darüber hinaus können auch Heterodimere zwischen dem EGFR und dem EGFRvIII ausgebildet werden. Das EGFRvIII-Gen liegt im Allgemeinen mit dem EGFR-Gen ko-amplifiziert vor, weshalb in der Regel beide Rezeptoren auch ko-exprimiert werden [75,76].

Es wird vermutet, dass die EGFRvIII-Mutation als sekundäres Ereignis im Zuge der EGFR-Genamplifikation entsteht, da eine EGFRvIII-Expression in der Regel nur in EGFR-amplifizierten Zellen detektiert werden kann [77]. Das amplifizierte EGFR-Gen selber kann hierbei in Form von extrachromosomaler DNA vorliegen, die als sogenannte *double minute chromosomes* oder Amplikons bezeichnet wird. Es handelt sich dabei um zirkuläre DNA-Abschnitte, die eine oder mehrere Kopie des EGFR-Gens umfassen und die vermutlich durch einen post-replikativen fehlgesteuerten Prozess der DNA-Reparatur entstehen. Die Größe dieser Amplikons variiert zwischen einigen hundert Kilobasen und mehreren Megabasen, wobei sie innerhalb eines Tumors die gleiche Größe aufweisen und somit vermutlich auf ein Ursprungs-Amplikon zurückzuführen sind. Der Amplifikationslevel innerhalb der Zellen eines Tumors kann sich jedoch stark unterscheiden, so können bis zu 200 Amplikons pro Zelle vorhanden sein [35,78]. Darüber hinaus konnten Lopez-Gines *et al.* zeigen, dass das EGFR-Gen nicht nur in Form von *double minute chromosomes* amplifiziert vorliegen kann, sondern in 28% der untersuchten GBM zusätzliche Kopien des EGFR-Gens an verschiedenen Loci des Chromosoms 7 lokalisiert waren [79]. Es gibt auch Hinweise darauf, dass Zellen ohne EGFR-Genamplifikation eine EGFRvIII-Expression aufweisen, was auf einem horizontalen Gentransfer beruht. So können EGFRvIII-exprimierende Zellen den EGFRvIII in das extrazelluläre Milieu



sekretieren. Dies geschieht über Mikrovesikel, die von diesen Tumorzellen sezerniert werden, welche den EGFRvIII in Lipid-Raft geclustert haben und mit anderen Zellen fusionieren können. Diese horizontale Weitergabe von EGFRvIII könnte erklären, dass in einigen Patientenproben eine EGFRvIII-Expression auch ohne EGFR-Amplifikation detektiert werden konnte [80,81]. Sowohl beim Wildtyp EGFR als auch dem EGFRvIII spielt die Aktivierung des PI3K-AKT- und des MAPK-Signalweges in der Tumorigenese und Pathophysiologie eine zentrale Rolle [82]. Die verstärkte Aktivierung von AKT kann u.a. die Lokalisation und transkriptionelle Aktivität von  $\beta$ -Catenin beeinflussen, was eine erhöhte Invasion der Tumorzellen zur Folge haben kann [83]. Des Weiteren wird über diesen Signalweg auch das anti-apoptotische Protein Bcl-xL verstärkt exprimiert, wodurch die erhöhte Radio- und Chemoresistenz von GBM erklärt werden kann [84,85]. Obwohl diese pathophysiologischen Vorgänge sowohl vom Wildtyp EGFR als auch von EGFRvIII induziert werden können, zeigte sich in EGFRvIII-exprimierenden Zellen vor allem eine deutliche Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges sowie eine verstärkte Aktivierung des JAK2/STAT3-Signalweges, welcher die Migration und Invasion EGFRvIII-exprimierender Zellen reguliert. Darüber hinaus wurde außerdem eine deutliche Kreuz-Aktivierung zwischen dem EGFRvIII und der Rezeptortyrosinkinase c-Met beobachtet. Es zeigte sich, dass der EGFRvIII die Expression des c-Met-Liganden HGF (*hepatocyte growth factor*) induziert, was in einer verstärkten c-Met-Aktivierung resultiert [86].

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der eine entscheidende Rolle für die Strahlentherapie spielen könnte, ist die Beobachtung, dass eine EGFRvIII-Expression zu einer gesteigerten DNA-Reparatur und somit zu einem besseren Überleben von EGFRvIII-positiven Zellen nach Bestrahlung führt. So konnten Golding *et al.*, beobachten dass EGFRvIII-exprimierende U87MG-Zellen im Vergleich zu EGFRvIII-negativen Zellen nach Bestrahlung weniger residuelle DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) aufwiesen. Diese DSB korrelieren mit dem zellulären Überleben nach Bestrahlung. Darüber hinaus zeigten EGFRvIII-exprimierende Zellen eine erhöhte Kapazität der Nicht-homologen Endverknüpfung (*non-homologous endjoining*, NHEJ) [87]. Das NHEJ ist der zentrale Reparaturweg, der am häufigsten für die Reparatur von DSB verwendet wird, da er in jeder Zellzyklusphase zur Verfügung steht (s. Abschnitt 1.5.3.1).

Eine weitere Studie zeigte auf, dass EGFRvIII-transfizierte U87MG-Zellen ein erhöhtes Zellüberleben im Koloniebildungstest nach Bestrahlung aufwiesen. Des Weiteren zeigten EGFRvIII-exprimierende Tumoren im orthotopischen Xenograft-Mausmodell eine erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit und eine gesteigerte Radioresistenz. Letztere wurde

auf eine EGFRvIII-abhängige verstärkte Aktivierung der DNA-PKcs zurückgeführt, welche das Schlüsselenzym des NHEJ ist [40].

Obwohl die prä-klinischen Studien andeuten, dass eine EGFRvIII-Expression zu einer erhöhten Radioresistenz führen kann, konnte bisher in klinischen Studien nicht eindeutig geklärt werden, ob EGFRvIII ein negativer prognostischer Marker beim GBM ist. Während die im Jahr 2003 veröffentlichte Studie von Shinojima *et al.* EGFR Amplifikation sowie eine EGFRvIII Expression mit einem schlechteren Überleben von GBM-Patienten, die mit Strahlen- und Chemotherapie behandelt wurden, in Verbindung brachte, war die EGFRvIII-Expression in einer Studie von Montano *et al.* sogar mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert [36,58]. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Studien, die keine prognostische Relevanz von EGFRvIII für das Überleben von GBM-Patienten, die nach jetzigem Standard therapiert wurden, feststellen konnten [9,27,88]. Jedoch deutet sich an, dass die gleichzeitige Analyse des EGFRvIII zusammen mit anderen Markerproteinen prognostisch relevant sein könnte [88].

## 1.5 DNA-Schädigung und DNA-Reparatur

Zellen sind permanent endogenen und exogenen Einflüssen ausgesetzt, die zu einer Schädigung der DNA führen können. Hierbei ist die wichtigste Aufgabe für die Zelle ihre genomische Integrität zu wahren. Die entstehenden DNA-Schäden können die Veränderung einzelner Basen betreffen (z.B. Methylierungen, Alkylierungen, Oxygenierungen) oder zur Induktion von Einzelstrangbrüchen oder DSB führen. Hierbei stellen DSB die Zelle vor eine besondere Herausforderung, da beide DNA-Stränge geschädigt werden und die exakte Erbinformation verloren geht. Nichtsdestotrotz können unreparierte oder falsch reparierte DNA-Schäden potentiell mutagen sein, so dass als Folge Erbkrankheiten oder Tumoren entstehen können. Exogene DNA-Schäden können z.B. durch UV- oder ionisierende Röntgenstrahlung (IR) sowie durch chemische Substanzen wie Chemotherapeutika (z.B. TMZ) induziert werden [89]. Im den folgenden Abschnitten soll näher auf die Wirkungsweise von IR und TMZ eingegangen werden, da beides für die Standardtherapie des GBM verwendet wird.

### 1.5.1 Wirkungsweise von Strahlung

Das primäre Ziel der Strahlentherapie ist die vollständige Inaktivierung von Tumorzellen. Um eine Heilung des Patienten zu erreichen, muss somit jede Tumorzelle abgetötet werden. Die hierfür erforderliche Dosis wird allerdings durch das Auftreten von Normalgewebsschäden limitiert, da mit steigender Dosis auch die Wahrscheinlichkeit von akuten und späten Nebenwirkungen ansteigen kann. Nebenwirkungen, die nach Bestrahlung des Kopfes auftreten können, sind beispielsweise Kopfschmerzen, Haarausfall, Müdigkeit und Vergesslichkeit [90].

Ionisierende Strahlung wie die Röntgenstrahlung führt zu einer Vielzahl verschiedener DNA-Schäden, die zu Mutationen oder zur Inaktivierung der Zelle führen können. Die eigentliche Schädigung der DNA erfolgt durch strahlungsinduzierte Radikale, die durch Radiolyse des Wassers entstehen und schließlich die DNA angreifen. So treten bereits nach einer Dosis von 1 Gy ca. 2000 Basenschäden, ca. 1000 Einzelstrangbrüche, ca. 150 DNA-DNA- sowie DNA-Proteinquervernetzungen und ca. 20-40 DSB auf [80]. Die Kapazität der Zellen diese strahlungsinduzierten DNA-Schäden zu reparieren, bestimmt im Wesentlichen die zelluläre Strahlenempfindlichkeit und somit auch das Ansprechen auf die Strahlentherapie [91].

Basenschäden sowie Einzelstrangbrüche werden in der Regel durch die Basenexzisionsreparatur (BER) repariert, wobei die DNA des 2. DNA-Stranges als Matrize fungiert, so dass die DNA fehlerfrei repariert werden kann. DSB können hingegen nicht so einfach repariert werden, da beide DNA-Stränge beschädigt sind und keine Matrize mehr vorliegt. Werden DSB nicht oder falsch repariert, können sie zu letalen Chromosomenabberationen führen. Infolgedessen sind die Zellen nicht mehr in der Lage, das Genom angemessen auf die Tochterzellen aufzuteilen. Hierdurch geht genetische Information verloren, wodurch essentielle Proteine nicht mehr richtig codiert werden und die Zelle inaktiviert wird. Basierend darauf welche Information und wie viele Proteine hierbei betroffen sind, tritt ein vollständiger Verlust der Teilungsfähigkeit erst nach 3-4 Zellteilungen auf. Dieser Mechanismus der vollkommenen Zellinaktivierung nach erfolgter Mitose, wird als mitotische Katastrophe bezeichnet. Daneben können auch die Apoptose und ein permanenter Zellzyklusarrest zur Zellinaktivierung nach Bestrahlung führen, jedoch spielen diese Prozesse gerade in soliden Tumoren eine eher untergeordnete Rolle [90].

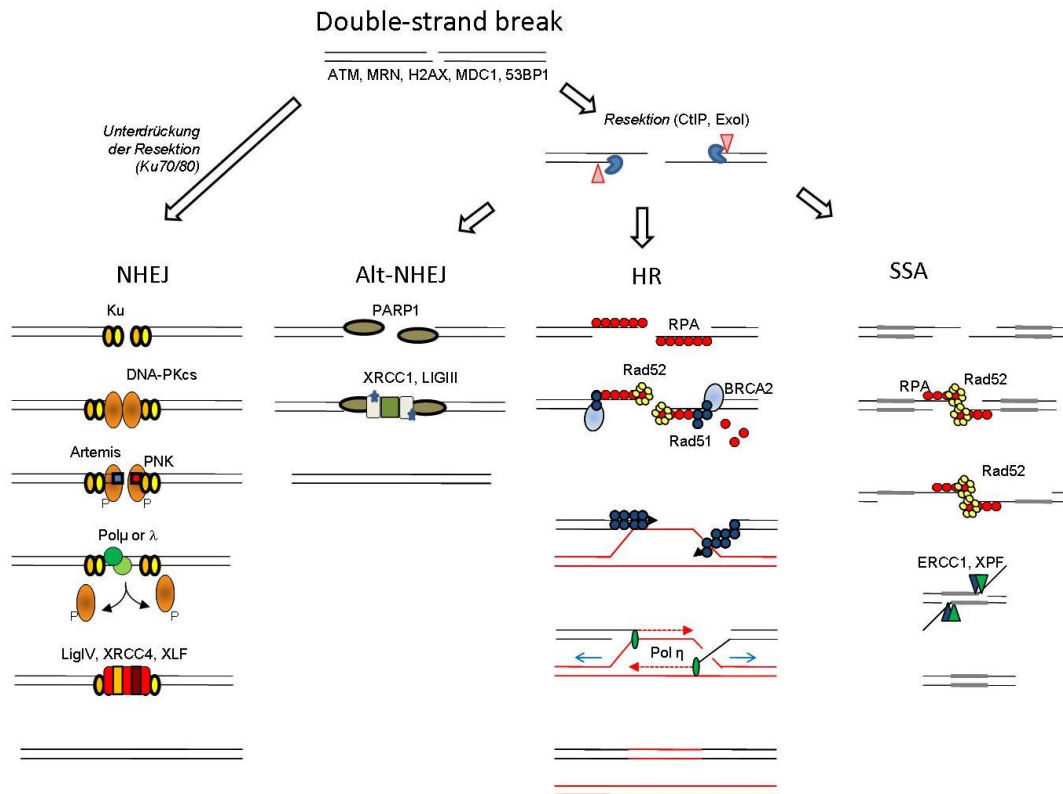
### 1.5.2 Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Kommt es zur Induktion von DSB verfügen Zellen über effektive Mechanismen diese zu erkennen und zu reparieren. Zunächst werden die Enden von DNA-DSB vom MRN-Komplex, der aus Mre11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 (*DNA repair protein 50*) und NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*) besteht, erkannt und gebunden [92,93]. Hierauf folgt die Rekrutierung der Kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), welche in der Regel als Dimer vorliegt und nun durch Autophosphorylierung am Serin 1981 aktiviert wird. Die ATM-Dimere zerfallen daraufhin zu aktiven Monomeren, welche u.a. das Histon H2AX (Ser139,  $\gamma$ H2AX) phosphorylieren. H2AX ist gleichmäßig über das Chromatin verteilt und kann während des gesamten Zellzyklus phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von H2AX erfolgt nicht nur direkt am DSB sondern bis zu Megabasenpaare entfernt um den Bruch herum. Neben ATM, können auch die Kinasen ATR (*ATM- and Rad3-related*) und DNA-PK (*DNA dependent kinase*) können H2AX phosphorylieren. ATR wird durch einzelsträngige DNA, die mit RPA (*replication protein A*) beladen ist, aktiviert. Solche Bereiche entstehen nach der Resektion von DSB oder während Replikationsstress (siehe Abschnitt 1.6) [94-97].  $\gamma$ H2AX dient im Folgenden als Ausgangspunkt für die Aktivierung und Rekrutierung verschiedener Reparatur- sowie Zellzyklusproteine. Hierzu gehören u.a. 53BP1 (*p53 binding protein*) sowie MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*). 53BP1 bindet dabei an ubiquitinyliertes H2AX, um weitere Reparaturfaktoren zu rekrutieren. MDC1 bindet hingegen direkt an das phosphorylierte Serin des H2AX, an ATM sowie an NBS1 und sorgt auf diese Weise für eine verstärkte Akkumulation von ATM am DSB. Darüber hinaus sorgt MDC1 für die Aktivierung von Reparaturfaktoren sowie für die Induktion eines Zellzyklusarrests. DNA-Bereiche, die durch  $\gamma$ H2AX oder 53BP1 markiert werden, können durch Antikörper markiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert werden. Dies wird zur Analyse von DSB in Zellen herangezogen (s. Abschnitt 3.2.2) [98-101]. Auf diese Weise ist es möglich die DNA-Reparaturkapazität von Zellen nach Schädigung durch Bestrahlung oder Chemotherapeutika zu bestimmen. In den folgenden Abschnitten soll Näher auf die DSB-Reparatur eingegangen werden (s. Abschnitt 1.5.3) [102,103]

### 1.5.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Für die Reparatur von DSB verfügen humane Zellen über verschiedene Reparaturwege. Der Reparaturweg, der am häufigsten für die Reparatur von DSB verwendet wird, da er in jeder Zellzyklusphase zur Verfügung steht, ist das NHEJ. Hierbei werden die freien Enden des Bruches miteinander verknüpft ohne dass eine Homologie benötigt wird (s. Abschnitt 1.5.3.1). In der S- und der G2-Phase können DSB auch über die Homologe Rekombination (HR) repariert werden (s. Abschnitt 1.5.3.2). Ein weiterer DNA-Reparaturmechanismus, der ebenfalls in allen Zellzyklusphasen erfolgen kann, ist das *Single Strand Annealing* (SA). Wie bei der HR entstehen hierbei zunächst Einzelstränge mit 3'-Überhängen, so dass ebenfalls homologe Sequenzen zur Verknüpfung der Einzelstränge verwendet werden können. Beim SA werden jedoch homologe Bereiche innerhalb des geschädigten Stranges gesucht. Bei diesem Prozess wird die DNA eines Teils der DNA-Doppelhelix so lange abgebaut (Resektion), bis die beiden gegenüberliegenden Einzelstränge homologe Bereiche aufweisen und somit aneinander binden können. Die Folge des DNA-Abbaus ist ein großer Verlust von genetischer Information, weshalb in der Regel nur wenige Brüche auf diese Weise repariert werden. Wird ein DSB reseziert und steht das klassische NHEJ nicht zur Verfügung, können DSB darüber hinaus auch über das PARP1 vermittelte alternative NHEJ (Alt-NHEJ) repariert werden [104-106].

Für die vorliegende Arbeit ist von besonderer Bedeutung, dass DSB, die durch Replikationsprozesse entstehen, im Allgemeinen durch HR repariert werden. Bei diesen Brüchen fehlt das zweite Bruchende zur Durchführung des NHEJ, weshalb sie als einendige DSB bezeichnet werden [107]. Die verschiedenen Reparaturwege sind in Abb. 1.3 zusammengefasst.



**Abbildung 1.3: Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.** Nach Induktion eines DSB wird die DNA-Reparatur entweder durch das NHEJ oder nach einer CtIP bzw. ExoI-abhängigen Resektion mittels Alt-NHEJ, HR oder dem SSA repariert [90].

### 1.5.3.1 Nicht-homologe Endverknüpfung

Das NHEJ ist ein relativ einfacher Reparaturweg der vor allem glatte DSB-Enden bzw. Enden mit kurzen ssDNA-Bereichen ligiert und hierfür keine Sequenzvorlage benötigt. Etwa 80% aller DSB werden mit Hilfe des NHEJ repariert. Da es ohne Schwesterchromatid auskommt, ist es in allen Zellzyklusphasen aktiv und spielt aber vor allem in der G1- und der frühen S-Phase eine entscheidende Rolle. Das NHEJ wird durch die Bindung des Heterodimers Ku70/Ku80 an jeweils eines der DSB-Enden eingeleitet. Hierdurch werden die DSB-Enden geschützt und eine Degradation der DNA verhindert. Daraufhin wird die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) zum DSB rekrutiert und bildet mit Ku70 und Ku80 den vollständigen DNA-PK-Proteinkomplex. Dieser Komplex bindet so an die beiden Bruch-Enden, dass diese in räumlicher Nähe gehalten werden. Nun erfolgt die Autophosphorylierung des DNA-PK-Komplexes und eine weitere Phosphorylierung durch ATM, woraus eine Konformationsänderung resultiert und die DSB-Enden für die Ligation freigegeben werden. Falls nötig können die DSB-Enden durch Artemis prozessiert werden. Die Ligation erfolgt durch einen Proteinkomplex, der aus DNA-Ligase IV, XRCC4 (*X-ray repair cross-Complementing*) und

XLF (*XRCC4-like factor*) besteht (s. Abb. 1.2). Da es durch die Prozessierung der DSB-Enden zum Verlust von Nukleotiden kommen kann, gilt das NHEJ als potentiell fehlerbehafteter (*error-prone*) Reparaturweg [93,108].

### 1.5.3.2 Homologe Rekombination

Liegt während der späten S- und G2-Phase ein zum geschädigten Chromatid homologes Schwesterchromatid vor, können die Zellen zur DSB-Reparatur auch die HR verwenden. Hierbei dient das Schwesterchromatid als Matrize um den DSB fehlerfrei zu reparieren. Die HR wird in die drei Schritte Präsynapsis, Synapsis sowie Postsynapsis unterteilt, wobei in der Präsynapsis die DNA prozessiert und ssDNA entsteht. Während der Synapsis findet die Homologiesuche im Schwesterchromatid, die Stranginvasion sowie die D-Loop Ausbildung statt. Im Anschluss folgen in der Postsynapsis die DNA-Synthese des fehlenden DNA-Abschnitts und die Trennung der Schwesterchromatiden (s. Abb. 1.3). In der Präsynapsis wird der DSB vom MRN-Komplex erkannt, gebunden und stabilisiert [109,110]. Anschließend erfolgt die Resektion der DSB-Enden durch Mre11 (*meiotic recombination 11*), CtIP, BLM und ExoI (*exonuclease I*), wodurch ssDNA-Abschnitte entstehen. RPA (*replication protein A*) bindet an ssDNA, um sie vor dem Abbau durch Nukleasen sowie der Ausbildung von Sekundärstrukturen zu schützen. Nun erfolgt die Beladung der ssDNA mit Rad51. Dieser Prozess wird durch BRCA2 (*breast cancer early onset 2*) vermittelt und hat zur Folge, dass RPA von der DNA verdrängt wird. Rad51 bildet mit der DNA ein Nukleoproteinfilament, wobei hier auch weitere Proteine wie z.B. Rad52 und BRAC1 (*breast cancer early onset 1*) beteiligt sind. In der darauffolgenden Synapsis führt das Rad51-Nukleoproteinfilament die Homologiesuche sowie die Stranginvasion in dem unbeschädigten homologen Schwesternchromatid durch. Sobald eine homologe Sequenz gefunden wurde, wird ein so genannter D-Loop durch Rad51 und Rad54 ausgebildet. Anschließend induziert Rad54 die Entladung des Rad51 in den eingewanderten ssDNA-Bereichen, so dass die DNA-Synthese induziert werden kann. Während der Postsynapsis wird nun RFC (*replication factor c*) an den verdrängten Strang des D-Loops rekrutiert, welches PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) auf den als Template genutzten DNA-Strang lädt. Letztendlich wird DNA-Polymerase  $\delta$  rekrutiert, die gemeinsam mit der Helikase Pif1 die fehlenden DNA-Abschnitte synthetisiert. Bei der Ligation der DNA-Stränge kommt es zur Ausbildung einer so genannten *Holiday-Junction*, die auf zwei verschiedene Arten aufgelöst werden kann, wodurch es auch zu einem Schwesterchromatidaustausch kommen kann [109].

#### 1.5.4 Wirkungsweise von Temozolomid

Temozolomid (TMZ) ist ein Vertreter der monofunktionellen Chemotherapeutika und wird seit 2005 bei der Behandlung vom Glioblastom als Standard-Chemotherapeutikum eingesetzt [30]. Die Wirkung von TMZ beruht auf einer DNA-Alkylierung, in deren Folge DSB entstehen können, die wiederum zur Zelinaktivierung führen können. Es bildet durch spontane Hydrolyse bei physiologischem pH-Wert den aktiven Metabolit 5-(3-methyltriazin-1-yl)imidazol-4-carboxamid (MTIC), welcher direkt die DNA alkyliert. Beim TMZ handelt es sich um ein sehr kleines Molekül, welches aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Somit werden auch diffus infiltrierende Tumorzellen erreicht, die sich in Regionen mit intakter Blut-Hirn-Schranke befinden. Im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika wie beispielsweise Cisplatin treten unter der TMZ-Behandlung relativ wenig Nebenwirkungen auf [18,111,112].

TMZ induziert die Alkylierung verschiedener DNA-Basen, so entstehen unter anderem N7-Methylguanin (N7-meG), N3-Methyladenin (N3-meA), N3-Methylguanin (N3-meG), N1-Methyladenin (N1-meA), N3-Methylcytosin (N3-meC), N3-Methylthymidin (N3-meT), N1-Methylguanin (N1-meG) und O<sup>6</sup>Methylguanin (O<sup>6</sup>-meG). Dabei handelt es sich bei O<sup>6</sup>-meG um die cytotoxische Läsion (s. Tab. 1.1). Die Läsionen N1-meA, N3-meC, N3-meT sowie N1-meG werden in der Regel durch die Reparaturproteine ABH2 und ABH3 rasch repariert. Die methylierten Basen N7-meG, N3-meA und N3-meG werden hingegen durch BER erkannt und behoben. Hierbei erfolgt zunächst die Prozessierung der alkylierten Basen durch die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) oder durch die Alkylpurin-DNA-N-Glykosylase (APNG). Anschließend schneidet die AP-Endonuklease (APE) das Phosphodiester-Rückgrat, so dass anschließend die fehlenden Nukleotide durch die DNA-Polymerase aufgefüllt werden können. Die Läsionen O<sup>6</sup>-meG und O<sup>4</sup>-meT sind Substrate für das Enzym MGMT, welches die Methylierungen bindet, entfernt und sich dadurch selbst inaktiviert (Suizidenzym). Wird MGMT nicht exprimiert und die Methylierung von O<sup>6</sup>-meG Folge nicht entfernt, wird es durch die *Mismatch* Reparatur (MMR) erkannt und prozessiert. Dies kann jedoch zu Mutationen und über die Induktion von Replikations-assoziierten DSB zum Zelltod führen, was im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird (s. Abschnitt 1.5.4.1) [111-114].



**Tab. 1.1: TMZ-abhängige Basenveränderungen** (verändert nach [111])

	Prozent	Biologischer Effekt	Inhibierte Interaktion	Reparatur
<b>Hauptaddukte</b>				
7-meG	70	ungefährlich	-	BER
3-meA	10	zytotoxisch	Kontakt zur Polymerase	BER
O <sup>6</sup> -meG	5-7	zytotoxisch	Basenpaarung	MGMT, MMR
1-meA	2,8	zytotoxisch	Kontakt zur Polymerase	ABH2/ABH3
3-meC	2,3	zytotoxisch	Kontakt zur Polymerase	ABH2/ABH3
<b>Nebenaddukte</b>				
7-meA	1,7	ungefährlich	-	BER
3-meG	0,8	zytotoxisch	Kontakt zur Polymerase	BER
O <sup>4</sup> -meT	0,4	zytotoxisch	Basenpaarung	MGMT, MMR
1-meG	<<1	zytotoxisch	Kontakt zur Polymerase	ABH2/ABH3; BER
3-meT	<<1	zytotoxisch	Kontakt zur Polymerase	ABH2/ABH3
O <sup>2</sup> -meC	<<1	zytotoxisch	Basenpaarung	?
O <sup>2</sup> -meT	<<1	zytotoxisch	Kontakt zur Polymerase	?

ABH2/ABH3: *alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 2/3*

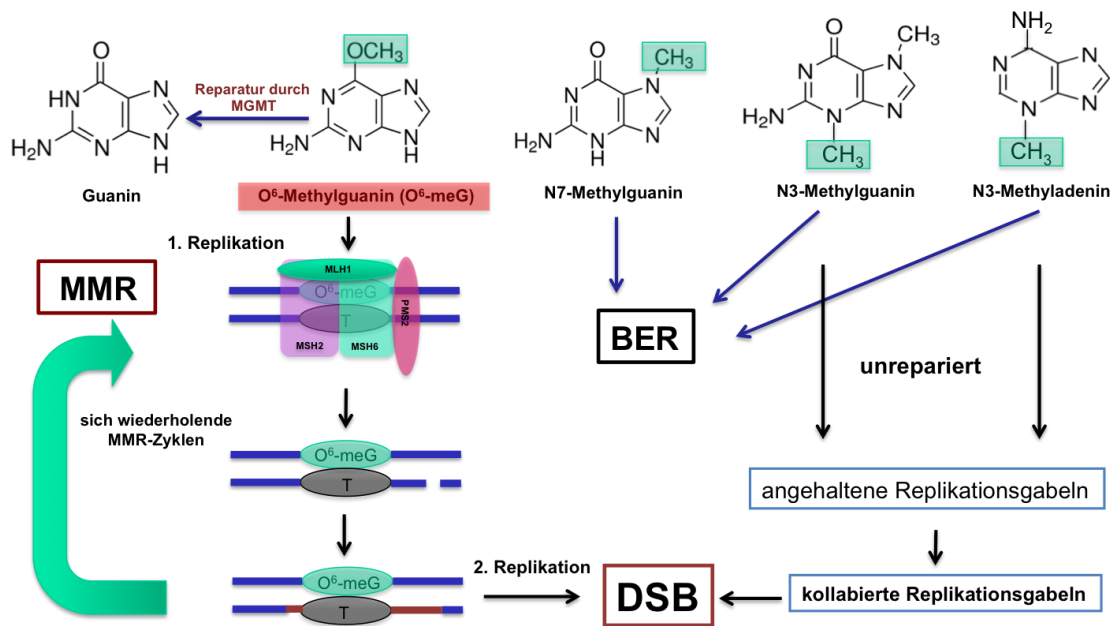
#### 1.5.4.1 *Mismatch* Reparatur vermittelte Prozessierung von O<sup>6</sup>-Methylguanin

TMZ induziert u.a. die Bildung von O<sup>6</sup>-meG. Obwohl dieser Schaden eher selten auftritt (s. Tab. 1.1), kann er jedoch in Abwesenheit von MGMT sehr zytotoxisch sein. Wird O<sup>6</sup>-meG nicht durch MGMT repariert, bleibt diese Läsion Bestandteil der DNA. Dieser Schaden ist prä-mutagen und prä-toxisch und führt nicht direkt zu einer Mutation oder zur Induktion von Apoptose. Erst durch die DNA-Replikation und die Prozessierung durch die MMR, wird aus dem Schaden entweder eine Mutation oder ein lethales Ereignis. Die Entstehung einer Punktmutation beruht darauf, dass O<sup>6</sup>-meG nur noch zwei und nicht mehr drei Wasserstoffbrückenbindungen zu seiner komplementären Base ausbilden kann. Somit kann während der ersten Replikationsrunde gegenüber von O<sup>6</sup>-meG ein Thymin anstelle eines Cytosins eingebaut werden. Diese Fehlpaarung passiert anschließend die zweite Replikationsrunde, wo nun Adenin gegenüber des Thymins eingebaut wird, so dass auf einem der beiden Stränge eine Punktmutation entsteht, während dem O<sup>6</sup>-meG wieder ein Thymin zugeordnet werden kann [32,111,112].

Die MMR kann solch einen Einbau von falschen Nukleotiden in die DNA verhindern und dient somit als Kontroll- und Reparatursystem gegen Basenfehlpaarungen, die während der Replikation entstehen. Zum Beispiel werden UV-induzierte *Intrastrand Crosslinks* sowie 8-

Oxoguanin, welches u.a. im Zuge von oxidativem Stress entsteht von dem MMR-System erkannt und prozessiert [115].

Im Falle des O<sup>6</sup>-meG wird während der ersten Replikationsrunde gegenüber dem O<sup>6</sup>-meG entweder Cytosin oder Thymin eingebaut. Der MutS $\alpha$ -Komplex, der aus den Proteinen MSH2 und MSH6 besteht, erkennt zunächst O<sup>6</sup>-meG unabhängig davon, ob als komplementäre Base Cytosin oder Thymin während der Replikation eingebaut wurde. Jedoch wird die Paarung O<sup>6</sup>-meG-Cytosin schwächer vom MutS $\alpha$ -Komplex gebunden als O<sup>6</sup>-meG-Thymin. Das MMR-System prozessiert nun lediglich die Base auf dem neu synthetisierten Tochterstrang, d.h. dass O<sup>6</sup>-meG weiterhin in der DNA bestehen bleibt. MutS $\alpha$  rekrutiert nun MutS $\beta$ -Komplex bestehend aus den Proteinen MLH1 und PMS2. Diese vermitteln wiederum die Exzision der DNA durch die Exonuklease I, wobei bis zu 200 Nukleotide auf dem Tochterstrang entfernt werden. Da diese einzelsträngigen Lücken, auch über die Mitose hinweg bestehen bleiben können, führen sie in der zweiten Replikationsrunde zu DSB. Die DSB haben wiederum einen G2-Arrest, den mitotischen Zelltod oder Apoptose zur Folge [112,116]. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass nach Entfernen der Nukleotide auf dem Tochterstrang die Neusynthese der fehlenden DNA-Sequenz durch die Polymerase erfolgt. Da jedoch O<sup>6</sup>-meG nicht prozessiert wird und in der DNA verbleibt, entstehen auf diese Weise erneut Fehlpaarungen und sich wiederholende MMR-Zyklen (*futile mismatch repair cycles*), welche somit immer wieder zu DSB führen können. Somit wird das Ausmaß der entstehenden DSB nach TMZ-Behandlung von der Anzahl der O<sup>6</sup>-Methylierungen, der MGMT-Expression sowie die Expression bzw. die Aktivität der MMR-Proteine bestimmt [112,117]. Die Reparatur der verschiedenen TMZ-induzierten Schäden sowie der MMR-Zyklus sind in Abb. 1.4 dargestellt.



**Abb. 1.4: Reparatur TMZ-induzierter DNA-Schäden.** Die MMR wird durch die Bindung von MSH2 und MSH6 (MutS $\alpha$ ) an das fehlgepaarte Nucleotid eingeleitet. Das MMR-Systemprozessiert die Base auf dem neu synthetisierten Tochterstrang. MutS $\alpha$  rekrutiert MutS $\beta$  (PMS2 und MLH1), welches die Exzision der DNA durch die Exonuklease I vermittelt. Die bestehenden einzelsträngigen Lücken, führen in einer zweiten Replikationsrunde zu DSB. Nach Entfernen der Nucleotide auf dem Tochterstrang kann jedoch auch die Neusynthese der fehlenden DNA-Sequenz erfolgen. O<sup>6</sup>-meG verbleibt in der DNA, so dass sich wiederholende MMR-Zyklen folgen. Die Basenmodifikationen N7-meG, N3-meG und N3-meA werden in der Regel durch die BER repariert. Verbleiben jedoch N3-meG und N3-meA in der DNA, können sie kollabierte Replikationsgabeln induzieren, in deren Folge Replikations-assoziierte DSB entstehen (modifiziert nach [112]).

## 1.6 Replikationsstress und genomische Instabilität in Tumoren

Eine wesentliche Eigenschaft von Tumorzellen ist ihre genomische Instabilität, die durch chromosomale Veränderungen wie Duplikationen, Amplifikationen, Translokationen oder Deletionen gekennzeichnet ist. Die Mechanismen, die zu solchen Veränderungen führen können, sind vielfältig und können zum Beispiel auf eine fehlerhafte DNA-Reparatur oder auch auf erhöhten Replikationsstress zurückzuführen sein. Replikationsstress wird durch eine verlangsamte Elongation, ein erhöhtes Maß an angehaltenen Replikationsgabeln sowie eine gesteigerte Initiation der Replikation charakterisiert. Replikationsstress kann beispielsweise aufgrund einer Deregulation der Transkription oder auch auf ein erhöhtes Level an ROS (*reactive oxygen species*) zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass EGFRvIII-positive in Vergleich zu EGFRvIII-negativen Zellen mehr ROS aufweisen und damit verbunden DNA-Reparaturproteine vermehrt exprimiert werden, die für die Reparatur ROS-induzierter DNA-Schäden verantwortlich sind [118].

Für die genomische Integrität einer Zelle ist es essentiell, dass trotz auftretender DNA-Schäden in der S-Phase die DNA fehlerfrei repliziert wird. Daher wird die DNA von präzisen DNA-Polymerasen repliziert, die weniger als eine falsche Base pro  $10^5$  Nukleotiden einbauen [119]. Die DNA-Replikation wird an Replikationsursprüngen, so genannten Oris, die über die gesamte DNA verteilt sind, initiiert. Mehrere Replikationsursprünge, die in räumlicher Nähe zueinander liegen und in denen Replikation stattfindet, werden als Replikationsfabriken bezeichnet, wobei jedoch nur 10% der angelegten Replikationsursprünge genutzt werden. Die ruhenden Replikationsursprünge, die als *dormant* (schlafend) bezeichnet werden, dienen im Fall von Replikationsstress bzw. angehaltenen Replikationsgabeln dazu, die DNA-Synthese trotzdem innerhalb der vorgegebenen Zeit zu beenden [120,121]. Hierbei spielt die *Checkpoint*-Kinase Chk1 eine zentrale Rolle, da sie die Aktivierung der schlafenden Replikationsursprünge reguliert. Es wird sichergestellt, dass nur dann ein neuer Replikationsursprung aktiviert wird, wenn eine oder wenige Replikationsgabeln angehalten wurden. Sollten jedoch sehr viele oder alle Replikationsgabeln arretiert werden, wie es z.B. durch eine Hydroxyurea induzierte Depletion des Nukleotidpools der Fall wäre, wird die Aktivierung neuer Replikationsursprünge verhindert. Dies soll die Integrität angehaltener Replikationskomplexe aufrechterhalten [121,122].

Neben Chk1 spielen auch die Serin/Threonin-Kinasen der PI3K-Familie ATM, und ATR eine zentrale Rolle. ATM phosphoryliert eine Vielzahl von Proteinen zu denen u.a. H2AX, p53, Chk1, und Chk2 gehören und welche direkt oder indirekt an der DSB-Reparatur beteiligt sind. Aktiviertes Chk1 kontrolliert u.a. Zellzyklusarrestkontroll-Mechanismen in der S- sowie in der G2-Phase. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Chk1 direkt an der Rekrutierung von Rad51 an das Chromatin beteiligt ist und die Chk1 vermittelte Phosphorylierung von Rad51 für eine effiziente HR und für das zelluläre Überleben nach Replikationsstress wichtig ist [123,124].

ATR ist hingegen primär an der Regulation der Replikation beteiligt und wird in der Regel durch ssDNA aktiviert, die als Folge prozessierter DSB oder an Replikationsgabeln die auf einen DNA-Schaden treffen, entstehen kann [125]. Somit wird ATR auch im Zuge von Replikationsstress aktiviert. Das Protein RPA bindet zunächst an die neu generierte ssDNA, stabilisiert diese und wird anschließend von dem ATR-ATRIP-Komplex erkannt. Hierbei vermittelt ATRIP (*ATR interacting protein*) die Bindung des Komplexes an RPA, so dass RPA aktiviert wird. ATR phosphoryliert wiederum Chk1 am Ser345 und wird daraufhin durch Autophosphorylierung an Ser296 aktiviert [126,127]. Darüber hinaus kann

auch H2AX in Folge von Replikationsstress durch ATR phosphoryliert werden, womit  $\gamma$ H2AX nicht nur ein reiner DSB-Marker ist.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Beim primären GBM spielt der EGFR eine zentrale Rolle, da er in ca. 40-50% aller GBM-Patienten aufgrund einer Genamplifikation überexprimiert wird. Darüber hinaus wird in 25-30% der GBM-Patienten die EGFR-Deletionsmutante EGFRvIII exprimiert, welche durch ihre konstitutive Aktivität vermutlich zu einer verstärkten Invasion des Tumors beiträgt [16,128]. Obwohl einzelne *in vitro* Studien zeigen konnten, dass eine EGFRvIII-Expression zu einer Radioresistenz führt, ist die prognostische Relevanz der EGFRvIII-Expression für die Klinik weiterhin umstritten. Darüber hinaus ist der Einfluss von EGFRvIII auf die Sensitivität von GBM-Zellen bzw. -Tumoren gegenüber Chemotherapie weitestgehend unbekannt.

Hinzu kommt, dass für die Untersuchung der Bedeutung einer EGFRvIII-Expression auf die Radio- und Chemosensitivität bisher nur Systeme zur Verfügung standen, die EGFRvIII-negative Zellen nutzten in denen der EGFRvIII künstlich überexprimiert wurde. Dies reflektiert somit nicht die *in vivo* Situation.

Ziel dieser Arbeit war es daher den Einfluss einer EGFRvIII-Expression auf:

Radiosensitivität

EGFR *targeting*

Chemosensitivität

in GBM-Zellen mit natürlicher EGFR-Amplifikation und endogener EGFRvIII-Expression zu untersuchen.

## 2 Materialien

### 2.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die humanen GBM-Zelllinien U87MG, U251, LN229, Cas-1, DKMG und BS153 verwendet. Die Authentifizierung der Zelllinien erfolgte mittels *Fingerprinting*-Analyse durch das Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE, Prof. Dr. A. Gal). Die Sequenzierungen der p53- sowie PTEN-Gene der Cas-1, DKMG- und BS153-Zellen wurde am Institut für Pathologie (UKE, PD Dr. Tobias Grob) durchgeführt. Eine Übersicht über die Zelllinien mit zugehörigen p53- und PTEN-Status sowie deren Ursprung/Herkunft ist nachfolgend dargestellt.

Zelllinie	p53	PTEN	*Ursprung / #Herkunft
U87MG	Wildtyp <sup>[129]</sup>	mutiert <sup>[130]</sup>	*Ponten et al., 1968; #Prof. Lamszus, UKE
U251	mutiert (R273H) <sup>[131]</sup>	mutiert <sup>[130]</sup>	*Ponten et al., 1968; #Prof. Lamszus, UKE
LN229	mutiert <sup>[132]</sup>	Wildtyp <sup>[133]</sup>	#Dr. Borgmann, UKE
Cas-1	mutiert (R248W) <sup>^</sup>	nicht exprimiert <sup>^</sup>	#Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (#HTL97009), Dr. Florio
DKMG	Wildtyp <sup>^</sup>	mutiert (T167A) <sup>^</sup>	#DSMZ, #ACC277
BS153	mutiert (R248Q) <sup>^</sup>	mutiert (C136Y) <sup>^</sup>	*Jones et al., 2001; #Prof. Merlot

<sup>^</sup>eigene Analysen des UKE

## 2.2 Antikörper

### 2.2.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
β-Aktin	Maus	monoklonal	1:20000 (WB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #A-2228
AKT	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #9272
pAKT (Thr308)	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #13038
ATM	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #2873
pATM (Ser1981)	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #4526
53BP1	Kaninchen	monoklonal	1:600 (IF)	Novus Biologicals, USA, # NB-100-3004
BrdU	Ratte	monoklonal	1:1000 (FA)	AbdSerotec, Oxford, UK, # ABT0030G
BrdU (Klon B44)	Maus	monoklonal	1:1500 (FA)	Becton Dickinson, New Jersey, USA, #347580
CHK1	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #2360
pCHK1 (Ser354)	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	CellSignaling Technology, Denvers, USA, #2341
CHK2	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #3440
pCHK2 (Thr68)	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #2661
EGFR	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #2232
pEGFR (Tyr1173)	Kaninchen	monoklonal	1:1000 (WB)	CellSignaling Technology, Denvers, USA, #4407
EGFRvIII	Maus	monoklonal	1:1300 (WB, IF, DFZ)	Dr. Schulte, Neurochirurgie, Hans Dietrich Herman Labor, UKE
γH2AX (Ser139)	Maus	monoklonal	1:2000 (WB, IF)	Merck Millipore, Schwalbach/Ts, #05-636

ERK1/2	Maus	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #9102
pERK1/2 (Thr202/ Tyr204)	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #9101
MGMT	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #2739
MLH1	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #3515
MSH2	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #3515
MSH3	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	BD Transduction Laboratories, New Jersey, USA, #611390
MSH6	Kaninchen	polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology, Denvers, USA, #3515
PMS2	Maus	monoklonal	1:1000 (WB)	Rockland, Limerick, Irland, #29379

WB: *Western Blot*, IF: Immunfluoreszenz, DFZ: Durchflusszytometrie

### 2.2.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor®594 <i>goat anti-mouse</i>	Ziege	polyklonal	1:1000 (IF)	Life Technologies, Carlsbad, USA, #A 11005
Alexa Fluor®488 <i>goat anti-rabbit</i>	Ziege	polyklonal	1:1000 (IF)	Life Technologies, Carlsbad, USA, #A-11001
Alexa Fluor®647 <i>goat anti-mouse</i>	Ziege	polyklonal	1:1000 (DFZ)	Life Technologies, Carlsbad, USA, #A-21235
Alexa Fluor®555 <i>goat anti-rat</i>	Ziege	polyklonal	1:1500 (FA)	Life Technologies, Carlsbad, USA, #A-A21434
IRDye® 800CW <i>goat anti-rabbit</i>	Kaninchen	polyklonal	1:7500 (WB)	LI-COR, Nebraska, USA, #926-32211
IRDye® 800CW <i>goat anti-mouse</i>	Maus	polyklonal	1:7500 (WB)	LI-COR, Nebraska, USA, #926-32210
IRDye® 680RD <i>goat anti-mouse</i>	Maus	polyklonal	1:7500 (WB)	LI-COR, Nebraska, USA, #926-68070



---

IRDye® 680RD Kaninchen <i>goat anti-rabbit</i>	polyklonal	1:7500 (WB)	LI-COR, Nebraska, USA, #926-68071
---	------------	-------------	--------------------------------------

---

WB: *Western Blot*, IF: Immunfluoreszenz, DFZ: Durchflusszytometrie, FA: *Fiber Assay*

## 2.3 Reagenzien und Medien für die Zellkultur

---

Bezeichnung	Hersteller
AmnioMax™	Life Technologies, Carlsbad, USA, #17001-074
AmnioMax™-C100- <i>supplement</i>	Life Technologies, Carlsbad, USA, #12556-023
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #D6429
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin, #S0615
Natriumpyruvat	Life Technologies, Carlsbad, USA, #11360-039
<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> (RPMI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #R8758
0,05% Trypsin-EDTA	Life Technologies, Carlsbad, USA, #25300-054
Opti-Mem®	Life Technologies, Carlsbad, USA, #11058-021

---

## 2.4 Chemikalien und Reagenzien

---

Bezeichnung	Hersteller
BD FACS Clean	Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, #340345
BD FACS Flow	Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, #342003
BD FACS Flow	Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, #340346
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, #B-5525
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #A7030
5-Chloro-2'-deoxyuridine (CldU)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #C68910
Coulter-Isoton II Lösung	BeckmanCoulter GmbH, Krefeld, #8448011
Diamindinophenylindole (DAPI)	Merck, Darmstadt, #1246530100
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #D2650

---

Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt, #106586
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, #11280
Ethanol	Merck, Darmstadt, #100983
Formaldehyd (37% (wt/vol))	Merck, Darmstadt, #104002
Gefitinib (gelöst in DMSO)	LC Laboratories, Woburn, MA, #G-4408
Glycerin	Roth, Karlsruhe, #3783
HiPerFectTransfektionsreagenz	Quiagen, Venlo, NL, #301705
5-Iodo-2'-deoxyuridine (IdU)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #I7125
Immersionsöl	Zeiss, Göttingen, #444969-0000-000
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, #104936
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt, #104873
Kristallviolett	Merck, Darmstadt, #115940
Methanol	J.T.Bakker, Pleasant Prairie, #8045
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, #M3148
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim, #M8266
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #S6150
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #S8045
Odyssey® Two-Color Protein Molecular Weight Marker	LI-COR, Nebraska, USA #928-4000
2-Propanol	Merck, Darmstadt, #8187662500
Propidium Iodid (PI)	Merck, Darmstadt, #537059
Ribonuklease A (RNase)	Serva, Heidelberg, #34388
SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, USA, #LC5925
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #L4509
Temozolomide (TMZ; gelöst in DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, # T2577-25MG
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T1503
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T8787
Tris-Borat-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, #93290
Tris-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T9285
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, #T3253
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, #P1379
UltraPure™ Distilled Water	Life Technologies, Carlsbad, USA, #10977
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA, #H-1000

---

## 2.5 siRNAs

siRNA	Sequenz	Hersteller
EGFRvIII	5'-CUGGAGGAAAAGAAAGGUAUU-3'	Eurofins Scientific, Luxemburg
On-Target plus	5'-ACAGCAAAUCCAUCGUGU-3'	Dharmacon™ #SO-2436533G
Cyclophilin B	5'-GAAAGAGCAUCUACGGUGA-3'	
control pool	5'-GAAAGGAUUUUGGCUACAAA-3'	
	5'-GGAAAGACUGUUCCAAAAA-3'	

## 2.6 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blockierungslösung (IF)	1xPBS 3% BSA (w/v)
Blockierungslösung (WB)	1xTBS-T 10% BSA (w/v)
Einfriermedium	90% FKS (v/v) 10% DMSO (v/v)
Ethanol	70% (v/v)
Färbelösung (CFA)	0,1% (w/v) Kristallviolett in bidest. H <sub>2</sub> O
Fixierungslösung (FA)	75% (v/v) Methanol 25% (v/v) Eisessig
HCl-Lösung	2,5 mM rauchende HCl-Lösung
Laufpuffer	10% (v/v) 10x TG-Puffer 10% (v/v) SDS
5x Probenpuffer nach Laemmli	50 mM Tris-HCl, pH 6,8 100 mM DTT 2% (w/v) SDS 0,1% (w/v) Bromphenolblau 10% (w/v) Glycerol
SDS	10% (w/v) in bidest. H <sub>2</sub> O

---

<i>Spreading-Buffer</i>	200 mM Tris-HCl pH: 7,4 50 mM EDTA 0,5% (w/v) SDS
10x Tris-Glycin (TG)-Puffer	1,92 M Glycin 250 mM Tris Base
10x TBS	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
10x TBS-T	TBS 0,05% (v/v) Tween20
1x Transferpuffer	10% (v/v) 10xTG-Puffer 20% (v/v) Methanol
4% Paraformaldehyd (IF)	4% (v/v) in 1xPBS
1x PBS, pH 7,4	137 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O 2,7 mM KCl
3 mM EDTA in 1x PBS, pH 7,4 (sterilfiltriert)	137 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O 2,7 mM KCl 3 mM EDTA
PBS-T	0,1-0,5% (v/v) Tween 20 in 1xPBS
Permeabilisierungslösung	1x PBS 0,2% Triton X-100
Waschlösung I (FA)	1x PBS + 1% BSA + 0,1% Tween20

---

WB: *Western Blot*, IF: Immunfluoreszenz, CFA: *colony forming assay* (Koloniebildungstest), FA: Fiber Assay

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

---

Bezeichnung	Hersteller
Criterion Tris-HCl Gel, 4-15%	Bio-Rad Laboratories, München, #345-0028
Deckgläschen, 15 mm	Roth, Karlsruhe, #P232.1
Erlenmeyerkolben 2000 ml WH	Roth, Karlsruhe, #X742.2
Erlenmeyerkolben 1000 ml WH	Roth, Karlsruhe, #X741.2
Filterpapier Criterion Blotter	Bio-Rad Laboratories, München #170-4085

---

Handschuhe, Nitril, Gr. S	Supermax, Kamen, #92396
Kulturflasche T-25,	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3910
Kulturflasche T-75	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3911
Kulturflasche T-175	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3912
Messzylinder, 250 ml	Roth, Karlsruhe, #K259.2
Messzylinder, 500 ml	Roth, Karlsruhe, #K260.2
Objektträger Superfrost	Roth, Karlsruhe, #1880.1
Odyssey Nitrozellulose Membran	LI-COR, Nebraska, USA, #926-31092
Transferringpipetten, 3.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1171.001
Pipette serolog., 1 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1251.001
Pipette serolog., 2 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1252.001
Pipette serolog., 5 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1253.001
Pipette serolog., 10 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1254.001
Pipette serolog., 25 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1685.001
Pipette serolog., 50 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1689.001
Pipettenspitzen, 0,5-20 µl	Eppendorf, Hamburg, #0030000.854
Pipettenspitzen, 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, #0030000.919
Safeguard, Filter Pipettenspitzen, 20 µl	PEQLAB Biotechnologie GmbH Biotechnik, Erlangen, #81-1020
Safeguard, Filter Pipettenspitzen, 200 µl	PEQLAB Biotechnologie GmbH Biotechnik, Erlangen, #81-1011
Safeguard, Filter Pipettenspitzen, 1000 µl	PEQLAB Biotechnologie GmbH Biotechnik, Erlangen, #81-050
TipStack Pack, 0,5-10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, #70.113.600
TipStack Pack, 0,5-100 µl	Sarstedt, Nümbrecht, #70.760.451
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #72.690.001
Reaktionsgefäß 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #62.554.502
Reaktionsgefäß 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #62.554.501
Zellkulturplatte 6-well	Sarstedt, Nümbrecht, #72.690.001

---

## 2.8 Geräte und Hilfsmittel

---

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Mediatech, Norderstedt
Brutschrank	SANYO Medical, Bad Nenndorf
Blot-Kammern (CriterionPrecast)	Bio-Rad, München
Coulter Counter Z1	BeckmanCoulter, Krefeld

---

---

Durchflusszytometer (BD FACScanCanto™)	BD FACScan Canto, Becton Dickson Biosciences, Franklin Lakes, NJ
Eismaschine (FM-120DE-50)	Hochizaki, GC Amsterdamm,
Elektrophorsekammer	CriterionCell, Bio-Rad, München
Heizblock	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg
Kamerasysteme	AxioCamMRm, Zeiss, Göttingen
Kolbenhubpipetten	0,5-10µl; 10-100 µl; 100-1000 µl, Eppendorf, Hamburg
Magnetrüher	Ikameg Ret, IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop	Axionvision Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Netzgeräte	Consort E455, Fröbel Laborgeräte, Lindau Consort E802, Fröbel Laborgeräte, Lindau
pH-Meter	BeckmanCoulter, Krefeld
Röntgenröhre	Gulmay, Surrey, UK
Schüttler	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen Mini-Shaker, Modell Kühner, Braun, Melsungen Polymax 1040, Heidolph, Schwabach
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe	Oerlikon LeyboldVacuum, Pfäffikon, CH
Vortexer	Vortex-Genie® 2, Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	P1200, Mettler Toledo, Giessen AE160, Mettler Toledo, Giessen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbäder	Haake W19/D3, Karlsruhe Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	Biofuge 15 R, Heraeus, Hanau Labofuge 400 R, Heraeus, Hanau Microfuge R, BeckmanCoulter, Krefeld Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau

---

---

## 2.9 Software

---

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
Axio-Vision Rel. 4.7	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
GraphPadPrism 5	GraphPad Software Inc, CA, San Diego
Image J	Wayne Rasband
ModFit LTTM software	Verity Software House, Inc.
BD FACS Diva 6.1.2.	Becton Dickson Biosciences, NJ, Franklin Lakes

---

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Zellkultivierung

Das Passagieren der humanen adhärent wachsenden GBM-Zelllinien wurde unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit bi-distilliertem Wasser hergestellt und vor Gebrauch steril-filtrierte bzw. autoklaviert. Die Kultivierung der EGFRvIII-negativen GBM-Zellen (U87MG, LN229, Cas-1, U251) erfolgte in DMEM bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen mit einem Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS) und Pyruvat (1:100). Die parentalen DKMG sowie die Sub-Zelllinien DKMGvIII<sup>-</sup> und DKMGvIII<sup>+</sup> wurden in RPMI mit inaktivierten FKS kultiviert, welches zuvor bei 56 °C für 30 min erhitzt wurde. Die parentalen BS153 sowie die Sub-Zelllinien BS153vIII<sup>-</sup> und BS153vIII<sup>+</sup> wurden in DMEM mit inaktivierten FKS kultiviert. Die Zellen wurden mindestens alle 5-7 Tage passagiert. Hierzu wurde das Medium zunächst abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gespült. Anschließend wurde Trypsin zu den Zellen gegeben, um den Zellrasen abzulösen. Nach einer 5-10 minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in entsprechendem Medium resuspendiert und verdünnt in neuen Zellkulturflaschen zur weiteren Kultivierung oder für ausstehende Versuche ausgelegt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Zellzählgerät in isotonischer Lösung (Coulter-Isoton II Lösung). Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff (-196 °C) in Einfriermedium gelagert. Zur Übersicht ist in Tabelle 3.1 aufgeführt, in welchem Medium die verschiedenen Zelllinien kultiviert wurden.

**Tab. 3.1 Kulturmedien für verwendete GBM-Zelllinien**

Medium	Zelllinien
DMEM + 10% FKS + Natriumpyruvat (1:100)	U87MG, LN229, U251, Cas-1
DMEM + 10% inaktiviertes FKS + Natriumpyruvat (1:100)	BS153, BS153vIII <sup>-</sup> / <sup>+</sup>
RPMI + 10% inaktiviertes FKS	DKMG, DKMGvIII <sup>-</sup> / <sup>+</sup>



### 3.1.2 Bestrahlung von Zellen mit einer Röntgenröhre

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur (RT) mit einer Röntgenröhre (Gulmay RS225) bei 200 kV und 15 mA mit einer Dosisrate von 1,2 Gy/min (0,5 mm Cu- und 0,8 mm Be-Filter).

### 3.1.3 Wachstumskurven

Um Verdopplungszeiten, Zellzyklusverteilungen sowie den Einfluss der EGFR-Inhibition auf das Wachstum der verschiedenen Glioblastomzelllinien zu bestimmen, wurden Wachstumskurven angefertigt. Hierzu wurden jeweils  $1.0 \times 10^5$  Zellen in  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen ausgelegt und mit 5 ml des jeweiligen Mediums kultiviert. Vierundzwanzig Stunden nach Auslegen wurden die Zellen bei Bedarf mit  $5 \mu\text{M}$  Gefitinib oder der entsprechenden DMSO-Verdünnung als Kontrolle behandelt. Der Mediumwechsel erfolgte wiederum 24 h nach Behandlung. Über einen Zeitraum von 8 Tagen wurde täglich eine Zellprobe geerntet, dessen Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension für die Analyse der Zellzyklusverteilung vorbereitet (s. Abschnitt 3.4.3). Hierzu wurden die Zellsuspensionen für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde langsam unter vortexen zu 4 ml eiskalten 70% Ethanol dazu getropft. Die Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.1.4 Herstellung von Ganzzelllysaten

Die Herstellung von Ganzzelllysaten exponentiell wachsender Zellen erfolgte in 6-*well*-Platten. Pro *well* wurden  $2.5 \times 10^5$  Zellen ausgelegt, die über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Um das Lysatvolumen der unterschiedlichen Proben an die Zellzahl anzupassen, wurde für die Zellzahlbestimmung jeweils ein zusätzliches *well* ausgelegt. Die Zellen wurden nach 24 h mit DMSO bzw.  $5 \mu\text{M}$  Gefitinib für 2 h behandelt und bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, mit 1xPBS gewaschen und die Proben mit der geringsten Zellzahl mit  $150 \mu\text{l}$  5x Lysepuffer lysiert, während das Lysepuffervolumen für die weiteren Proben entsprechend angepasst wurde. Die Tumorzellen wurden mittels Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zelllysate wurde für 10 s mit Ultraschall behandelt und für 5-10 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Darauf hin wurden die Proben entweder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. Abschnitt 3.3.1) oder bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.1.5 Koloniebildungstest

#### 3.1.5.1 Bestimmung des Zellüberlebens nach Bestrahlung

Für den Nachweis der Strahlenempfindlichkeit unter *pre-plating* Bedingungen wurde in Abhängigkeit der Klonogenität der verschiedenen Zelllinien 250-400 Zellen/*well* in eine 6-*well*-Platte ausgelegt und über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy bestrahlt. Da U87MG-, Cas-1-, DKMG- und BS153-Zellen sehr diffuse Kolonien bilden, wurde 24 h nach Bestrahlung das Kultivierungsmedium entfernt und durch AmnioMax (+*supplement* und 10% FKS) ersetzt. Die Zellen wurden abhängig von ihrer Verdopplungszeit für 8-28 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zur Bestimmung des Zellüberlebens nach EGFR-Inhibition wurden die Zellen 24 h nach auslegen für 2 h mit 5 µM Gefitinib bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend mit 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy bestrahlt (*pre-plating*). Die weitere Kultivierung des Koloniebildungstests, erfolgte wie im vorherigen Absatz beschrieben.

Zur Bestimmung des Zellüberlebens der DKMGvIII+-Zellen nach EGFR-Inhibition unter *delayed plating* Bedingungen, wurden zunächst  $1 \times 10^5$  Zellen ausgelegt und für vier Tage wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 2 h mit 5 µM Gefitinib bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und darauffolgend mit 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy bestrahlt. Vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung wurden 250 Zellen/*well* ausgelegt und für 12 - 14 Tage im Brutschrank inkubiert.

#### 3.1.5.2 Bestimmung des Zellüberlebens nach Temozolomid-Behandlung

Für die Analyse der Chemosensitivität der Sub-Zelllinien DKMGvIII-/+ sowie BS153vIII-/+ wurden jeweils 250-400 Zellen/*well* in eine 6-*well*-Platte ausgelegt und über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen für 3 Tage mit 5, 10 und 20 µM TMZ behandelt (*pre-plating*). Anschließend wurde das Kultiviermedium abgesaugt und durch AmnioMax (+*supplement* und 10% FKS) ersetzt. Die Zellen wurden für 10-21 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.1.5.3 Bestimmung des Zellüberlebens nach EGFRvIII *knock down* und Temozolomid-Behandlung

Es wurden  $1.5 \times 10^5$  BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen pro *well* in eine 6-*well*-Platte ausgelegt und wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben mit siRNA gegen EGFRvIII sowie Cyclophilin B als Kontrolle behandelt (30 nM siRNA). Nach 48 h wurden die transfizierten Zellen geerntet, gezählt und für den Koloniebildungstest ausgelegt (s. Abschnitt 3.1.5). Am nächsten Tag erfolgten die Behandlung mit TMZ und die weitere Kultivierung wie in Abschnitt 3.1.5.1 beschrieben. Um zu überprüfen, ob der EGFRvIII-spezifische *knock down* erfolgreich gewesen ist, wurden die restlichen Zellen entsprechend ihrer Zellzahl in SDS-Lysepuffer aufgenommen und auf ihre EGFRvIII-Expression hin mittels *Western Blot* untersucht (s. Abschnitt 3.3.2).

### 3.1.5.4 Färbung und Analyse des Koloniebildungstests

Die Kolonien wurden durch die Färbung mit Kristallviolett sichtbar gemacht. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 5 min mit 70% Ethanol fixiert. Das Ethanol wurde verworfen und die Zellen mit 0,1% Kristallviolett für 5-10 min gefärbt. Das Kristallviolett wurde entfernt und überschüssige Farbe mit Leitungswasser ausgewaschen. Anschließend wurden die Platten getrocknet. Für die Analyse des Zellüberlebens wurden die Kolonien, die aus mehr als 50 Zellen bestanden, gezählt. Die Überlebensrate wurde durch das Verhältnis gebildeter Kolonien zur Anzahl eingegebener Zellen bestimmt (Anwachsrate). Zur Kalkulation der Koloniebildungsfähigkeit wurde diese Überlebensrate der einzelnen Dosispunkte auf die Anwachsrate (*plating efficiency*, Klonogenität) der jeweiligen unbehandelten Zellen normiert.

### 3.1.6 Transfektion mit siRNA

Für die Inhibition der EGFRvIII-Expression in BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen wurde eine EGFRvIII-spezifische siRNA verwendet, die durch Lipofektion mittels HiPerFect transfiziert wurde. Die siRNA wurde zunächst in sterilem sowie RNase/DNase-freiem Wasser gelöst (20  $\mu$ M Stammlösung). Als Kontrolle wurde eine siRNA gegen Cyclophilin B, die keinen Einfluss auf die EGFRvIII Expression haben sollte, eingesetzt. Für den EGFRvIII *knock down* in BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen wurden 30 nM der EGFRvIII-spezifischen sowie der Kontroll-siRNA verwendet. Für die siRNA-Behandlung wurden  $1.5 \times 10^5$  Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte in entsprechendem Medium ausgelegt, wobei das Endvolumen nach Zugabe des

Transfektionsansatzes insgesamt 1.5 ml betragen sollte. Nach 30 min erfolgte die Transfektion der Zellen mit siRNA mittels HiPerfect. Dafür wurden zunächst in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pro Ansatz das entsprechende Volumen der siRNA sowie 15 µl HiPerFect in OptiMEM Medium mit einem Endvolumen von insgesamt 100 µl angesetzt. Der Transfektionsansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert, um die Komplexbildung zwischen siRNA und Transfektionsreagenz zu ermöglichen. Pro *well* wurden 100 µl des Transfektionsgemisches dazugegeben, die Zellen für 5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde das Medium entfernt und durch neues ersetzt. Die Zellen wurden bei Bedarf entweder für den Koloniebildungstest (s. Abschnitt 3.1.5.2) oder für den *Western Blot* eingesetzt (s. Abschnitt 3.3.2).

## 3.2 Immunfluoreszenz

### 3.2.1 Nachweis der EGFRvIII-Expression

Für den Nachweis der EGFRvIII-Expression in den DKMGvIII<sup>+</sup>- und BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen sowie den parentalen Mischkulturen mittels Immunfluoreszenz, wurden zunächst in eine 12-*well*-Platte runde Deckgläschen (ø15 mm) gelegt und mit 1 ml entsprechendem Medium überschichtet. Pro *well* wurden  $1.0 \times 10^5$  Zellen ausgelegt, die über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml 4%-iger Formaldehyd unter Schütteln fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS und 3%-iger BSA Lösung für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd blockiert. Nach dem Blockieren wurden 250 µl Antikörperlösung mit Anti-EGFRvIII (L8A4, Maus IgG, 1 µg/ml) in 3%-iger BSA Lösung für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal für jeweils 10 min mit 1x PBS+0,5% Tween® 20 gewaschen. Die Inkubation mit 250 µl Zweitantikörper (3% BSA, 1:1000 Alexa Fluor 594 *goat*-anti-Maus) und DAPI-Lösung (1:1000) erfolgte 1 h im Dunkeln. Der überschüssige Zweitantikörper wurde durch dreimaliges 10-minütiges Waschen 1xPBS + 0,5% Tween® 20 entfernt. Die Deckgläschen wurden auf einen Tropfen Vectashield® Mounting Medium gegeben, auf die Objektträger gelegt und mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Aufnahmen der EGFRvIII-Immunfluoreszenzfärbung und die Auswertung wurde an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Axiovision Observer Z1, Zeiss) durchgeführt.

### 3.2.2 Nachweis von residuellen $\gamma$ H2AX/53BP1-Reparatur-Foci

Ionisierende Strahlung induziert DNA-DSB, die mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung visualisiert werden können. Hierzu wurden in die Vertiefungen einer 12-*well*-Platte runde Deckgläschen ( $\varnothing$  15 mm) gelegt und mit 1 ml entsprechendem Medium überschichtet. Pro *well* wurden 150.000 Zellen ausgelegt, die über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Um den Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die DNA-Reparaturkapazität zu bestimmen, wurden die DKMGvII-/+ sowie BS153vIII-/+ Zellen nach 24 h direkt mit 2 Gy bestrahlt und anschließend für weitere 24 h inkubiert. Für die Analyse der  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci nach EGFR-Inhibition wurden die Zellen vor Bestrahlung für 2 h mit 5  $\mu$ M Gefitinib bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert und anschließend ebenfalls für weitere 24 h inkubiert. Daraufhin wurde das Medium abgesaugt und mit 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml 4%-igem Formaldehyd fixiert und anschließend mit 1 ml Permeabilisierungslösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Blockierungslösung für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach dem Blockieren wurden 250  $\mu$ l Antikörperlösung mit Anti- $\gamma$ H2AX (Maus IgG, 1:400) und Anti-53BP1 (Kaninchen IgG, 1:600) in PBS-T auf die Zellen gegeben und diese für 1 h inkubiert. Anschließend wurde durch dreimaliges 10-minütiges Waschen mit PBS-T überschüssiger Antikörper entfernt. Die Inkubation mit 250  $\mu$ l Zweitantikörper (1:600 Alexa Fluor 594 und 1:100 Alexa Fluor 488 in PBS-T) und DAPI-Lösung (1:1000) erfolgte 1 h im Dunkeln. Der überschüssige Zweitantikörper wurde durch dreimaliges 10-minütiges Waschen mit PBS-T entfernt. Die Deckgläschen wurden auf einen Tropfen Vectashield® Mounting Medium auf Objektträger gegeben und mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die bildliche Darstellung der  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (Axiovision Observer Z1, Zeiss). Anhand der Fotos wurden pro Probe 100 intakte Zellkerne ausgewertet, wobei nur  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-doppelpositive Foci gezählt wurden.

### 3.2.3 DNA *Fiber Assay*

Mit Hilfe des DNA *Fiber Assays* können die Initiation, die Elongation und die Termination der Replikation untersucht werden. Das Prinzip der Analyse basiert auf dem Nachweis der Thymidinanaloga CldU und IdU, die in replizierende DNA eingebaut werden. Anschließend erfolgt der Nachweis von CldU und IdU mittels Immunfluoreszenzfärbung.

Um den Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die Replikation zu untersuchen, wurde die Initiation, die Elongationsrate sowie die Anzahl der angehaltenen Replikationsgabeln von EGFRvIII<sup>-</sup>- der von EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen gegenübergestellt. Die *Fiber Assays* sowie ein Teil der Auswertung wurden von Jasmin Burmester im Rahmen ihrer medizinischen Doktorarbeit durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst  $3-5 \times 10^5$  exponentiell wachsende DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen in T-25er Zellkulturflaschen ausgelegt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zunächst für 20 min mit CldU-haltigem Medium (0,025 mM) behandelt. Das CldU-haltige Medium wurde entfernt und durch IdU-haltiges Medium (0,25 mM) ersetzt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 20 min. Daraufhin wurde das IdU-haltige Medium abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt. Das PBS wurde abgesaugt und 1 ml PBS zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgelöst und die Zellsuspension auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Für die Präparation der DNA wurden 2  $\mu$ l der Zellen auf einen Objektträger pipettiert. Die Proben wurden für 3-5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 7  $\mu$ l Lysepuffer auf die Proben pipettiert und für 2 min inkubiert. Daraufhin wurde der Objektträger schräg aufgestellt bis der Tropfen am Objektträger herunter lief. Der Objektträger wurde an der Luft getrocknet und mit Methanol/Essigsäure im Verhältnis 3:1 für 10 min fixiert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde die DNA für 5 min mit H<sub>2</sub>O gespült, um die DNA zu rehydrieren. Anschließend erfolgte die Denaturierung der DNA mit HCl. Um die HCl zu entfernen wurden die Objektträger dreimal mit PBS gespült. Darauf folgte die Blockierung der Objektträger mit Waschlösung I für 1 h. Für den Nachweis der CldU-Nukleotide wurde ein primärer anti-BrdU eingesetzt (s. Abschnitt 2.2.2), der in Waschlösung I (1:1000) verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Objektträger erneut mit Waschlösung I gewaschen. Die DNA und der anti-BrdU-Antikörper wurden im nächsten Schritt mit 4% Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Hiernach wurde erneut mit Waschlösung I gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in Waschlösung I verdünnt. Die Inkubation erfolgte 1,5 h bei RT in einer feuchten, abgedunkelten Kammer. Danach wurden die Objektträger erneut mit Waschlösung I gewaschen. Der Nachweis der eingebauten IdU-Nukleotide erfolgte mit einem anti-BrdU-Antikörper (AlexaFluor 555), der in Waschlösung I (1:1500) verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten

Kammer. Anschließend wurden die Objektträger abermals mit Waschlösung I gewaschen. Dieser anti-BrdU wurde mit einem sekundären AlexaFluor 488 detektiert (1:500 in Waschlösung I). Die Inkubation erfolgte für 1,5 h bei RT in einer feuchten, abgedunkelten Kammer. Daraufhin wurden die Objektträger erneut mit Waschlösung I gewaschen. Die Objektträger wurden mit dem Eindeckmittel Vectashield® Mounting Medium versehen und mit Nagellack versiegelt. Für die Auswertung der Chromatinfasern wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovision Observer Z1, Zeiss) Bilder erstellt, die mit Hilfe der Image J Software ausgewertet wurden.

Für die Auswertung der Replikationsstrukturen wurden pro Experiment 10 Fluoreszenzaufnahmen gemacht und für die Analyse das *plug-In analyze* von ImageJ verwendet. Es wurden 400-500 Strukturen ausgewertet. Zur Bestimmung der Länge der Chromatinfasern wurde das Instrument *segmented lines* von ImageJ verwendet.

Die Länge der Chromatinfasern wurde jeweils mit dem spezifischen Umrechnungsfaktor 9,8 (d.h. der relative Wert 9,8 bei Image J entspricht 1  $\mu\text{m}$  *Fiber*) in  $\mu\text{m}$  umgerechnet, der zuvor im Rahmen der Dissertation von Dr. Ann Parplys ermittelt wurde. Um die Länge in kb/min zu ermitteln, wurde der Umrechnungsfaktor 1  $\mu\text{m}$  = 2,59 kb verwendet [134].

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können mit Hilfe der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Durch Zusatz von SDS, das nicht-kovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört, wird negative Ladung auf die Proteine übertragen und maskiert deren eigene Ladung. Dies bedeutet, dass die Proteine aufgrund der Siebeffekte in der Reihenfolge ihrer molaren Masse aufgetrennt werden.

Für die Auftrennung wurden Criterion-Gradientengele (4-15% Tris-HCl) verwendet. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammern mit SDS-Laufpuffer befüllt. Die Proben, die zuvor bei 4 °C gelagert wurden, wurden für 5-10 min bei 95°C inkubiert, anschließend gevortext und kurz abzentrifugiert. Es wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  Ganzzellysat auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 5  $\mu\text{l}$  SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard verwendet. Die Elektrophorese wurde auf Eis bei 120 V für 10 min und anschließend bei 190 V für 60-70 min durchgeführt. Der spezifische

Proteinnachweis in den Ganzzelllysaten wurde durch so genannte *Western Blot*-Analysen durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.2).

### 3.3.2 *Western Blot*

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Criterion Blotters auf eine Nitrozellulose-Membran zur Fluoreszenzdetektion übertragen. Die Nitrozellulose-Membran wurde zunächst kurz in Wasser aktiviert und anschließend 10-15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Apparatur wurde entsprechend den Herstellerangaben zusammengebaut. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in der Regel über Nacht bei 4 °C für 4 h bei 50 V und für die restliche Zeit bei 20 V. Nach dem Transfer wurden die Membranen kurz in TBS-T gewaschen und anschließend für mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit 10% BSA unter Schwenken blockiert. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper in 5% BSA/TBS-T erfolgte für mindestens 1 h oder über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Die verwendeten Erst- und Zweitantikörper (Spezifität, Spezies) mit entsprechenden Verdünnungen sind in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 aufgeführt. Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit 0,2%-igen TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Infrarot-fluoreszenz markierten 2. Antikörper in 5% BSA/TBS-T erfolgte für 1 h ebenfalls unter Schwenken. Anschließend wurde ungebundener 2. Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 0,2% TBS-T für jeweils 10 min entfernt. Die Detektion der Infrarot-Fluoreszenz erfolgte mittels LI-COR Odyssey CLx Infrarot Imaging System. Hierbei gibt es die Option das Proteinsignal in rot (sekundäre IRDye 680RD Antikörper) und in grün (sekundäre IRDye 800CW Antikörper) zu visualisieren. Dieses ermöglicht bei Verwendung zweier unterschiedlicher Spezies der 1. Antikörper die basale Expression, sowie die Phosphorylierung eines Proteins zeitlich darzustellen. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

## 3.4 Durchflusszytometrische Methoden

### 3.4.1 Analyse der EGFRvIII-Expression

Die EGFRvIII-Expression an vitalen Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Für eine durchflusszytometrische Analyse werden in der Regeln entweder Antigene mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper markiert oder Fluoreszenzfarbstoffe, die mit zellulären Komponenten wie DNA oder Proteine



interagieren, verwendet. Die hieraus resultierenden fluoreszenzmarkierten Zellen fließen während der Messung in hohem Tempo in den Mikrokanal einer Küvette und passieren dabei einen Laser mit einer bestimmten Wellenlänge. Hierbei entsteht Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches mit der Zellgröße korreliert, sowie Seitwärtsstreulicht (*side ward scatter*, SSC), das als Maß für die Granularität der Zelle und die Fluoreszenz angesehen wird. Um die Anzahl EGFRvIII exprimierender Zellen in den parentalen DKMG und BS153 Populationen, sowie den DKMGvIII<sup>-/+</sup> und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen unter vitalen Bedingungen mit einem EGFRvIII-spezifischen Antikörper markiert. Hierzu wurden zunächst jeweils  $3-5 \times 10^6$  Zellen in 15 cm Petrischalen ausgelegt und über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei für jede Zelllinie eine zusätzliche Petrischale für die 2. Antikörperkontrolle ausgelegt wurde. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit 10 ml 3 mM EDTA/PBS gewaschen. Um die Zellen sanft von der Oberfläche der Petrischalen zu lösen, wurden die Zellen in 5 ml 3 mM EDTA/PBS für 10-15 min bei 37 °C inkubiert und hiernach in 15 ml-Falconröhrchen überführt. Danach wurde außer in die 2. Antikörperkontrollen 1 µg/ml EGFRvIII spezifischer Antikörper hinzugefügt. Um eine Internalisierung des 1. Antikörpers zu verhindern, erfolgte die Inkubation der Proben auf dem Rollbrett bei 4 °C für 1-2 h. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml 3 mM EDTA/PBS, das Zentrifugieren der Zellen (4 °C, 3 min, 1200 rpm) sowie das Absaugen des Überstandes, um ungebundenen 1. Antikörper zu entfernen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Hiernach wurde das Zellpellet in 3 ml 3 mM EDTA/PBS aufgenommen und der 2. Antikörper AlexaFluor 647 (1:1000) zu den Proben sowie den 2. Antikörperkontrollen hinzugefügt. Die Inkubation wurde abermals auf dem Rollbrett bei 4°C für 1 h durchgeführt. Abschließend erfolgte erneut die Zugabe von 10 ml 3 mM EDTA/PBS, das Zentrifugieren der Zellen (4 °C, 3 min, 1200 rpm) sowie das Absaugen des Überstandes, um ungebundenen 2. Antikörper zu entfernen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Danach wurden die Proben in 0,5 ml 3 mM EDTA/PBS aufgenommen, durch Gase filtriert und bis zur Messung am Durchflusszytometer im Dunkeln auf Eis gelagert. Die Einstellungen für FSC sowie SSC wurden anhand der 2. Antikörperkontrolle festgelegt und an die unterschiedlichen Zelllinien angepasst.

### 3.4.2 Etablierung EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien

Um DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Sub-Zelllinien zu generieren, wurden die EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen basierend auf den heterogenen parental Kulturen mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) voneinander getrennt. Hierzu wurden zunächst jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen in 15 cm Petrischalen ausgelegt und über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Färbung mit dem EGFRvIII-spezifischen Antikörper erfolgte unter vitalen Bedingungen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Die Zellen wurden abschließend in 1-2 ml 3 mM EDTA/PBS aufgenommen und durch Gase filtriert. Das Sortieren der Zellen erfolgte am Durchflusszytometer BD FACS Canto II durch die UKE FACS *Core Facility*. Die sortierten EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen wurden in 5 ml DMEN bzw. RPMI aufgefangen und abhängig von der Zellzahl zunächst in 6-*well* oder T-25er-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen weiter kultiviert.

### 3.4.3 Analyse der Zellzyklusverteilung

Die Zellzyklusanalyse diente der Bestimmung der Anteile einer Zellpopulation der in G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus. Die Unterscheidung der jeweiligen Phasen basiert auf dem Anfärben der DNA mit Propidiumiodid (PI), welches in die DNA interkaliert. Auf diese Weise kann zwischen einem einfachen DNA-Gehalt (G1-Phase) und einem doppeltem DNA-Gehalt (G2-Phase) unterschieden werden. Zellen mit dazwischen liegenden DNA-Gehalten werden der S-Phase zugeordnet. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben wachsen gelassen, geerntet und bis zur PI-Färbung bei -20 °C gelagert. Für die PI-Färbung wurde die Zellsuspension zunächst zentrifugiert (5 min, 1200 rpm) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS mit 0,1% Tween® 20 gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 1200 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 0,5 ml PI-Lösung (10 µg/ml), die frisch mit 1% RNase H versetzt war für mindestens 1 h bei RT gefärbt. Die Proben wurden durch Gase in FACS-Röhrchen filtriert und am Durchflusszytometer (BD FACS Canto) gemessen. Die erstellten Histogramme wurden mittels der Software ModFit ausgewertet.

### 3.5 Statistik

Der ungepaarte sowie gepaarte Studentsche t-Test wurde für die statistischen Analysen verwendet. P-Werte wurden auf Basis des zweiseitigen t-Tests (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ) ermittelt.

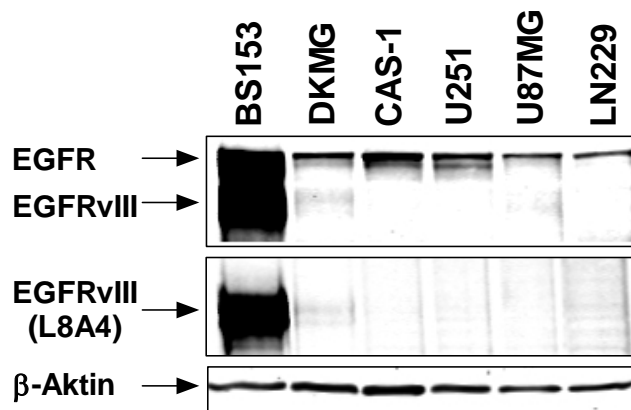
## 4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des EGFRvIII auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit, auf die Sensitivität gegenüber einer EGFR-Inhibition mittels Gefitinib sowie auf die Empfindlichkeit gegenüber TMZ zu untersuchen. Hierfür standen sechs verschiedene GBM-Zelllinien zur Verfügung; drei davon mit beschriebener EGFRvIII-Expression (BS153, DKMG, Cas-1).

### 4.1 Einfluss des EGFRvIII auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit

#### 4.1.1 EGFR- und EGFRvIII-Expression in humanen Glioblastomzellen

Um den Einfluss einer EGFRvIII-Expression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit zu untersuchen, wurden zunächst die sechs GBM-Zelllinien BS153, DKMG, Cas-1, U251, U87MG und LN229 hinsichtlich ihrer EGFR- sowie EGFRvIII-Expression mittels *Western Blot* analysiert (s. Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: EGFR- und EGFRvIII-Expression in humanen GBM-Zelllinien.** Die EGFR- und EGFRvIII-Expression wurde mittels *Western Blot* analysiert. Neben einem EGFR-spezifischen Antikörper, der auch die Deletionsmutante EGFRvIII erkennt, wurde zur Bestätigung der EGFRvIII-Expression auch ein EGFRvIII-spezifischer Antikörper (L8A4) verwendet. Die unterschiedlichen Proben wurden auf die Zellzahl normiert und jeweils die gleiche Menge Lysat auf das Gel aufgetragen.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

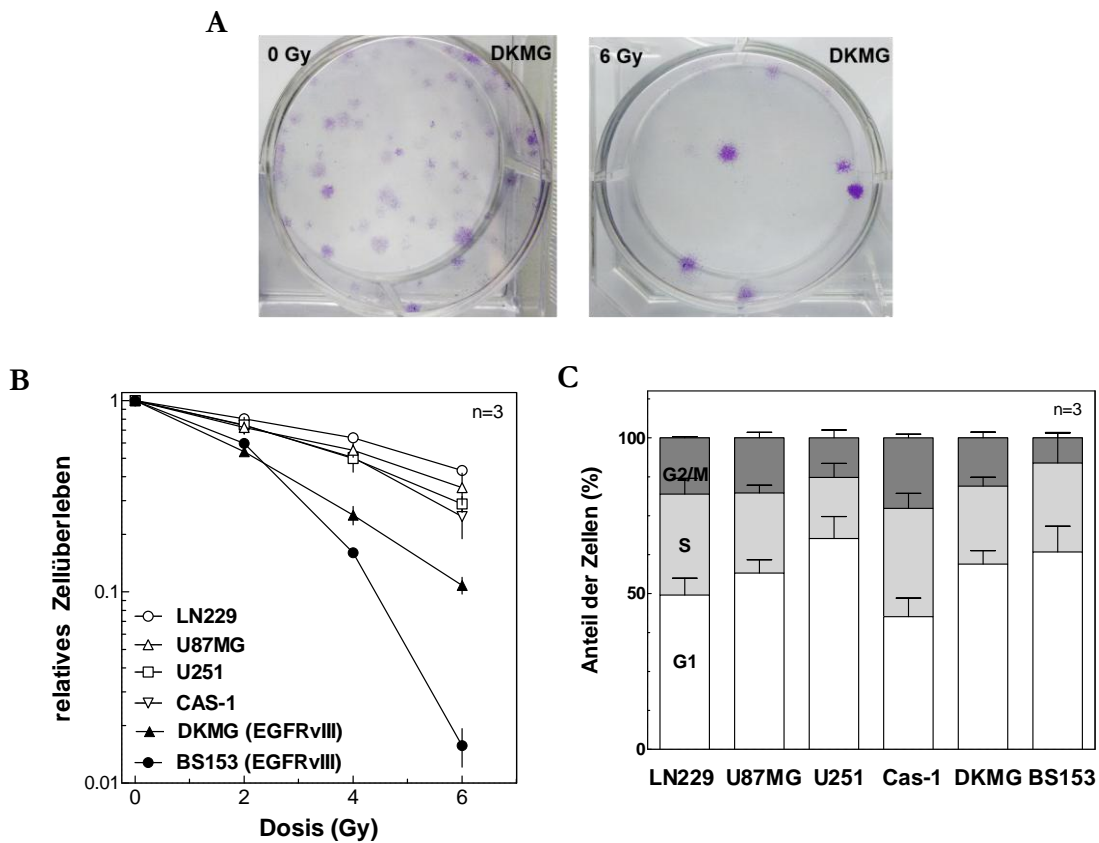
Wie aus Abb. 4.1 deutlich wird, war der EGFR in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar, wobei sich die einzelnen Zelllinien in der Intensität der EGFR-Expression unterschieden. Die stärkste EGFR-Expression zeigten die BS153-Zellen, die schwächste U87MG- und LN229-Zellen. Sowohl BS153- als auch DKMG-Zellen wiesen eine EGFRvIII-Expression auf, die Expression war in den DKMG-Zellen im Vergleich zu den BS153-Zellen jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Die Zelllinien U251, U87MG sowie LN229 waren EGFRvIII-negativ. Entgegen den Erwartungen zeigten auch die Cas-1-Zellen keine EGFRvIII-Expression.

#### **4.1.2 Strahlenempfindlichkeit EGFRvIII-negativer und EGFRvIII-positiver Glioblastomzellen**

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der EGFRvIII-negativen und EGFRvIII-positiven GBM-Zelllinien wurde mit Hilfe von Koloniebildungstests nach Röntgenbestrahlung mit 2, 4 und 6 Gy bestimmt (s. Abb. 4.2 A, B). Da die Strahlenempfindlichkeit von Zellen auch von der Zellzyklusverteilung abhängt und Zellen in der G1-, G2- und späten S-Phase resistenter gegenüber IR sind als in der frühen S- und Mitosephase, wurde der DNA-Gehalt zum Zeitpunkt der Bestrahlung mittels Durchflusszytometrie bestimmt (s. Abb. 4.2 C).

Aus Abb. 4.2 B wird ersichtlich, dass die EGFRvIII-negativen und EGFRvIII-positiven Zelllinien ganz unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten aufwiesen. Die Strahlenempfindlichkeit nahm in folgender Reihenfolge ab: LN229 (SF6: 0,43) > U87MG (SF6: 0,35) > U251 (SF6: 0,29) > Cas-1 (SF6: 0,25) > DKMG (SF6: 0,11) > BS153 (SF6: 0,016). Somit waren die EGFRvIII-exprimierenden BS153- und DKMG-Zellen im Vergleich zu den EGFRvIII-negativen Zellen deutlich strahlenempfindlicher. Aus Abb. 4.2 C wird ersichtlich, dass die sechs GBM-Zelllinien ähnliche Zellzyklusverteilungen zum Zeitpunkt der Bestrahlung aufwiesen und die Zellzyklusverteilung somit nicht die Ursache für die unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeiten war.

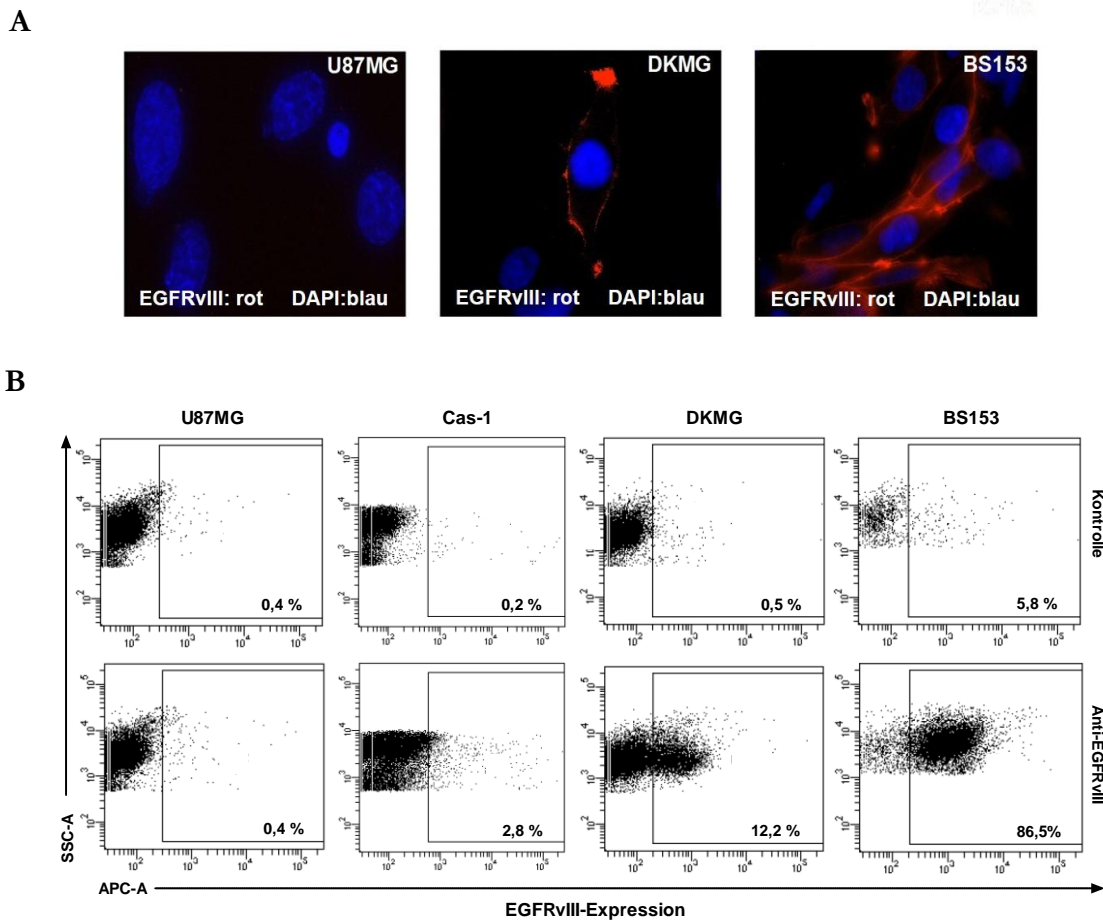
Schlussfolgernd lässt sich aus diesem Teil der Arbeit festhalten, dass die verwendeten GBM-Zelllinien ein sehr heterogenes Bild bezüglich der Strahlenempfindlichkeiten aufwiesen und die EGFRvIII-exprimierenden Zellen deutlich strahlenempfindlich waren.



**Abb. 4.2: Zelluläres Überleben nach Bestrahlung in EGFRvIII-negativen und EGFRvIII-positiven Glioblastomzelllinien.** (A) Beispiel von unbestrahlten und mit 6 Gy bestrahlten DKMG-Zellen. (B) Nachweis der Strahlenempfindlichkeit mittels Koloniebildungstest. Exponentiell wachsende Zellen wurden ausgelegt, bestrahlt und nach 7-21 Tagen fixiert sowie mit Kirschtviolett gefärbt. Anschließend wurde die Zahl der Kolonien mit mehr als 50 Zellen bestimmt. (C) Die Zellzyklusverteilung zum Zeitpunkt der Bestrahlung wurde mittels Durchflusszytometrie nach PI-Färbung ermittelt.

### 4.1.3 Etablierung und Charakterisierung EGFRvIII-positiver und EGFRvIII-negativer Sub-Zelllinien

Um die DKMG- und BS153-Zellen hinsichtlich ihrer EGFRvIII-Expression näher zu charakterisieren, sowie den Anteil an EGFRvIII-exprimierenden Zellen in den Population zu bestimmen, wurde zunächst eine Immunfluoreszenzfärbung (s. Abb. 4.3 A) sowie eine durchflusszytometrische Analyse (s. Abb. 4.3 B) durchgeführt. Da die Cas-1-Zellen in der *Western Blot*-Analyse EGFRvIII-negativ waren, sollte diese Beobachtung mittels Durchflusszytometrie überprüft werden. Hierbei dienten U87MG-Zellen als Negativkontrolle.



**Abb. 4.3: Nachweis der EGFRvIII-Expression in Cas-1-, DKMG- und BS153-Zellen.** (A) Die EGFRvIII-Expression in exponentiell wachsenden Zellen wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. U87MG-Zellen dienen als EGFRvIII-negative Kontrollzelllinie (blau: DNA Färbung mit DAPI; rot: EGFRvIII). (B) Durchflusszytometrischer Nachweis der EGFRvIII-Expression in parental Cas-1-, DKMG- und BS153-Zellen (*dot blots*). Die EGFRvIII-Expression (APC-A) wurde durch einen EGFRvIII-spezifischen Antikörper detektiert. U87MG-Zellen dienen als Negativkontrolle (SSC-A; *side scatter*). Eine sekundäre Antikörperkontrolle wurde mitgeführt, um die unspezifische Bindung des 2. Antikörpers einschätzen zu können.

Aus Abb. 4.3 A wird deutlich, dass U87MG-Zellen wie erwartet EGFRvIII-negativ waren. Darüber hinaus exprimierten nicht alle DKMG- und BS153-Zellen den EGFRvIII, jedoch wiesen die BS153-Zellen deutlich mehr EGFRvIII-positive Zellen auf und auch die EGFRvIII-Expression an sich war in BS153-Zellen im Vergleich zu DKMG-Zellen stärker ausgeprägt. Diese Beobachtung stimmte mit den zuvor generierten *Western Blot*-Daten überein (s. Abb. 4.1). Auch hier zeigte sich eine deutlich stärkere EGFRvIII-Expression in den BS153-Zellen. Anhand der Immunfluoreszenz wurde zudem deutlich, dass der EGFRvIII sowohl in DKMG- als auch in BS153-Zellen wie erwartet überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert war (s. Abb. 4.3 A).

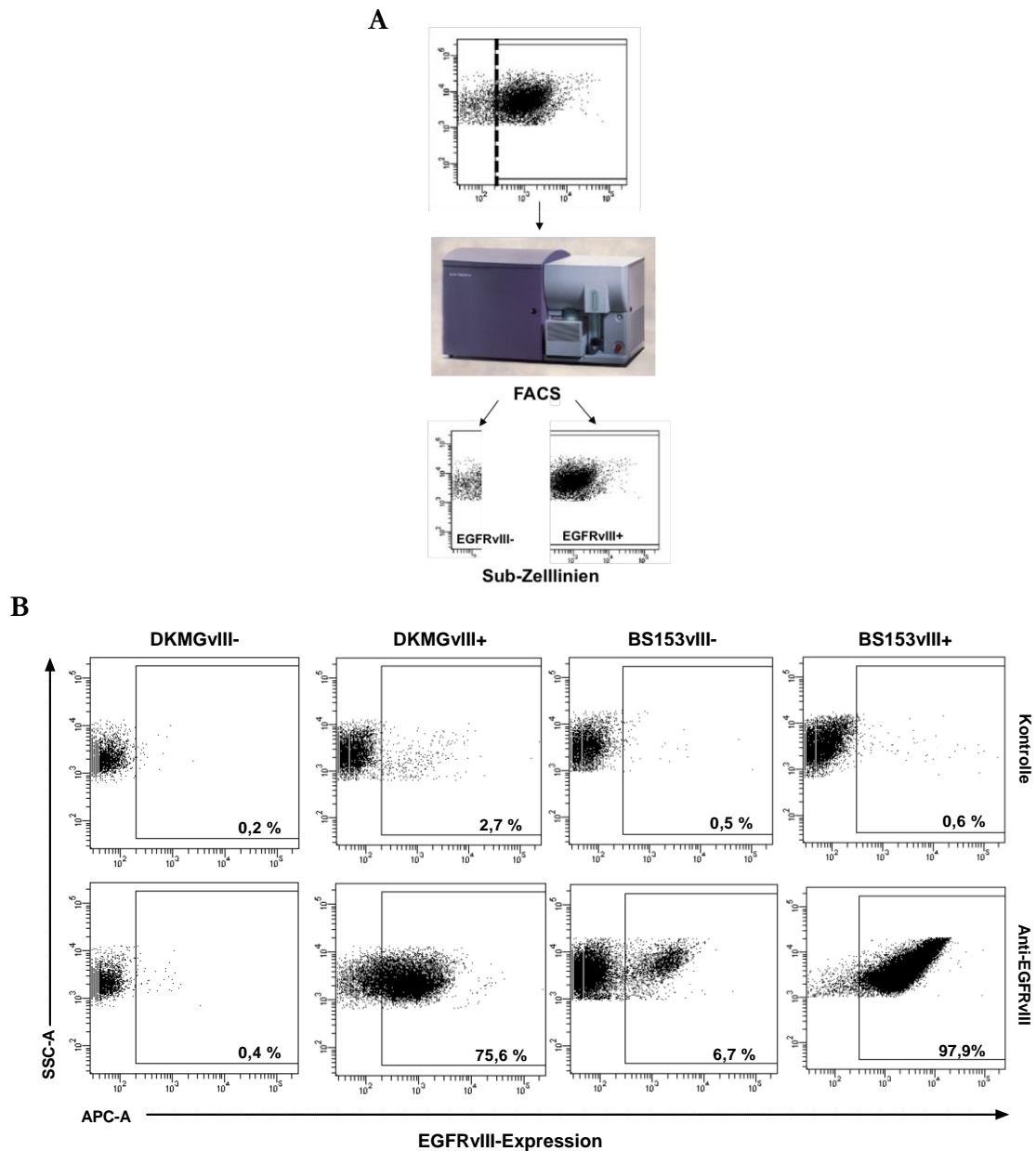
Die durchflusszytometrische Analyse bestätigte die Ergebnisse der Immunfluoreszenz (s. Abb. 4.3 B). Wie angenommen konnte in der U87MG-Population keine EGFRvIII-

Expression detektiert werden. Im Vergleich zu den DKMG-Zellen (11,7%) wiesen mehr BS153-Zellen (80,7%) eine EGFRvIII-Expression auf, die gleichzeitig auch stärker war. Lediglich 2,6% der Cas-1-Zellen exprimierten den EGFRvIII, was die *Western Blot*-Daten bestätigte (s. Abb. 4.1). Da die Cas-1-Zellen keine eindeutige EGFRvIII-Expression zeigten, wurden sie für nachfolgende Analysen nicht weiter verwendet.

Da die Immunfluoreszenz sowie die durchflusszytomterischen Analysen aufzeigten, dass es sich bei den DKMG- und BS153-Zellen um heterogene Populationen handelt, wurden anschließend EGFRvIII-negative (EGFRvIII<sup>-</sup>) sowie EGFRvIII-positive (EGFRvIII<sup>+</sup>) Sub-Zelllinien auf Basis der parentalen DKMG- sowie BS153-Populationen generiert. Auf diese Weise konnte der Einfluss der EGFRvIII-Expression, auf die Strahlenempfindlichkeit, EGFR *targeting* sowie die Chemosensitivität in einem isogenen Modellsystem mit endogener EGFRvIII-Expression untersucht werden.

Hierzu erfolgte zunächst die EGFRvIII-spezifische Färbung, um die EGFRvIII-negativen und EGFRvIII-exprimierenden Zellen anschließend mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) voneinander zu trennen (s. Abb. 4.4 A; s. Abschnitt 3.4.2). Um eine Kreuzkontamination zwischen den unterschiedlichen Populationen zu vermeiden, wurden enge Grenzen gesetzt. Nach 4-6 Passagen wurde die EGFRvIII-Expression in den neu generierten EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien mittels Durchflusszytometrie untersucht (s. Abb. 4.4 B)



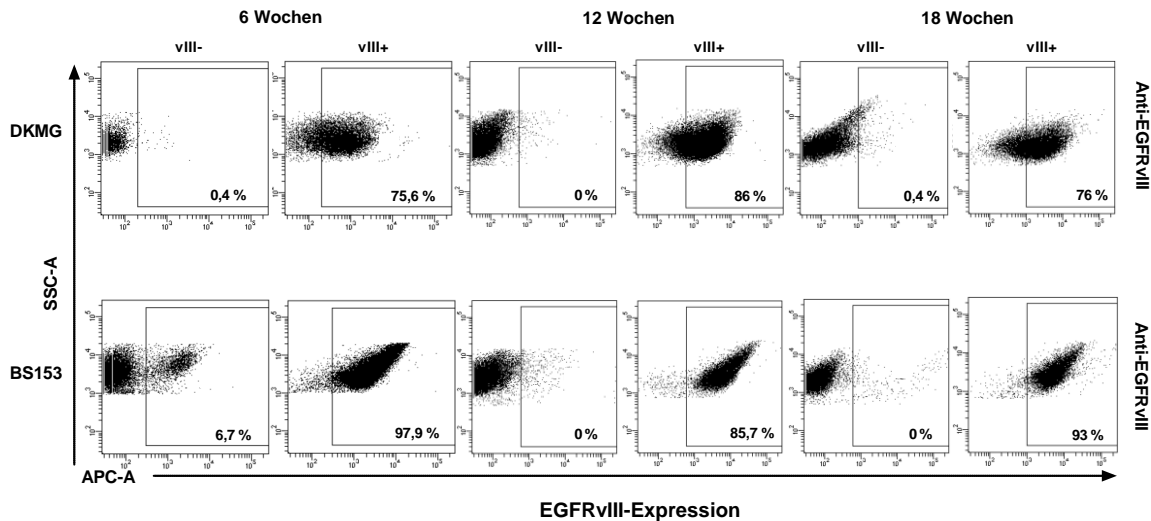


**Abb. 4.4: Generierung von EGFRvIII<sup>-</sup> und EGFRvIII<sup>+</sup> DKMG- und BS153-Sub-Zelllinien.**

(A) Schematische Darstellung der Zellsortierung. EGFRvIII<sup>-</sup> und EGFRvIII<sup>+</sup>-DKMG- und BS153-Zellen wurden mittels EGFRvIII-spezifischer Färbung und sich anschließender FACS-Analyse voneinander getrennt [135]; (B) Die EGFRvIII-Expression in den EGFRvIII<sup>-</sup> und EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien wurde nach 4-6 Passagen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen (*dot blots*). Der EGFRvIII (APC-A) wurde durch einen EGFRvIII-spezifischen Antikörper (Anti-EGFRvIII) detektiert. Eine sekundäre Antikörperkontrolle (Kontrolle) wurde mitgeführt, um unspezifische Bindungen des 2. Antikörpers einschätzen zu können (SSC-A; *side scatter*).

Diese Analysen zeigten, dass in der als DKMGvIII<sup>-</sup> bezeichneten Sub-Zelllinie nahezu keine EGFRvIII-exprimierenden Zellen mehr vorhanden waren, während 72,9% der Zellen in der entsprechenden DKMGvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinie EGFRvIII exprimierten. Die als BS153vIII<sup>-</sup> definierte Sub-Zelllinie wies hingegen noch 6,2% EGFRvIII-exprimierende

Zellen auf, wohingegen die BS153vIII+-Sub-Zelllinie mit 97,3% EGFRvIII-exprimierende Zellen nahezu vollständig EGFRvIII-positiv war. Um zu untersuchen, ob die EGFRvIII+-Sub-Zelllinien den EGFRvIII stabil exprimieren, wurden nach 6, 12 und 18 Wochen weitere durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 4.5 dargestellt.



**Abb. 4.5: Nachweis der EGFRvIII-Expression in DKMGvIII-/+ und BS153vIII-/+ Zellen über 6, 12 und 18 Wochen.** Die EGFRvIII-Expression in den EGFRvIII- und EGFRvIII+-Sub-Zelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie (*dot blots*) mit Hilfe eines EGFRvIII-spezifischen Antikörpers (APC-A) detektiert (SSC-A).

Wie aus Abbildung 4.5 ersichtlich wird, zeigte sich eine stabile EGFRvIII-Expression in DKMGvIII+- und BS153vIII+-Zellen über mehrere Wochen. Die EGFRvIII-Sub-Zelllinien exprimierten auch nach 18 Wochen weiterhin so gut wie keinen EGFRvIII. In der BS153vIII—Population, in der 6 Wochen nach der Trennung noch zu 6,7% EGFRvIII+-Zellen vorhanden waren, konnten nach 18 Wochen ebenfalls fast keine EGFRvIII-exprimierenden Zellen mehr detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass erfolgreich EGFRvIII- und EGFRvIII+ DKMG- und BS153-Sub-Zelllinien generiert werden konnten, die über mehrere Wochen in Zellkultur ihren Phänotyp aufrechterhielten.

#### 4.1.4 Charakterisierung der EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien

Um die generierten Sub-Zelllinien näher zu charakterisieren, wurden die DKMG- und BS153-Zellen zunächst hinsichtlich ihres PTEN/p53-Status sowie ihrer Anzahl an Chromosomen und ihres DNA-Gehaltes analysiert (s. Tab. 4.1).

**Tab. 4.1: Genetische Charakterisierung der EGFRvIII<sup>-</sup>/<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien**

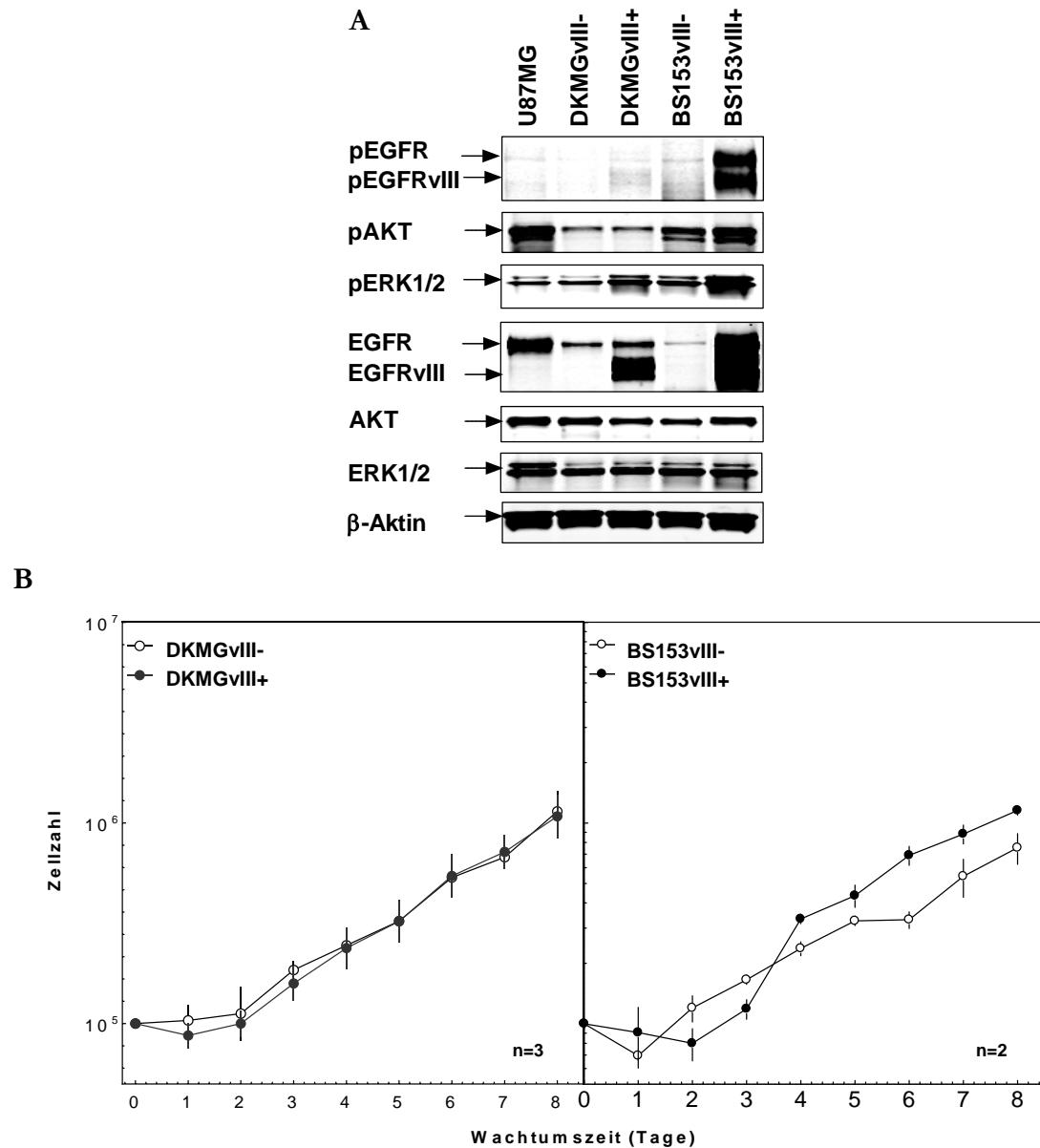
Parameter	DKMG		BS153	
	vIII <sup>-</sup>	vIII <sup>+</sup>	vIII <sup>-</sup>	vIII <sup>+</sup>
PTEN	C136Y	C136Y	T167A	T167A
P53	WT	WT	R248Q	R248Q
DNA-Gehalt*	1	1	1,9	1,9
Chromosomen**	43,6 (36-49)	43,6 (37-49)	81,3 (72-90)	80,7 (75-95)

\*x-facher Gehalt im Vergleich zu Lymphozyten; \*\*Mittelwert der Chromosomen (Min/Max)

Aus Tab. 4.1 wird deutlich, dass sowohl die DKMG- (C136Y) als auch die BS153-Zellen (T167A) Mutationen im PTEN-Gen aufwiesen. Des Weiteren konnte im p53-Gen der BS153-Zellen eine Mutation nachgewiesen werden (R248Q). Die DKMG-Zellen exprimierten hingegen p53-Wildtyp. Während die DKMG-Zellen einen einfachen DNA-Gehalt mit im Mittel 43,6 Chromosomen aufwiesen, konnte für die BS153-Zellen ein nahezu doppelter Chromosomensatz mit ca. 81 Chromosomen festgestellt werden. Auch die *Fingerprinting*-Analysen (s. Abschnitt 2.1) konnten keine Unterschiede zwischen den EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien feststellen, so dass der isogenetische Ursprung bestätigt werden konnte.

Anschließend wurde der Einfluss der EGFRvIII-Expression auf das EGFR *signaling* und das Zellwachstum in DKMGvIII<sup>-</sup>/<sup>+</sup>- und BS153vIII<sup>-</sup>/<sup>+</sup>-Zellen über mehrere Tage analysiert. Anhand der Abb. 4.6 A wird deutlich, dass EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen so gut wie keine EGFRvIII-Expression sowie EGFRvIII-Phosphorylierung aufwiesen, was die durchflusszytometrischen Analysen der Sub-Zelllinie bestätigt (s. Abb. 4.4). Darüber hinaus zeigten die EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien eine deutliche EGFRvIII-Expression und EGFRvIII-Phosphorylierung. Die BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen wiesen eine wesentlich stärkere EGFRvIII-Phosphorylierung als die DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen auf. Auch wurde eine erhöhte EGFR-Aktivierung in BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu U87MG-, DKMGvIII<sup>-</sup>/<sup>+</sup>-

sowie BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen beobachtet. Dieses spiegelte sich auch in einer verstärkten AKT- und ERK1-Aktivierung innerhalb der BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen wider. Die DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen wiesen keine Veränderung ihrer AKT-Aktivität auf, jedoch konnte im Vergleich zu DKMGvIII<sup>-</sup>-Zellen eine erhöhte ERK2-Phosphorylierung beobachtet werden

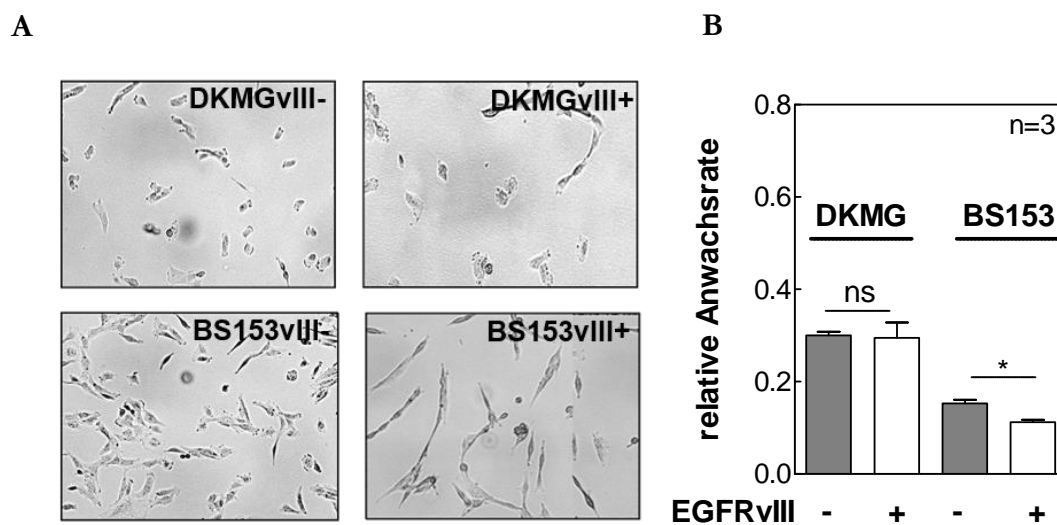


**Abb. 4.6: Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die zelluläre Signalweiterleitung und die Proliferation.** (A) Exponentiell wachsende U87MG-, DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurden 24 h nach Auslegen lysiert und anschließend auf die Expression von EGFR//pEGFR (Tyr1173), EGFRvIII//pEGFRvIII (Tyr1173), AKT/pAKT (Thr308) und ERK1/2//pERK1/2 (Thr202/Tyr204) mittels *Western Blot* analysiert. U87MG-Zellen dienen hierbei als EGFRvIII-negative Kontrollzelllinie. Die unterschiedlichen Proben wurden auf die Zellzahl normiert und jeweils die gleiche Menge Lysat auf das Gel aufgetragen.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Für die Erstellung der Wachstumskurve wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in Zellkulturflaschen ausgelegt und über acht Tage täglich die Zellzahl bestimmt.

In Hinblick auf die Proliferation zeigten DKMGvIII<sup>-</sup>- und DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen keinen Unterschied, während die BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen nach anfänglicher Verzögerung im Vergleich zu BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen nach vier Tagen eine erhöhte Wachstumsrate aufwiesen. Hierfür könnte die verstärkte Aktivierung von AKT und ERK1 in BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen verantwortlich gewesen sein (s. Abb 4.6 A + B).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten ableiten, dass die EGFRvIII-Expression nur zu einer moderaten Aktivierung des EGFR-abhängigen Signalweges führt, was letztlich nicht in einem signifikanten Proliferationsunterschied EGFRvIII-exprimierender Zellen resultierte.

Während der Kultivierung der EGFRvIII<sup>-</sup> und EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien wurde deutlich, dass sich die BS153vIII<sup>-</sup> und BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen in ihrer Morphologie unterschieden. Daher wurden mikroskopische Aufnahmen angefertigt, die in Abb. 4.7 A dargestellt sind. Des Weiteren wurde der Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die Klonogenität mittels Koloniebildungstests bestimmt.



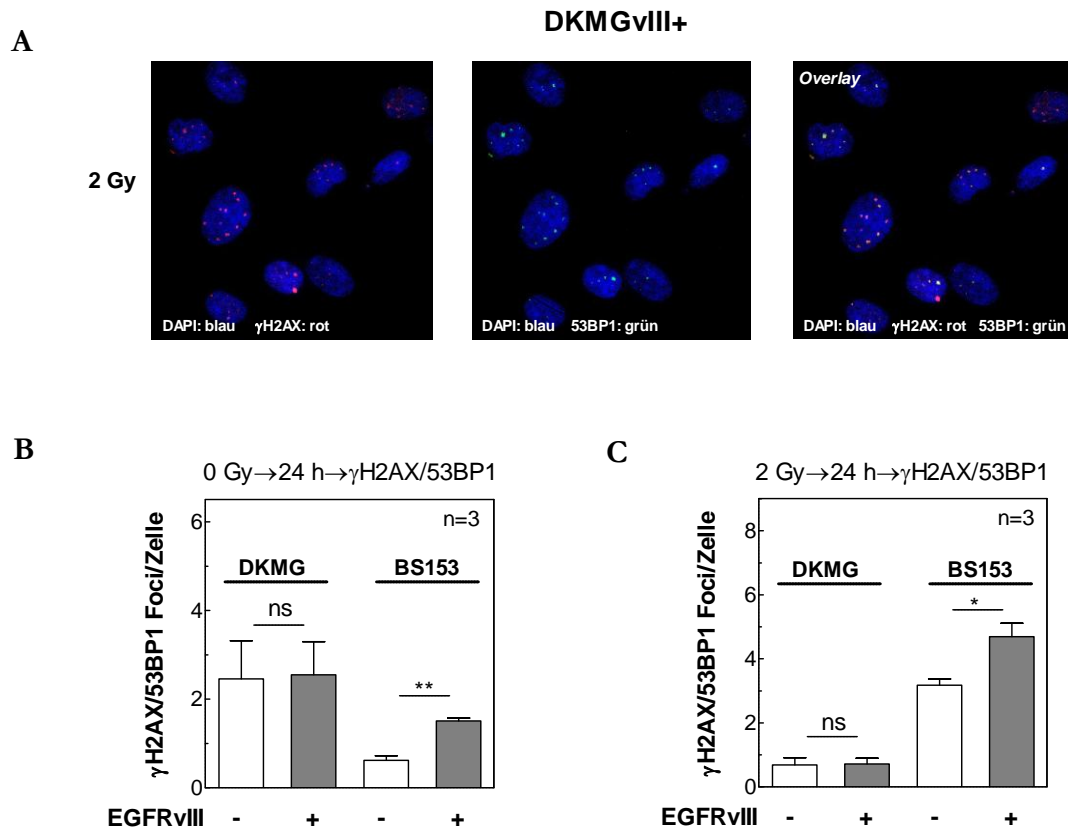
**Abb. 4.7. Einfluss der EGFRvIII-Expression auf Morphologie und Klonogenität.** (A) Die Morphologie von DKMGvIII<sup>-/+</sup> und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie (100x Vergrößerung) analysiert. (B) Die Klonogenität von DKMGvIII<sup>-/+</sup> und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurde im Koloniebildungstest ermittelt. Hierfür wurde die Anwachsrate (*plating efficiency*) nach 14–28 Tagen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Sechsfachbestimmungen inklusive SEM. Statistisch signifikant: \*  $p < 0,05$ ; (ungepaarter Studentischer t-Test).

Aus Abb. 4.7 A wird ersichtlich, dass BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen eine deutlich spindel-förmigere Morphologie aufwiesen, zudem waren die Zellen im Allgemeinen auch größer. Für die DKMGvIII<sup>-/+</sup>-Zellen konnte solch ein Unterschied in der Morphologie nicht beobachtet werden. Somit liegt dieser Unterschied vermutlich nicht

nur in der EGFRvIII-Expression begründet, sondern scheint auch durch andere Zelllinienspezifische Faktoren beeinflusst zu werden. Bezüglich der Anwachsrate der DKMGvIII<sup>-/+</sup>-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied ( $p=0,95$ ) festgestellt werden. Für die BS153vIII<sup>+/+</sup>-Zellen wurde jedoch eine signifikant ( $p=0,01$ ) geringere Anwachsrate beobachtet (s. Abb. 4.7 B).

#### 4.1.5 Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur und Strahlenempfindlichkeit

Da DSB ein Maß für die Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung sein können, wurde anschließend der Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die DNA-DSB-Reparatur analysiert. Hierzu wurden residuelle doppel-positive  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci 24 h nach 2 Gy Bestrahlung ausgezählt.

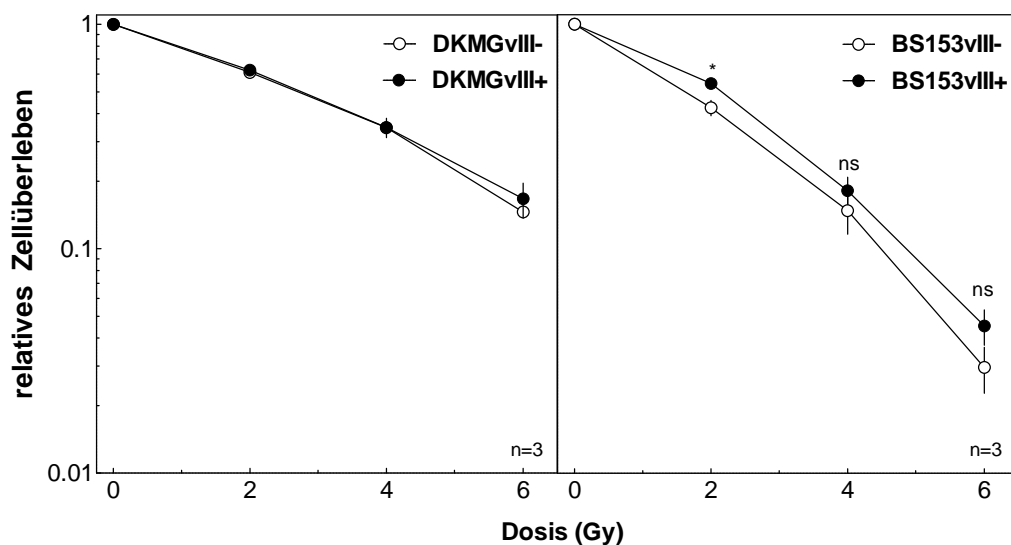


**Abb. 4.8. Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die DNA Reparaturkapazität von DKMG- und BS153-Zellen.** (A) Residuelle DSB wurden durch  $\gamma$ H2AX- (rot) und 53BP1- (grün) Immunfluoreszenzfärbung 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy in DKMGvIII<sup>+/+</sup>-Zellen nachgewiesen (blau: DNA Färbung mit DAPI). (B) Quantifizierung residueller  $\gamma$ H2AX/53BP1 doppel-positiver Foci in DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen im unbestrahlten Zustand. (C) Quantifizierung residueller  $\gamma$ H2AX/53BP1 doppel-positiver Foci in DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy. Die Anzahl der Foci in der unbestrahlten Probe wurde von der entsprechenden bestrahlten Probe abgezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Einfachbestimmungen inklusive SEM. Statistisch signifikant: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (ungepaarter Studentischer t-Test).

Im unbestrahlten Zustand wiesen DKMG-Zellen deutlich mehr  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci als die BS153-Zellen auf. Während sich jedoch in der Anzahl der DSB kein Unterschied zwischen den DKMGvIII<sup>-/-</sup> und DKMGvIII<sup>+/-</sup>-Zellen zeigte ( $p=0,94$ ), wiesen die BS153vIII<sup>+/-</sup> im Vergleich zu den BS153vIII<sup>-/-</sup>-Zellen signifikant mehr  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci auf (0,6 zu 1,5;  $p=0,002$ ).

Aus Abb. 4.8 C wird weiterhin ersichtlich, dass DKMGvIII<sup>-/-</sup> und DKMGvIII<sup>+/-</sup>-Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy in etwa die gleiche Anzahl an residuellen  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci aufwiesen ( $p=0,91$ ). Im Gegensatz hierzu zeigten sich in den BS153vIII<sup>+/-</sup>-Zellen signifikant mehr residuelle  $\gamma$ H2AX/53BP1 Foci im Vergleich zu den BS153vIII<sup>-/-</sup>-Zellen (3,2 zu 4,7;  $p=0,03$ ). Dies deutet auf eine verminderte DNA-Reparaturkapazität in BS153vIII<sup>+/-</sup>-Zellen hin, was sich auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit auswirken sollte.

Um den Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit von DKMGvIII<sup>-/+</sup> und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen zu bestimmen, wurden Koloniebildungstests nach 2, 4 und 6 Gy Röntgenbestrahlung durchgeführt (s. Abb. 4.9)



**Abb. 4.9: Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die Strahlenempfindlichkeit.** (A) Exponentiell wachsende DKMGvIII<sup>-/+</sup> und BS153vIII<sup>-/+</sup> Zellen wurden 24 h nach Auslegen mit 2, 4, 6 Gy bestrahlt und das klonogene Überleben nach 14-28 Tagen bestimmt. (*pre-plating*). Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Sechsfachbestimmungen inklusive SEM. Statistisch signifikant: \*  $p < 0,05$  (gepaarter Studentischer t-Test).

In Übereinstimmung mit den Daten, die im Rahmen der  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci-Analyse erhoben wurden (s. Abb. 4.8 C), konnte kein Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit von DKMGvIII<sup>-/-</sup> und DKMGvIII<sup>+/-</sup>-Zellen festgestellt werden. Für die BS153vIII<sup>+/-</sup>

Zellen jedoch, die deutlich mehr residuelle  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci nach 2 Gy Bestrahlung aufwiesen (s. Abb. 4.8 C), zeigte sich widererwartend eine leichte Tendenz zur Radioresistenz, die jedoch bei 4 Gy und 6 Gy nicht signifikant war ( $p_{2\text{Gy}}=0,03$ ;  $p_{4\text{Gy}}=0,46$ ;  $p_{6\text{Gy}}=0,22$ ). Somit zeigt sich, dass eine endogene EGFRvIII-Expression keinen bedeutenden Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit sowohl von DKMG- als auch BS153-Zellen hat.

## 4.2 Einfluss des EGFRvIII auf eine EGFR-Inhibition mittels Gefitinib

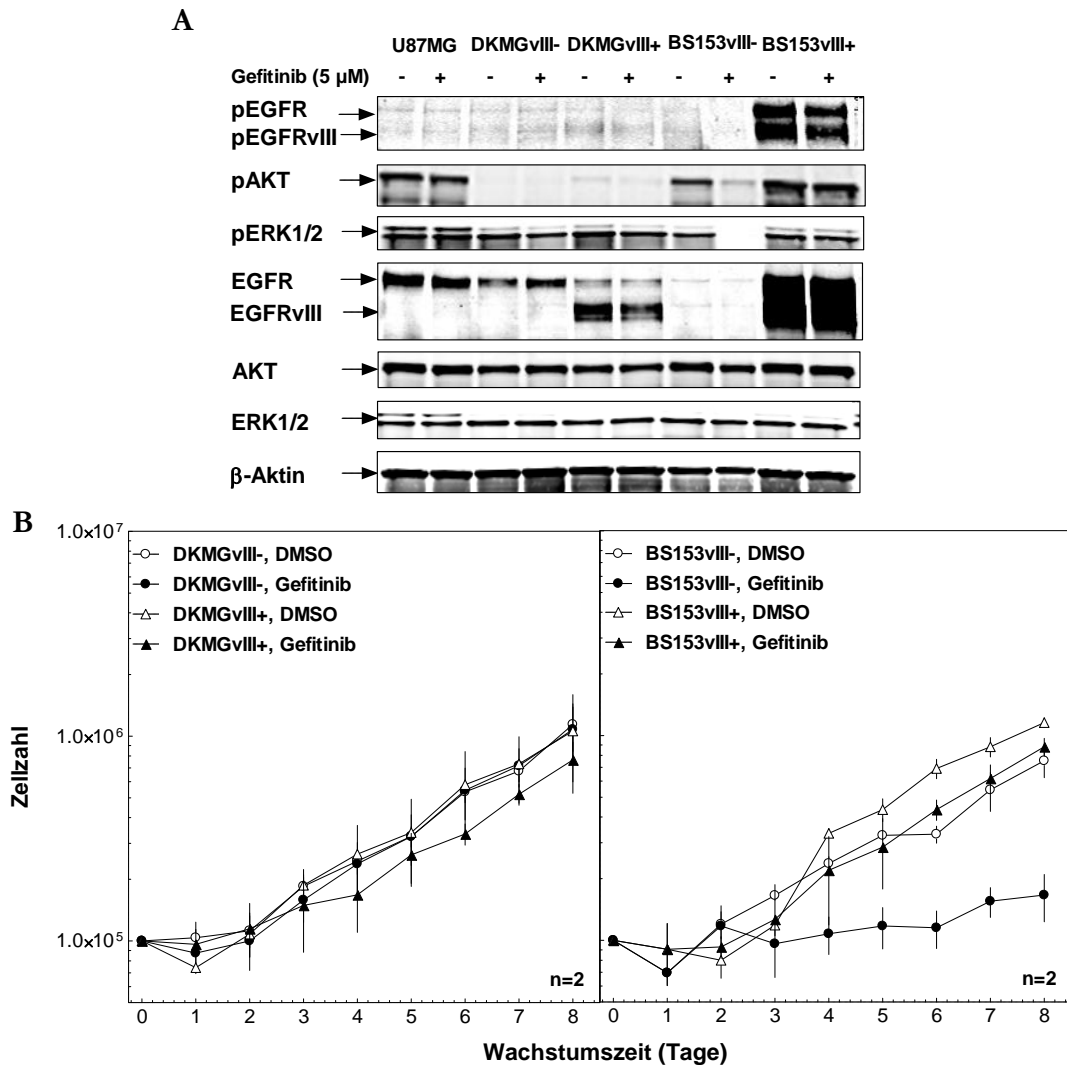
Für die nachfolgenden Analysen wurde der Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib verwendet, da dieser bereits in klinischen Studien als Monotherapie oder in Kombination mit Bestrahlung und/oder Chemotherapie eingesetzt wird [37-39]. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob eine EGFRvIII-Expression einen Einfluss auf das EGFR *targeting* hat und die Gefitinib-Behandlung zu einer erhöhten zellulären Strahlenempfindlichkeit von EGFRvIII-/+ Zellen nach Bestrahlung führt.

### 4.2.1 Einfluss von Gefitinib auf die EGFR-Signaltransduktion, Zellwachstum und Klonogenität in EGFRvIII - /+ -Sub-Zelllinien

Neben der zellulären Strahlenempfindlichkeit sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine EGFRvIII-Expression einen Einfluss auf die Wirkung von Gefitinib hat. Zunächst wurde der Effekt einer Gefitinib-Behandlung auf die Aktivierung des AKT- und des MAPK-Signalweges sowie auf das Wachstum der DKMGvIII-/+ und BS153vIII-/+ Zellen untersucht (s. Abb. 4.10 A+B). Hierfür wurden 5  $\mu$ M Gefitinib verwendet, da dies die Konzentration ist, die im Gehirn unter Therapie erreicht werden kann.

Anhand der Abbildung 4.10 A wird deutlich, dass die Gefitinib-Behandlung den größten Effekt auf die Signalweiterleitung in den BS153vIII- Zellen hatte, da hier die AKT-Phosphorylierung deutlich inhibiert und die ERK1/2-Phosphorylierung sogar vollständig unterdrückt wurde. Trotz Reduktion der basalen EGFR/EGFRvIII-Phosphorylierung in BS153vIII+ Zellen, war nahezu keine Inhibition der AKT- und ERK1/2-Aktivierung zu beobachten. Auch in den DKMGvIII-/+ Zellen konnte lediglich eine leichte Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung detektiert werden.



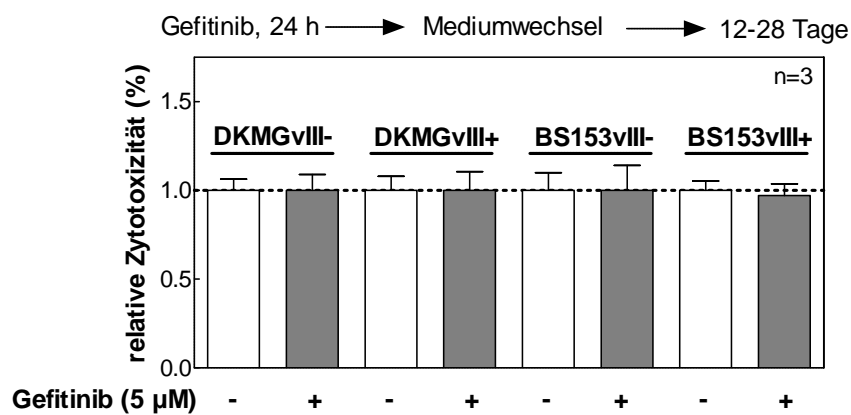


**Abb. 4.10: Einfluss von Gefitinib auf EGFR-abhängige Signalwege und Zellwachstum in DKMGvIII<sup>-/+</sup> und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen.** (A) U87MG, DKMGvIII<sup>-/+</sup> und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurden für 2 h mit 5  $\mu$ M Gefitinib bzw. DMSO als Kontrolle behandelt, anschließend lysiert und die Expression von EGFR//pEGFR (Tyr1173), EGFRvIII//pEGFRvIII (Tyr1173), AKT//pAKT (Thr308) und ERK1/2//pERK1/2 (Thr202/Tyr204) mittels *Western Blot* analysiert. Die unterschiedlichen Proben wurden auf die Zellzahl normiert und jeweils die gleiche Menge Lysat auf das Gel aufgetragen.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Für die Erstellung der Wachstumskurve wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgelegt, nach 24 h mit 5  $\mu$ M Gefitinib bzw. mit DMSO als Kontrolle behandelt und über acht Tage täglich die Zellzahl bestimmt. Für die jeweiligen DMSO Kontrollen wurden Werte verwendet, die bereits in Abb. 4.6 dargestellt sind. Abgebildet sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Einfachbestimmungen inklusive SEM.

Um zu überprüfen, ob die EGFR-Inhibition einen Einfluss auf die Proliferation von EGFRvIII<sup>-/-</sup> und EGFRvIII<sup>+/+</sup>-Zellen hat, wurden wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, Wachstumskurven der DKMGvIII<sup>-/+</sup> sowie BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen angefertigt (s. Abb. 4.10 B). Hierbei führte Gefitinib zu einer geringen Wachstumsverzögerung der DKMGvIII<sup>+/+</sup>-Zellen, während die Behandlung keinen Einfluss auf das Wachstum von DKMGvIII<sup>-/-</sup>-Zellen hatte. In Übereinstimmung mit den *Western Blot*-Daten, die eine starke Reduktion der AKT- sowie ERK1/2-Phosphorylierung zeigten (s. Abb. 4.10 A), resultierte

die Gefitinib-Behandlung in einer nahezu vollständigen Wachstumsinhibition der BS153vII<sup>-</sup>-Zellen. In den BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen bewirkte die Gefitinib Behandlung den in Abb. 4.10 A gezeigten Daten entsprechend, nur eine geringe Wachstumsverzögerung.

Um anschließend die zytotoxische Wirkung von Gefitinib auf DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen zu analysieren, wurde das klonogene Überleben mittels Koloniebildungstest bestimmt. Aus Abb. 4.11 wird ersichtlich, dass Gefitinib-Konzentration, die unter Therapie im Gehirn erreicht werden können, keinen Einfluss auf die Klonogenität von DKMGvIII<sup>-/+</sup>- sowie BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen hatte. In diesem Zusammenhang konnte darüber hinaus auch kein unterschiedliches Ansprechen auf die Gefitinib-Behandlung in EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen beobachtet werden.

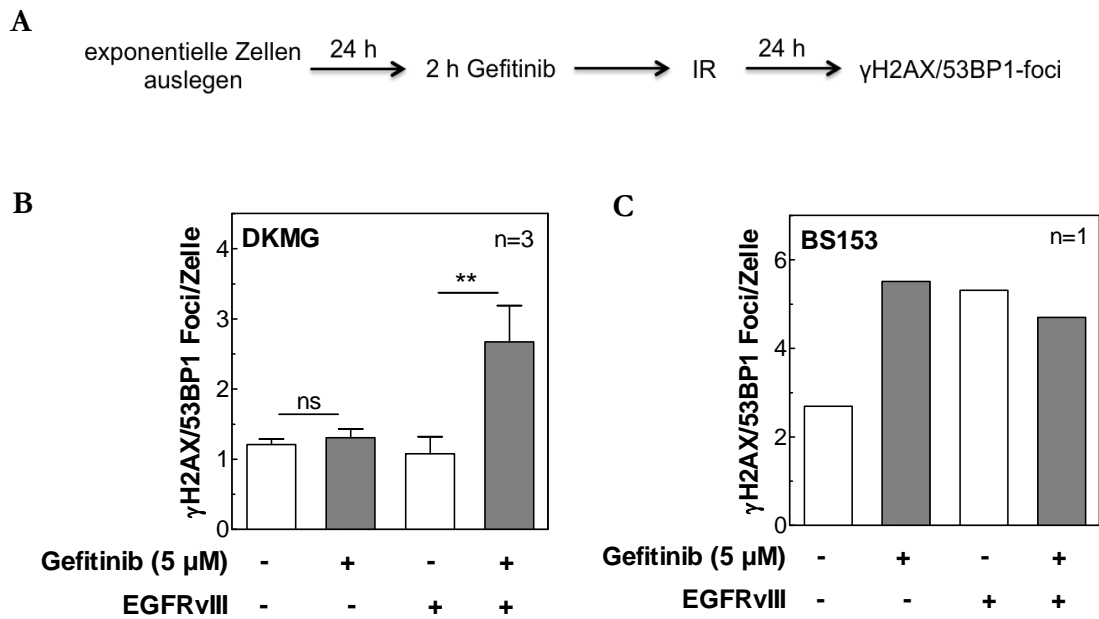


**Abb. 4.11: Einfluss von Gefitinib auf die Klonogenität von DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS13vIII<sup>-/+</sup>-Zellen.** Die relative zytotoxische Wirkung von Gefitinib wurde mittels Koloniebildungstest bestimmt. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit 5 µM Gefitinib behandelt und die Anwachsrate (*plating efficiency*) nach 12-28 Tagen bestimmt. Dargestellt sind die auf die DMSO-Kontrolle normierten Mittelwerte dreier unabhängiger Sechsfachbestimmungen inklusive SEM.

Diese Ergebnisse deuten an, dass physiologische Konzentrationen von Gefitinib, die unter Therapie im Gehirn von Patienten erreichbar sind, keinen starken Einfluss auf das zelluläre Überleben von EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen haben (s. Abb. 4.11). Jedoch unterscheiden sich die Sub-Zelllinien in ihrem Ansprechen auf die EGFR-Inhibition hinsichtlich der Signaltransduktion und Proliferation. Dies war besonders stark bei BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen ausgeprägt bei denen die Gefitinib-Behandlung zu einer nahezu vollständigen Inhibition des AKT- und MAPK-Signalweges sowie zu einer deutlichen Wachstumsinhibition führte.

#### 4.2.2 Einfluss von Gefitinib auf die DNA-Doppelstrangbruchreparatur und zelluläre Strahlenempfindlichkeit in EGFRvIII-/+ Sub-Zelllinien

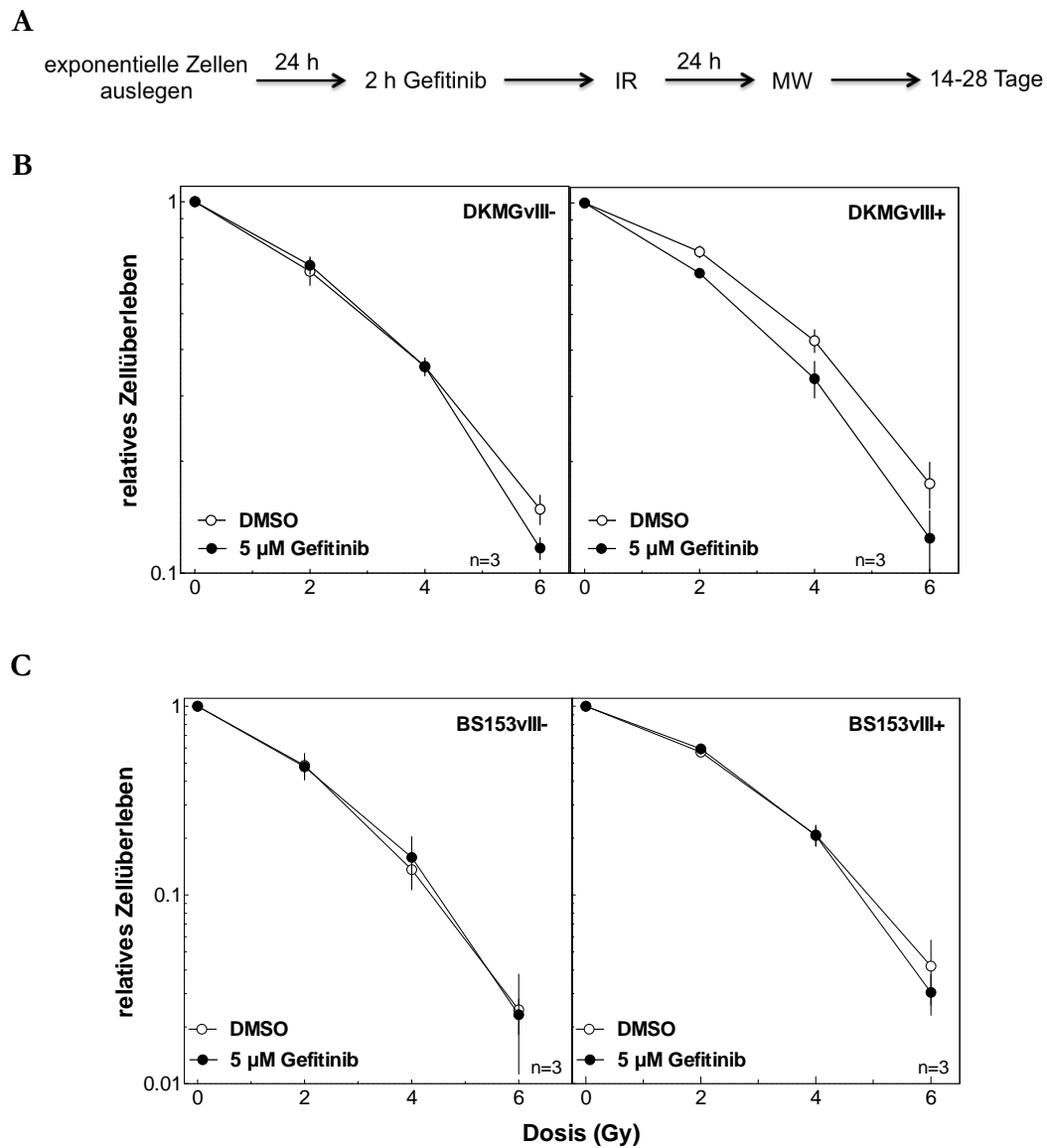
Um die Strahlenempfindlichkeit der DKMGvIII-/+ und BS153vIII-/+ Sub-Zelllinien nach EGFR-Inhibition zu analysieren, wurden die Zellen 2 h mit Gefitinib behandelt, anschließend bestrahlt und nach 24 h die Anzahl der residuellen DSB mittels Detektion von  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci ermittelt (s. Abb. 4.12).



**Abb. 4.12: Einfluss der EGFR Inhibition auf die DNA Reparatur-Kapazität von DKMGvIII-/+ und BS153-Zellen.** (A) Schematischer Ablauf der  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Färbung. (B) DKMGvIII-/+ und (C) BS153vIII-/+ Zellen wurden 24 h nach Auslegen für 2 h mit 5  $\mu$ M Gefitinib behandelt und anschließend mit 2 Gy bestrahlt. Residuelle DSB-Reparaturfoci wurden 24 h nach Bestrahlung durch  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Die Anzahl der Reparaturfoci in der unbestrahlten Probe wurde von der entsprechenden bestrahlten Probe abgezogen. Für die DKMGvIII-/+ Zellen sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Einfachbestimmungen inklusive SEM dargestellt. Statistisch signifikant: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (gepaarter Studentscher t-Test).

DKMGvIII- Zellen zeigten nach EGFR-Inhibition und Bestrahlung mit 2 Gy keinen signifikanten Anstieg ( $p=0,55$ ) residueller  $\gamma$ H2A/53BP1-Foci. DKMGvIII+ Zellen wiesen hingegen nach Gefitinib-Behandlung signifikant ( $p=0,0085$ ) mehr residuelle Foci auf (1,1 zu 2,7), was auf eine verminderte DNA-Reparaturkapazität hindeutete. In BS153vIII- Zellen konnten nach Gefitinib-Behandlung ebenfalls deutlich mehr residuelle  $\gamma$ H2A/53BP1-Foci (2,7 zu 5,5) detektiert werden. Im Gegensatz dazu wiesen die BS153vIII+ Zellen nach Gefitinib-Behandlung sogar weniger  $\gamma$ H2A/53BP1-Foci auf (5,3 zu 4,7).

Um zu überprüfen, ob sich die verminderte DNA-Reparaturkapazität nach Gefitinib-Behandlung auch auf das zelluläre Überleben nach Bestrahlung auswirkt, wurden Koloniebildungstests nach 2, 4 und 6 Gy Röntgenbestrahlung durchgeführt. Das Ergebnis der Analysen ist in Abbildung 4.13 dargestellt.



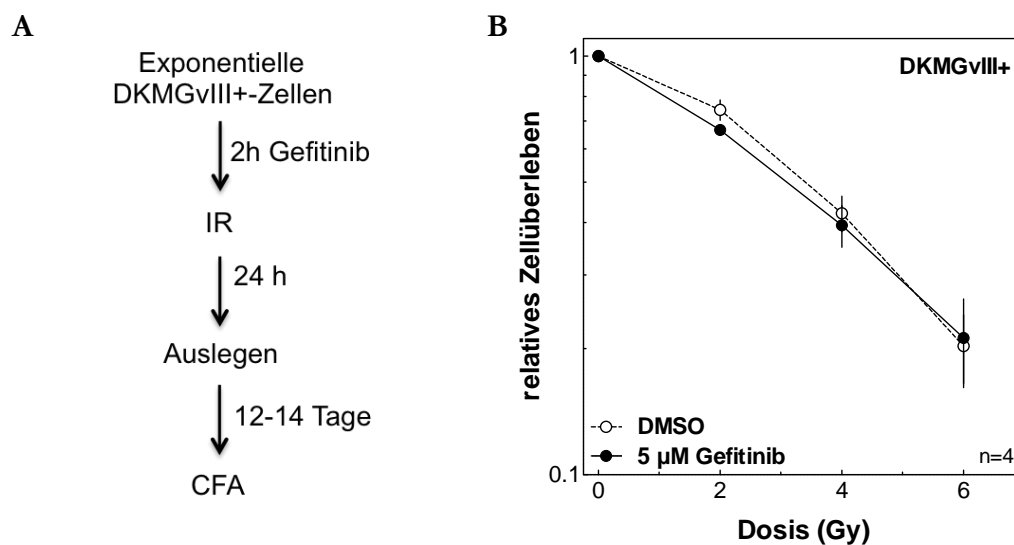
**Abb. 4.13: Einfluss der EGFR-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit.** (A) Schematischer Ablauf des Koloniebildungstests unter *pre-plating*-Bedingungen. (B,C) Klonogenes Überleben von (B) DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und (C) BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen nach 5 μM Gefitinib wurde mittels Koloniebildungstest bestimmt. Exponentiell wachsende DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurden 24 h nach Auslegen für 2 h mit 5 μM Gefitinib behandelt und anschließend mit 2, 4, 6 Gy bestrahlt (*pre-plating*). Das Zellüberleben wurde nach 14-28 Tagen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Sechsfachbestimmungen inklusive SEM.

Wie aus Abb. 4.13 B deutlich wird, hatte die Gefitinib-Behandlung in den DKMGvIII<sup>-/-</sup>-Zellen keinen Anstieg der Strahlenempfindlichkeit zur Folge, während sich die DKMGvIII<sup>+/+</sup>-Zellen durch EGFR-Inhibition radiosensitivieren ließen. Für die

BS153vIII-/+ -Zellen konnte im Gegensatz dazu nach Gefitinib-Behandlung in keiner der beiden Sub-Zelllinien eine Radiosensitivierung beobachtet werden (s. Abb. 4.13 C).

Da wie in Abb. 4.13 B gezeigt, lediglich die DKMGvIII+ -Zellen nach Gefitinib-Behandlung eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit aufwiesen, sollte in weiterführenden Versuchen geklärt werden, ob Zellzykluseffekte für die beobachtete Radiosensitivierung verantwortlich waren.

DKMG-Zellen exprimieren im Gegensatz zu BS153-Zellen p53-Wildtyp. Es konnte für Zellen, die p53-Wildtyp exprimieren, gezeigt werden, dass eine Radiosensitivierung nach EGFR-Inhibition in Zellen mit intakten p53/p21- Signaling auch auf einem G1-Arrest basieren kann. Dieser G1-Arrest kann durch Re-Platieren (Re-Stimulation) der Zellen wieder aufgehoben werden, was gleichzeitig auch die Sensitivierung aufhebt [136]. Um zu überprüfen, ob der Anstieg der zellulären Strahlenempfindlichkeit in DKMGvIII+ -Zellen an Foci, oder wie beschrieben ein möglicher Zellzyklusarrest für die Radiosensitivierung verantwortlich ist, wurden exponentiell wachsende DKMGvIII+ -Zellen zunächst für 2 h mit Gefitinib behandelt, anschließend bestrahlt und nach 24 h re-platiert. Diese Art des Koloniebildungstests wird auch als *delayed plating* bezeichnet (s. Abschnitte 3.1.5.1).



**Abb. 4.14: Einfluss von Gefitinib auf die Strahlenempfindlichkeit von DKMGvIII+ -Zellen unter *delayed plating*-Bedingungen.** (A) Schematischer Ablauf des Koloniebildungstests unter *delayed plating*-Bedingungen. (B) Exponentiell wachsende DKMGvIII+ -Zellen wurden vier Tage nach Auslegen für 2 h mit 5 µM Gefitinib oder mit DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend mit 2, 4, 6 Gy bestrahlt. Nach 24 h wurden die Zellen für den Koloniebildungstest ausgelegt. Das relative Zellüberleben wurde nach 12-14 Tagen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte vierer unabhängiger Sechsfachbestimmungen inklusive SEM.

Wie aus Abbildung 4.14 B hervorgeht, zeigte sich im Gegensatz zu *pre-plating* Bedingungen unter *delayed plating*-Bedingungen keine erhöhte Strahlenempfindlichkeit von DKMGvIII+ -Zellen nach EGFR-Inhibition. Dieses Ergebnis zeigt, dass die unter *pre-plating* Bedingungen

beobachtete Radiosensitivierung (s. Abb. 4.13 B) reversibel ist und deutet somit an, dass sie nicht Folge einer verminderten DNA-Reparaturkapazität (s. Abb. 4.12 B), sondern auf einen transienten G1-Arrest zurückzuführen war.

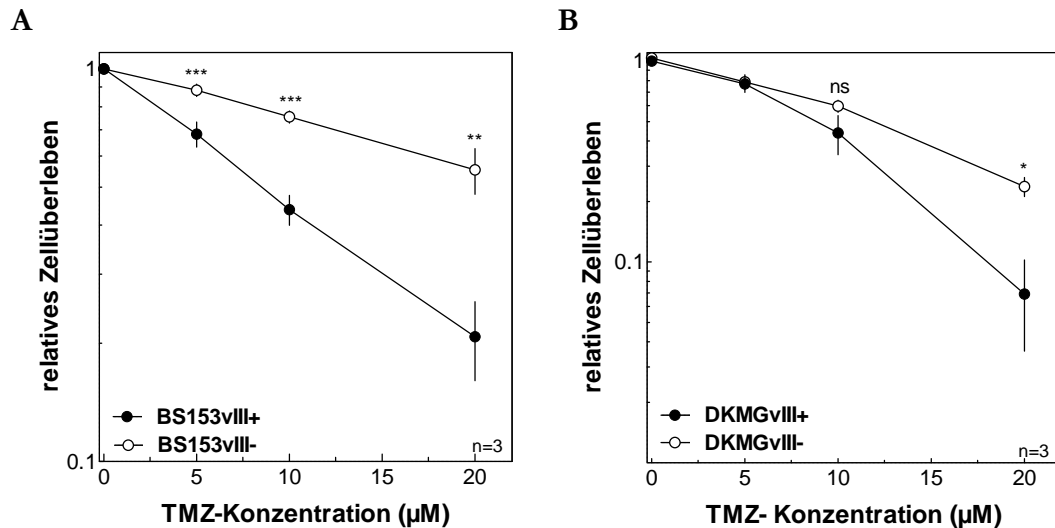
Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass physiologische Gefitinib-Konzentrationen weder in EGFRvIII<sup>-</sup>- noch in EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen zu einer robusten Zellinaktivierung mit und ohne Bestrahlung führten und eine EGFRvIII<sup>+</sup>-Expression somit keinen Einfluss auf das EGFR *targeting* zu haben scheint.

### **4.3 Bedeutung einer EGFRvIII-Expression für die Empfindlichkeit gegenüber Temozolomid**

#### **4.3.1 Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die Temozolomid-Sensitivität**

Da neben der Röntgenbestrahlung auch die Behandlung mit TMZ zur Standardtherapie des GBMs gehört, sollte der Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die TMZ-Sensitivität mittels Koloniebildungstest untersucht werden. Aufgrund der Beobachtung, dass die DKMGvIII<sup>-</sup>/+ und BS153vIII<sup>-</sup>/+ Zellen unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeiten aufwiesen (s. Abb 4.6 B) und die Wirkung von TMZ proliferationsabhängig ist, wurden die Sub-Zelllinien für insgesamt drei Tage mit TMZ behandelt. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass alle Zellen zumindest eine Replikationsrunde unter TMZ-Behandlung durchlaufen haben.

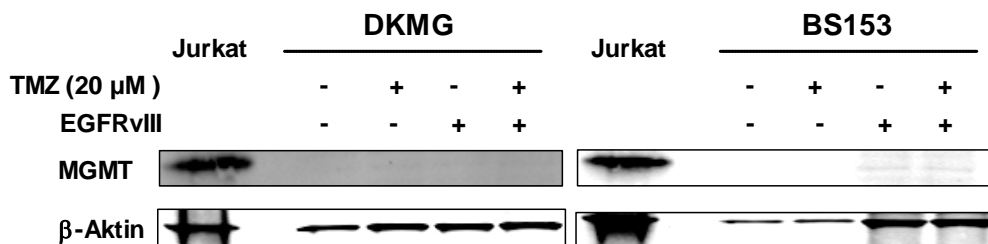
Aus Abbildung 4.15 wird deutlich, dass sowohl DKMGvIII<sup>-</sup>/+ als auch BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu den EGFRvIII<sup>-</sup>-Sub-Zelllinien eine erhöhte Sensitivität gegenüber TMZ aufwiesen. Dieser Effekt war bei den BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen mit hoher EGFRvIII-Expression, stärker ausgeprägt. Die LD<sub>50</sub> der DKMGvIII<sup>-</sup>-Zellen betrug 9 µM TMZ, während die LD<sub>50</sub> der DKMGvIII<sup>-</sup>-Zellen bei 12 µM TMZ lag. Für die BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen lag die LD<sub>50</sub> über 20 µM TMZ, wohingegen die BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen eine LD<sub>50</sub> von 9 µM TMZ aufwiesen.



**Abb. 4.15: Chemosensitivität von EGFRvIII<sup>-/-</sup> und EGFRvIII<sup>+/+</sup>-Zellen.** Das klonogene Überleben von (A) DKMGvIII<sup>-/+</sup>-Zellen und (B) BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen nach 5, 10, 20 µM TMZ-Behandlung (*pre-plating*) wurde mittels Koloniebildungstest bestimmt. Exponentiell wachsende DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurden 24 h nach Auslegen für drei Tage mit TMZ behandelt. Das Zellüberleben wurde nach 14-28 Tagen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Sechsfachbestimmungen inklusive SEM. Statistisch signifikant: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (gepaarter Studentischer t-Test)

Im Detail zeigte sich für die BS153vIII<sup>+/+</sup>-Zellen bereits bei 5 µM eine signifikant erhöhte TMZ-Sensitivität im Vergleich zu BS153vIII<sup>-/-</sup>-Zellen ( $p_{5\mu\text{M}}=0,0008$ ;  $p_{10\mu\text{M}}=0,0004$ ;  $p_{10\mu\text{M}}=0,0089$ ) während der Effekt bei den DKMGvIII<sup>+/+</sup>-Zellen erst bei 20 µM TMZ signifikant war ( $p_{5\mu\text{M}}=0,99$ ;  $p_{10\mu\text{M}}=0,183$ ;  $p_{10\mu\text{M}}=0,00163$ ).

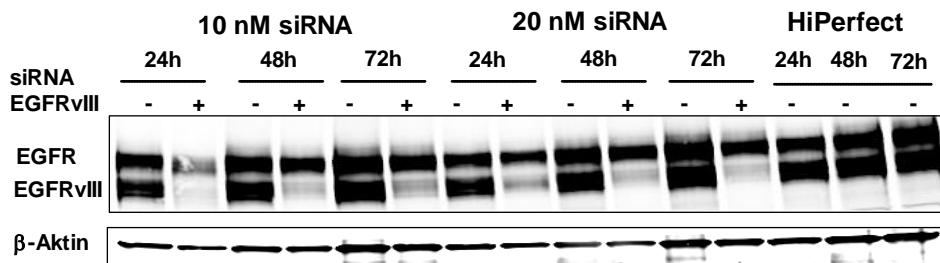
Da bekannt ist, dass die Expression des DNA Reparaturenzyms MGMT auch zu einer erhöhten Resistenz gegenüber TMZ führen kann, wurde die basale MGMT-Expression sowie die nach TMZ-Behandlung in den EGFRvIII<sup>-/-</sup> und EGFRvIII<sup>+/+</sup>-Sub-Zelllinien untersucht.



**Abb. 4.16: Einfluss der TMZ-Behandlung auf die Expression von MGMT.** DKMGvIII<sup>-/+</sup> und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurden für 24 h mit 20 µM TMZ bzw. DMSO als Kontrolle behandelt, anschließend lysiert und die Expression von MGMT mittels *Western Blot* untersucht. Als Positivkontrolle für die MGMT-Expression dienten Jurkat-Zellen. Die unterschiedlichen Proben wurden auf die Zellzahl normiert und jeweils die gleiche Menge Lysat auf das Gel aufgetragen. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Anhand der Abbildung 4.16 wird deutlich, dass weder DKMGvIII<sup>-/+</sup>-Zellen noch BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen MGMT exprimierten und dass die TMZ-Behandlung für 24 h in keiner der Sub-Zelllinien zur Induktion der MGMT-Expression führte. Auch nach 48 h und 72 h TMZ-Behandlung konnte keine erhöhte MGMT-Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit basierte die erhöhte TMZ-Resistenz der EGFRvIII<sup>-</sup>-Zelllinien (s. Abb. 4.15) nicht auf einer durch TMZ-induzierten MGMT-Expression.

Um zu bestätigen, dass die EGFRvIII-Expression für die erhöhte TMZ-Sensitivität von EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen verantwortlich ist, wurde ein EGFRvIII-spezifischer *knock down* etabliert. Hierzu wurde zunächst eine Kinetik mit BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen und zwei unterschiedlichen siRNA-Konzentrationen durchgeführt, um den Zeitpunkt der effektivsten EGFRvIII-Herunterregulation zu bestimmen (s. Abb 4.17).



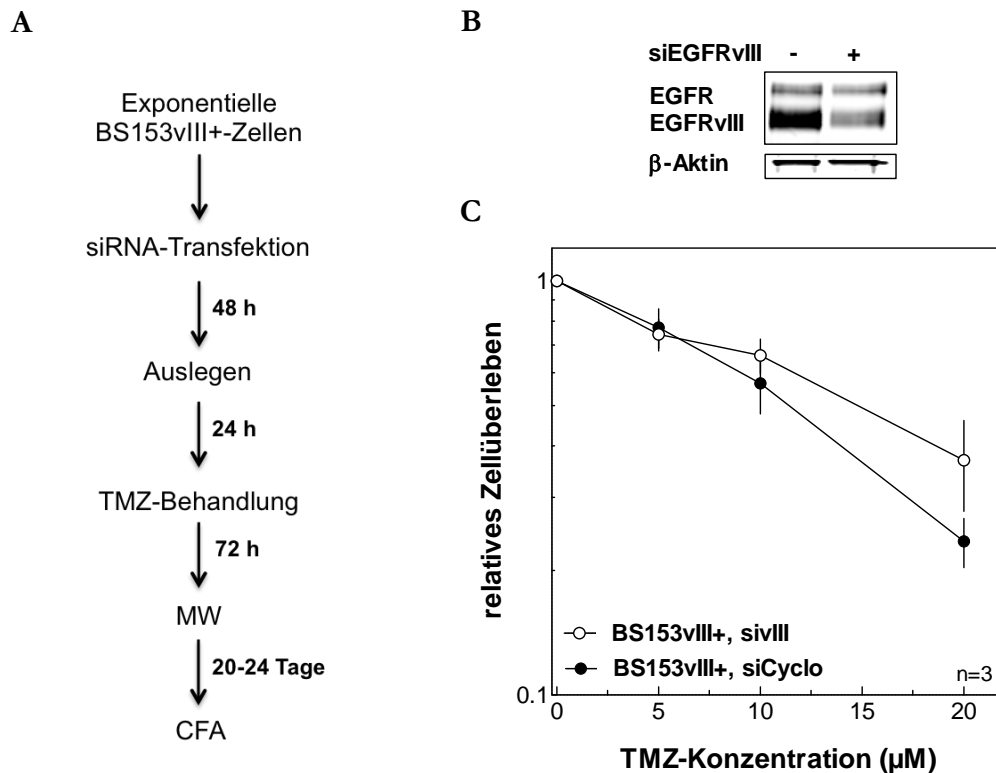
**Abb. 4.17: EGFRvIII-spezifischer siRNA *knock down*.** Exponentiell wachsende BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen wurden mit 10 nM bzw. 20 nM EGFRvIII-spezifischer oder Cyclophilin B-spezifischer siRNA als Kontrolle transfiziert. Die Effizienz des EGFRvIII-spezifischen *knock downs* wurde nach 24, 48 und 72 h durch den Nachweis der EGFR- sowie EGFRvIII-Expression überprüft. Um auszuschließen, dass das Transfektionsreagenz HiPerfect einen Einfluss auf die EGFRvIII-Expression hat, wurden Zellen nur mit HiPerfect ebenfalls für 24, 48 und 72 h behandelt. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Wie in Abb. 4.17 zu sehen ist, war der EGFRvIII *knock down* nach 20 nM siRNA und 72 h am effektivsten und führte im Vergleich zur Cyclophilin B-Kontrolle zu einer deutlichen Reduktion der EGFRvIII-Expression. Das Transfektionsreagenz allein hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die EGFRvIII-Expression.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Leonie Ott wurde deutlich, dass eine Transfektion mit 30 nM EGFRvIII-spezifischer siRNA einen noch effizienteren *knock down* erzielen konnte. Aus diesem Grund wurden die BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen anschließend mit 30 nM EGFRvIII-spezifischer siRNA transfiziert und nach 48 h für den Koloniebildungstest ausgelegt. Nach weiteren 24 h erfolgte schließlich die Behandlung mit TMZ, da an diesem Zeitpunkt die Reduktion der EGFRvIII-Expression am deutlichsten ausgeprägt war. Das Ergebnis der Koloniebildungstests ist in Abb. 4.18 dargestellt.



Wie in Abb. 4.18 zu sehen ist, zeigte sich im Falle einer erfolgreichen Herunterregulation des EGFRvIII eine erhöhte Resistenz gegenüber TMZ im Vergleich zur Cyclophilin-B-Kontrolle. Somit zeigte sich, dass die TMZ-Sensitivität von BS153vIII+-Zellen auf die EGFRvIII-Expression an sich zurückzuführen war.

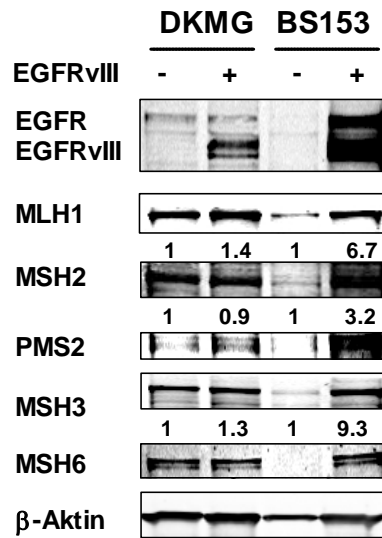


**Abb. 4.18: Einfluss des EGFRvIII *knock downs* auf die TMZ-Sensitivität von BS153vIII+-Zellen.** (A) Schematischer Ablauf des Koloniebildungstests. Exponentiell wachsende BS153vIII+-Zellen wurden mit 30 nM EGFRvIII-spezifischer oder Cyclophilin B-spezifischer siRNA als Kontrolle transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für den Koloniebildungstest ausgelegt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Behandlung mit 5, 10 und 20 µM TMZ für drei Tage. Anschließend folgte ein Mediumwechsel (MW). Das relative Zellüberleben wurde nach 20-24 Tagen bestimmt. (B) Die Effizienz des EGFRvIII-spezifischen *knock downs* wurde nach 48 h mittels *Western Blot* durch den Nachweis der EGFR- sowie EGFRvIII-Expression überprüft. β-Aktin diente als Ladekontrolle. (C) Das klonogene Überleben von BS153vIII+-Zellen wurde nach TMZ-Behandlung mittels Koloniebildungstest ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Sechsfachbestimmungen inklusive SEM.

#### 4.3.2 Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die *Mismatch* Reparatur

In Abschnitt 4.3.1 konnte gezeigt werden, dass eine EGFRvIII-Expression in MGMT-negativen DKMG- und BS153-Zellen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum TMZ führt. Da die Wirkung von TMZ in Zellen, die kein MGMT exprimieren größtenteils auf intakter MMR beruht, wobei eine erhöhte Expression von MMR-Proteinen mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber alkylierenden Substanzen assoziiert ist [137], wurde die Expression der MMR-Proteine MLH1, MSH2, MSH3,

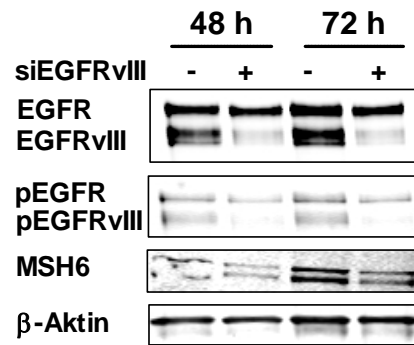
MSH6, PMS2 in DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen analysiert. Die Detektion der MMR-Proteine in DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen ist in Abbildung 4.19 dargestellt.



**Abb. 4.19: Einfluss des EGFRvIII auf die Expression von MMR-Proteinen.** Exponentiell wachsende DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurden 24 h nach Auslegen lysiert und die Expression von MLH1, MSH2, PMS2, MSH3 und MSH6 mittels *Western Blot* analysiert. Die unterschiedlichen Proben wurden auf die Zellzahl normiert und jeweils die gleiche Menge Lysat auf das Gel aufgetragen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Zur Quantifizierung wurde die Proteinexpression auf β-Aktin und die EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen normiert. Eine Quantifizierung für PMS2 und MSH6 wurde aufgrund des starken Hintergrundes nicht durchgeführt.

Es zeigte sich, dass DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu DKMGvIII<sup>-</sup>-Zellen eine erhöhte Expression der Proteine MLH1 sowie PMS2 aufwiesen. In BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen wurden hingegen alle an der MMR beteiligten Proteine im Vergleich zu BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen verstärkt exprimiert. Auffällig war, dass die BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen keine mittels *Western Blot* detektierbare MSH6-Expression aufwiesen. Diese Daten deuten an, dass die erhöhte TMZ-Sensitivität von EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen auf eine erhöhte MMR-Protein-Expression zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression von MSH6 nach EGFRvIII *knock down* untersucht (s. Abb. 4.20).

Bei erfolgreichem *knock down* von EGFRvIII zeigte sich auch eine verminderte MSH6-Expression vor allem 72 h nach siRNA-Transfektion. Die *knock down* Kontrolle zeigte eine erfolgreiche Reduktion der EGFRvIII-Expression.



**Abb. 4.20: Einfluss des EGFRvIII-knock downs auf die Expression von MSH6.** Exponentiell wachsende BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen wurden mit 30 nM EGFRvIII-spezifischer siRNA transfiziert und nach 48 h und 72 h lysiert. Hierbei diente Cyclophilin B-siRNA als Kontrolle (-). Die Expression von EGFR//pEGFR (Tyr1173), EGFRvIII//pEGFRvIII (Tyr1173) sowie MSH6 wurde anschließend mittels *Western Blot* analysiert.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

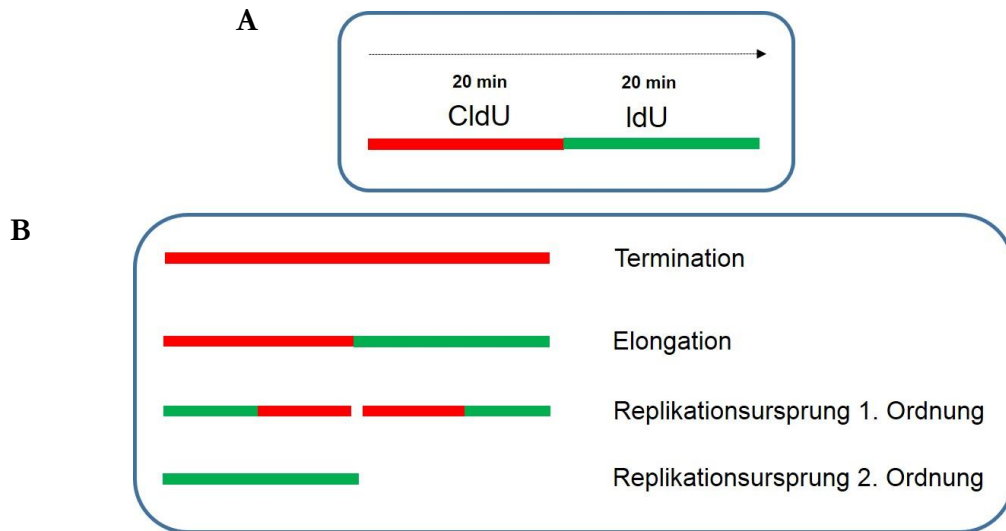
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine EGFRvIII-Expression zu einer erhöhten Sensitivität von GBM-Zellen gegenüber TMZ führt und diese mit einer gesteigerten MMR-Protein-Expression in EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen einhergeht.

### 4.3.3 Einfluss des EGFRvIII auf die zelluläre Replikation

Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.1 und 4.3.2 zeigten, dass EGFRvIII-Expression zu einer erhöhten TMZ-Sensitivität von EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen führt und hierfür möglicherweise eine gesteigerte MMR-Kapazität die Ursache ist. Daher stellte sich die Frage, warum EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen eine erhöhte MMR-Proteinexpression bzw. MMR-Kapazität aufwiesen. Eine Möglichkeit, die zu einer gesteigerten DNA-Reparatur führen kann, ist ein andauernder Replikationsstress, wie er u.a. durch die Expression von Onkogenen induziert werden kann. Replikationsstress kann beispielsweise die Folge erhöhter Level an reaktiven Sauerstoffspezies sein, die zu Einzelstrangbrüchen führen. Die Einzelstrangbrüche können in angehaltenen Replikationsgabeln resultieren, die wiederum kollabieren können, so dass in der S-Phase replikationsabhängige DSB entstehen. Um diese Schäden reparieren zu können, regulieren einige Tumorzellen verschiedene DNA-Reparaturwege hoch, z.B. über die verstärkte Expression der entsprechenden Proteine [118].

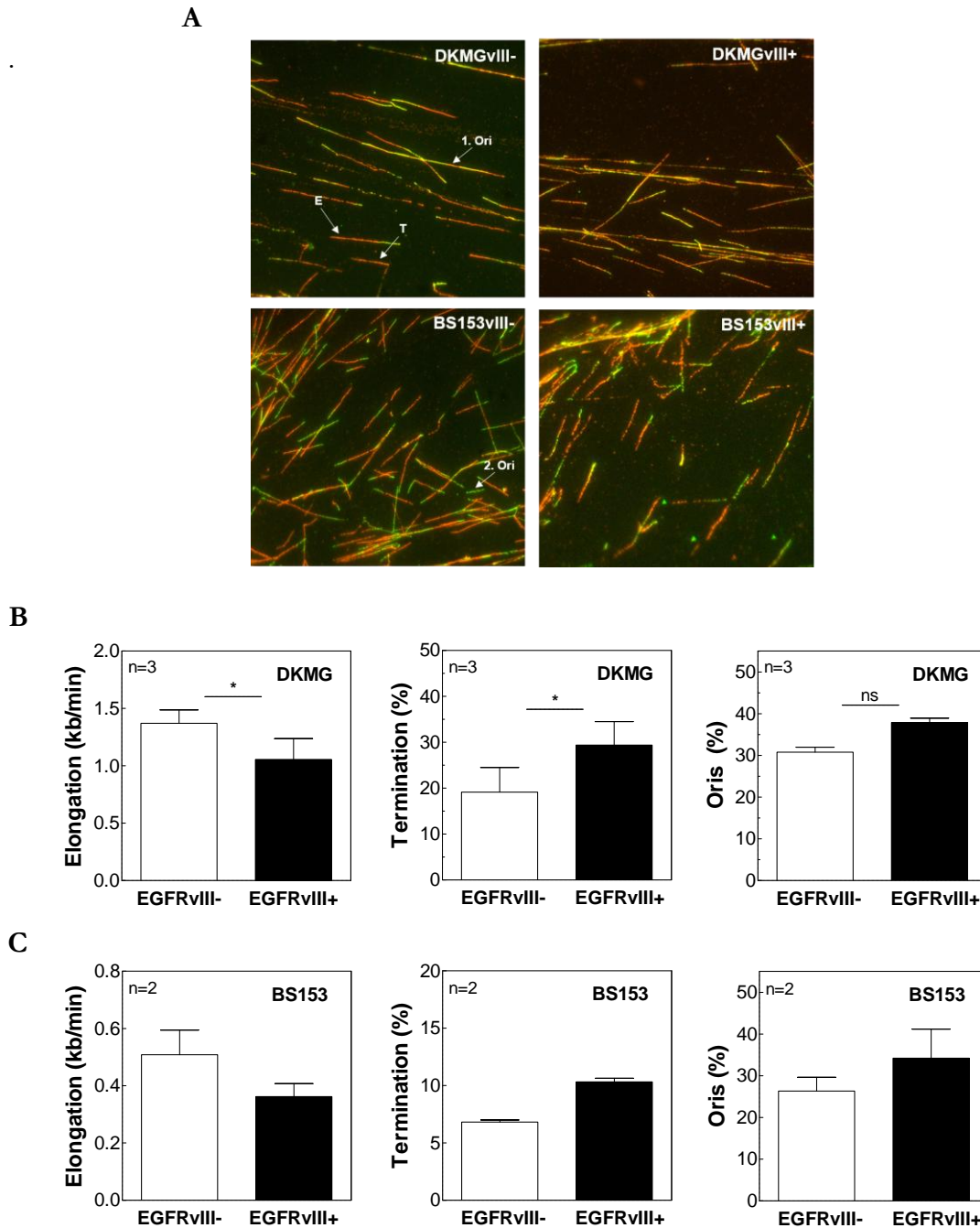
Deshalb sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob eine EGFRvIII-Expression mit einem erhöhten Maß an Replikationsstress assoziiert ist. Hierfür wurde der so genannte *Fiber Assay* verwendet. Dieser *Assay* bietet die Möglichkeit, die Elongation, die Termination sowie die Initiation der Replikation zu analysieren. Der Nachweis erfolgt mittels Thymidin-Analoga, welche in die DNA von replizierenden Zellen eingebaut wird (s. Abb. 4.21). Diese wird aus den Zellen so isoliert, dass die Thymidin-Analoga durch

Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden können. Die Analyse und Auswertung der Replikationsstrukturen wurde zum Teil in Zusammenarbeit mit Jasmin Burmester durchgeführt. Ein schematisches Markierungsprotokoll sowie eine genaue Darstellung der analysierten Replikationsstrukturen und ihrer Bedeutung sind in Abbildung 4.21 zu sehen.



**Abb. 4.21: Schematische Darstellung des Markierungsprotokolls sowie der mittels *Fiber Assay* analysierten Strukturen.** (A) Exponentielle DKMGvIII-/+ sowie BS153vIII-/+ Zellen wurden für jeweils 20 min mit CldU (rot) und IdU (grün) markiert, die DNA präpariert und die eingebauten Nukleotidanaloga mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. (B) Übersicht der analysierten Replikationsstrukturen.

Wie aus Abbildung 4.21 ersichtlich wird, markieren rote Bereiche den Einbau von CldU-Nukleotiden und grün markierte Bereiche den Einbau der IdU-Nukleotide. Nur rote Replikationsstrukturen, wurden als terminierte Replikationsgabeln bezeichnet. DNA-Bereiche, die sowohl rote als auch grüne Bereiche aufwiesen, wurden als elongierte Replikationsstrukturen bezeichnet. Der Replikationsursprung 1. Ordnung (Ursprung in den ersten 20 min) basiert auf zwei elongierten Replikationsgabeln, die von einem Replikationsursprung in bi-direktionaler Richtung verlaufen. Der Replikationsursprung 2. Ordnung zeigte lediglich eine grüne Färbung, da dieser in der 2. Markierungshälfte seinen Ursprung hat.

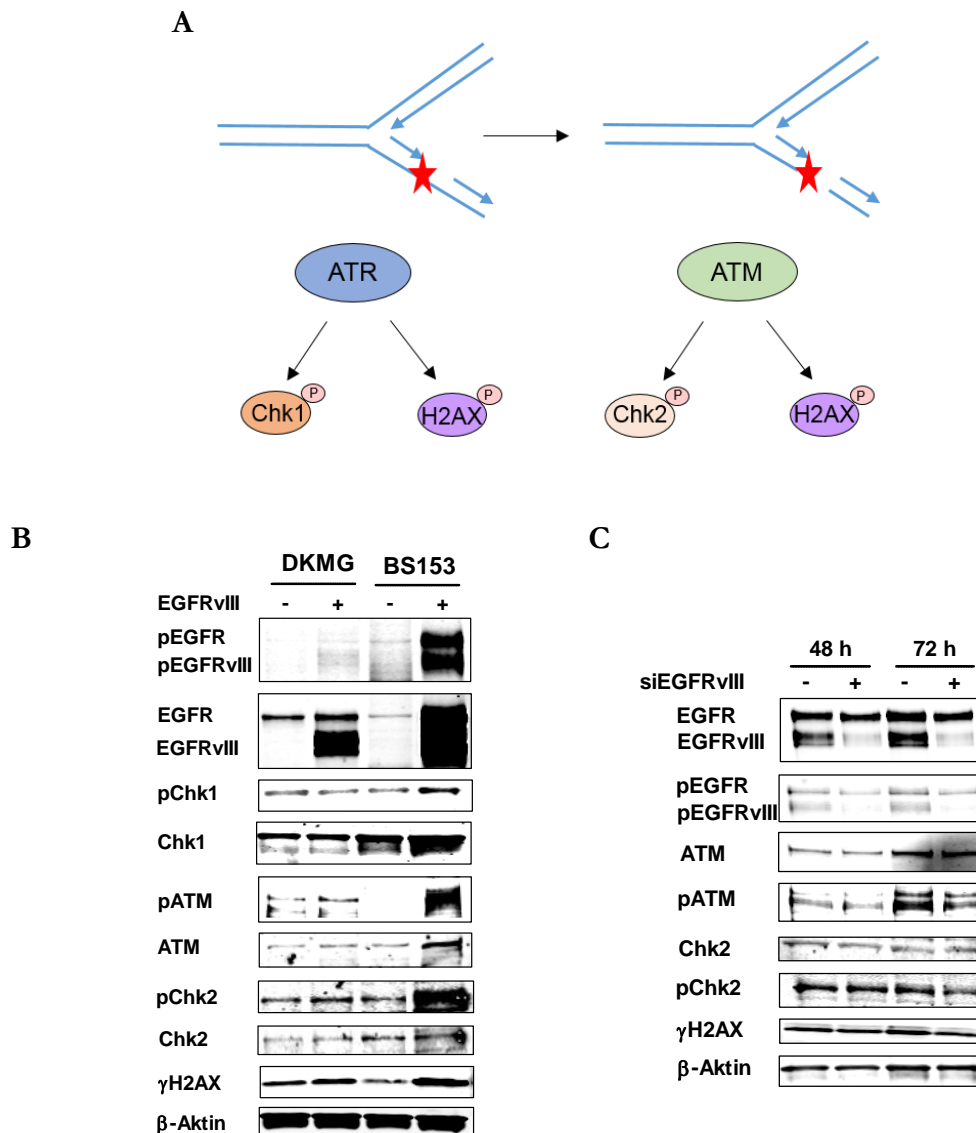


**Abb. 4.22: Einfluss der EGFRvIII-Expression auf Elongation, Termination und Initiation der Replikation.** (A) Die Nucleotidanaloga CldU (rot) und IdU (grün) wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung in DKMGvIII<sup>-/+</sup> und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen nachgewiesen. Mit einem Pfeil gekennzeichnet sind die Replikationsstrukturen Termination (T), Elongation (E), Replikationsursprung 1. Ordnung (1. Ori) und Replikationsursprung 2. Ordnung (2. Ori). Exponentielle (B) DKMGvIII<sup>-/+</sup> sowie (C) BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurden für jeweils 20 min mit CldU und IdU markiert. Anschließend wurde die DNA präpariert, die eingebauten Nucleotide detektiert und die Replikationsstrukturen quantifiziert. Dargestellt ist die Elongationsgeschwindigkeit in kb/min sowie der prozentuale Anteil bezogen auf alle analysierten Replikationsstrukturen für terminierende Replikationsgabeln und für die Gesamtanzahl der Replikationsursprünge 1. und 2. Ordnung. Statistisch signifikant: \*  $p < 0,05$ ; (gepaarter Studentischer t-Test). Dargestellt sind die Mittelwerte dreier (DKMG) bzw. zweier (BS153) unabhängiger Sechsfachbestimmungen inklusive SEM. Da für die BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen nur zwei Versuche durchgeführt wurden, konnten hier keine Signifikanzen berechnet werden.

Im Folgenden wurde der Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die verschiedenen Replikationsstrukturen in exponentiell wachsenden DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen untersucht. Die Ergebnisse der *Fiber Assay*-Analyse sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

Wie in Abb. 4.22 B+C zu sehen ist, konnten mittels *Fiber Assay* zum Teil signifikante Unterschiede beobachtet werden. So zeigten DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu DKMGvIII<sup>-</sup>-Zellen eine geringere Elongationsrate (1,1 kb/min zu 1,4 kb/min;  $p=0.0419$ ) sowie mit 29,4% gegenüber 19,2% mehr angehaltene Replikationsgabeln ( $p=0,0438$ ). Darüber hinaus wiesen DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen auch eine höhere Anzahl an Replikationsursprüngen 1. und 2. Ordnung auf, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (37,9% zu 31%;  $p=0,1298$ ). Das gleiche Bild zeigte sich auch für die BS153-Zellen. Hierbei konnten ebenfalls eine geringere Elongationsrate (0,4 kb/min zu 0,5 kb/min), mehr Terminations- (10,3% zu 6,8%) und Initiationsereignisse (34,2% zu 26,3%) festgestellt werden. Somit scheint die EGFRvIII-Expression in DKMG- und BS153-Zellen einen negativen Einfluss auf die Replikation zu haben.

Um zu untersuchen, dass es sich hierbei um Replikationsstress handelte, wurden im weiteren Verlauf Proteine mittels *Western Blot* analysiert, die an der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response, DDR*) beteiligt sind (s. Abb. 4.23). Hierzu zählen u.a. H2AX, ATM, sowie die Checkpoint-Kinasen Chk2 und Chk1, wobei Chk1 maßgeblich in die Regulation der Replikation involviert ist und im Zuge von Replikationsstress durch ATR aktiviert wird. Ein vereinfachtes Modell zur ATR- und ATM-Aktivierung ist in Abbildung 4.23 A dargestellt.



**Abb. 4.23: Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die Aktivierung der an der DDR beteiligten Proteine.** (A) Vereinfachte Darstellung der Aktivierung von ATR und ATM. Trifft eine Replikationsgabel auf einen DNA-Schaden (roter Stern), wird sie angehalten und ATR wird infolgedessen aktiviert. ATR phosphoryliert daraufhin u.a. Chk1 und H2AX. Nukleasen können angehaltene Replikationsgabeln spalten, so dass DSB entstehen und ATM aktiviert wird. Dieses kann ebenfalls H2AX sowie Chk2 phosphorylieren (modifiziert nach [138]). (B) DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen wurden nach 48 h lysiert und die Expression von EGFR//pEGFR (Tyr1173), EGFRvIII//pEGFRvIII (Tyr1173), Chk1//pChk1 (Ser345), ATM//pATM (Ser1981), Chk2//pChk2 (Thr68) sowie  $\gamma$ H2AX (Ser139) mittels *Western Blot* analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (C) Exponentiell wachsende BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen wurden mit 30 nM EGFRvIII-spezifischer siRNA transfiziert und nach 48 h und 72 h lysiert. Hierbei diente Cyclophilin B siRNAs als Kontrolle (-). Die Expression von EGFR//pEGFR (Tyr1173), EGFRvIII//pEGFRvIII (Tyr1173), ATM//pATM (Ser1981), Chk2//pChk2 (Thr68) sowie  $\gamma$ H2AX (Ser139) wurde mittels *Western Blot* analysiert.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Aus Abbildung 4.23 B wird deutlich, dass sowohl DKMGvIII<sup>-/+</sup>- als auch BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen im Vergleich zu EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen im unbehandelten Zustand mehr  $\gamma$ H2AX-Phosphorylierung aufwiesen. Des Weiteren konnte eine stärkere Aktivierung von Chk2 und

---

ATM in DKMGvIII<sup>+</sup>- und BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu den jeweiligen EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen beobachtet werden. BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen zeigten darüber hinaus auch eine verstärkte Expression von Chk1 und pChk1.

Um zu überprüfen, dass die Aktivierung der DDR auf der EGFRvIII-Expression an sich beruht, wurden infolgedessen EGFRvIII *knock down* Experimente durchgeführt (Abb. 4.23 C). In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass eine gezielte Herunterregulation des EGFRvIII auch zu einer Reduktion der Phosphorylierung von ATM, Chk2 und H2AX führte.

Diese Daten zeigen somit, dass eine EGFRvIII-Expression zu einer erhöhten Schadensantwort führt. Zusammen mit der veränderten Replikation (s. Abb. 4.22) konnte gezeigt werden, dass EGFRvIII<sup>+</sup>- im Vergleich zu EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen unter einem höheren Replikationsstress leiden, der sehr wahrscheinlich direkt auf die EGFRvIII-Expression zurückzuführen ist.





## 5 Diskussion

Das GBM ist der häufigste maligne Gehirntumor bei Erwachsenen und gehört zu den aggressivsten Tumorentitäten überhaupt. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) wird in 40-50% aller GBM aufgrund einer Genamplifikation überexprimiert. Ungefähr die Hälfte dieser Tumore exprimiert außerdem die EGFR-Deletionsmutante EGFRvIII. Da bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnte, ob sich eine EGFRvIII-Expression auf den Erfolg der Radio- und Chemotherapie auswirkt, sollte in dieser Arbeit der Einfluss des EGFRvIII auf die Radio- und Chemosensitivität von GBM-Zellen untersucht werden.

### 5.1 Bedeutung der EGFRvIII-Expression für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Einfluss der EGFRvIII-Expression auf die Strahlenempfindlichkeit humaner Glioblastomzelllinien untersucht werden. Hierbei zeigte sich im Gegensatz zu anderen prä-klinischen Studien, dass eine endogene EGFRvIII-Expression keinen Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit aktuellen klinischen Daten, die — auch im Gegensatz zu älteren Studien — ebenfalls keine prognostische Relevanz für eine EGFRvIII-Expression in GBM-Patienten, die nach derzeitigem klinischen Standard therapiert wurden, feststellen konnten [8,27,88].

Das in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Modellsystem, bestehend aus je zwei Paaren von EGFRvIII exprimierenden (+) und nicht-exprimierenden (–) Sub-Zelllinien, zeichnet sich im Vergleich zu früheren Modellen dadurch aus, dass die EGFRvIII+-Sub-Zelllinien nicht mit dem EGFRvIII-Gen transfiziert wurden, sondern endogen EGFRvIII exprimieren. Darüber hinaus weisen die Sub-Zelllinien auch die EGFR-Genamplifikation auf (Information von Dr. Alexander Schulte; Hans Dietrich Hermann Labor für Hirntumorbiologie, UKE), welche für die Entstehung des EGFRvIII entscheidend ist [35]. Bisherige Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen einer EGFRvIII-Expression und einer gesteigerten DNA-Reparaturkapazität bzw. einer Radioresistenz beobachtet wurde, wurden hingegen mit EGFRvIII-transfizierten Zellen durchgeführt. Hierbei wurden

Zelllinien verwendet, die ursprünglich keine EGFR-Genamplifikation und endogene EGFRvIII-Expression aufwiesen und somit nicht die ursprüngliche *in vivo* Situation reflektieren [40,87,139]. Eine für solche Experimente häufig verwendete Linie ist die U87MG-Linie, die *per se* sehr strahlenresistent ist [40]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien, wurden auf Basis der Linien DKMG und BS135 generiert, die beide eine heterogene EGFRvIII-Expression aufwiesen. Die vorherigen prä-klinischen Studien, die mit transfizierten Modellsystemen gearbeitet haben, konnten eine durch den EGFRvIII induzierte Radioresistenz beobachten, die auf eine gesteigerte DNA-Reparaturkapazität zurückzuführen war. Überraschenderweise waren aber schon die parentalen DKMG- und BS153-Zellen, die eine heterogene EGFRvIII-Expression aufwiesen im Vergleich zu den EGFRvIII-negativen GBM-Zelllinien sehr strahlenempfindlich.

Die Tatsache, dass DKMG- und BS153-Zellen von sich aus eine natürliche EGFRvIII-Expression aufweisen, die auch in Kultur erhalten geblieben ist, stellt eine Ausnahme dar. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die EGFR-Genamplifikation bei Inkulturnahme nach kurzer Zeit verloren geht und es daher aktuell nach derzeitigem Kenntnisstand nur drei etablierte GBM-Zellkulturen (Cas-1, BS153, DKMG) gibt, die über mehrere Monate ihre EGFR-Genamplifikation aufrechterhalten, wobei die Cas-1 Zellen im Rahmen dieser Arbeit als EGFRvIII-negativ charakterisiert wurden [35,140].

Interessanterweise bleibt die EGFR-Genamplifikation nach Xenotransplantation in murine Gehirne auch nach weiteren Passagen nachweisbar. Dies deutet daraufhin, dass das vorhandene Mikromilieu für den Erhalt der Genamplifikation entscheidend ist [141,142]. Im Gegensatz zum Tumor scheint die EGFR-Genamplifikation unter Standard-Zellkulturbedingungen keinen Selektionsvorteil zu bieten, was letztlich in der Reduktion der EGFR-Genkopienzahl resultiert [143]. In diesem Zusammenhang konnten Schulte *et al.* zeigen, dass die initiale Inkulturnahme primärer Glioblastomzellen darüber entscheidet, ob die Genamplifikation sowie das *Rearrangement* des EGFR-Gens bestehen bleiben oder nicht. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Serum- sowie EGF-freie Bedingungen die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die Genamplifikation sowie die EGFRvIII-Expression aufrechterhalten bleiben [140].

Da sowohl die parentalen DKMG- und BS153-Zellen, als auch die EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien über den Kultivierungszeitraum eine stabile EGFRvIII-Expression aufrechterhalten sollten, wurden die Zellen in Medium mit inaktivierten FKS kultiviert. Um auszuschließen, dass unterschiedliche Kultivierungsbedingungen die zelluläre

Strahlenempfindlichkeit beeinflussen, wurden die EGFRvIII<sup>-</sup>-Sub-Zelllinien in demselben Medium kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen der entsprechende Phänotyp erhalten blieb: Die DKMGvIII<sup>+</sup>- und BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen zeigten eine stabile EGFRvIII-Expression über 18 Wochen, die EGFRvIII<sup>-</sup>-Sub-Zelllinien wiesen über diesen Zeitraum so gut wie keine EGFRvIII-Expression auf (s. Abb. 4.4). Hieraus lässt sich schließen, dass die gewählten Kulturbedingungen eine stabile EGFRvIII-Expression über mehrere Wochen gewährleisten konnten. Somit ist das gewählte Modellsystem optimal für die Untersuchungen zur Bedeutung der EGFRvIII-Expression für die Radio- und Chemosensitivität sowie das Ansprechen auf EGFR *targeting* geeignet gewesen.

Im Zuge der Analyse der EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien wurden zunächst die EGFR-abhängige Signaltransduktion, die Proliferation, sowie die Morphologie charakterisiert. Es zeigte sich, dass die BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen durch eine starke EGFR- sowie EGFRvIII-Expression charakterisiert waren, die mit einer deutlichen basalen EGFR- und EGFRvIII-Phosphorylierung einherging. Daneben wiesen DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen eher eine moderate EGFR- und EGFRvIII-Expression auf. Darüber hinaus konnte in DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen lediglich eine erhöhte ERK2-Phosphorylierung beobachtet werden, während die BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen sowohl eine stärkere ERK1-, als auch AKT-Aktivierung aufwiesen (s. Abb. 4.6 A). Zumindest für die BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen stimmen diese Beobachtungen mit den Daten von Zheng *et al.* überein, die in EGFRvIII-transfizierten U87MG-Zellen u.a. eine erhöhte Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 nachweisen konnten [128]. Des Weiteren konnten Moscatello *et al.* in EGFRvIII-transfizierten Fibroblasten eine konstitutive Aktivität der PI3-Kinase beobachten [144], was ebenfalls mit der hier beobachteten verstärkten AKT-Phosphorylierung in BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen übereinstimmt.

Da nur in den BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen eine Aktivierung sowohl des MAPK- als auch des AKT-Signalweges beobachtet werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass lediglich eine sehr starke Expression des EGFRvIII zu einer deutlichen Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalwege führt. Da im Falle von Transfektionsexperimenten oftmals Expressionsplasmide mit starken Promotoren benutzt werden, die zu einer deutlichen Überexpression des gewünschten Proteins führen, würde dies auch erklären, warum Studien mit EGFRvIII-transfizierten Zellen oftmals eine starke Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalwege beobachten konnten [128,144,145]. In Übereinstimmung mit der eher moderaten Aktivierung des EGFR-Signalweges zeigten DKMGvIII<sup>+</sup>- und DKMGvIII<sup>-</sup>-Zellen keinen Unterschied hinsichtlich ihrer Proliferationsrate, während die

BS153vIII+-Zellen nach anfänglicher Verzögerung im Vergleich zu den BS153vIII--Zellen nach vier Tagen eine leicht erhöhte Zellzahl aufwiesen (s. Abb. 4.6 B). Der nur moderate Unterschied hinsichtlich der Proliferation wird durch Daten von Schulte *et al.* bestätigt, die für Erlotinib-resistente BS153-Zellen — im Gegensatz zu parentalen BS153-Zellen weisen diese einen höheren Anteil EGFRvIII-exprimierender Zellen auf — ebenfalls keinen Proliferationsunterschied in Xenografttumoren zeigten [146].

Interessanterweise konnte während der Kultivierung der BS153-Zellen beobachtet werden, dass sich die Zellen mit zunehmender Zeit veränderten und nach deutlich höheren Passagenzahlen, als die hier verwendeten, einen ausgeprägteren Phänotyp hinsichtlich des EGFR *signalings*, der Proliferation sowie ihrer Klonogenität aufwiesen. Die BS153vIII+-Zellen zeigten dabei mit der Zeit eine stärkere Aktivierung des AKT- sowie MAPK-Signalwegs und auch im Hinblick auf die Proliferation wurden signifikante Unterschiede deutlich (Daten nicht gezeigt). Während zuvor kein wesentlicher Unterschied in der Proliferationsgeschwindigkeit von BS153vIII-/+-Zellen beobachtet werden konnte, wiesen die BS153vIII+-Zellen nun eine signifikant schnellere Proliferation im Vergleich zu BS153vIII--Zellen auf. Dies könnte auf die stärkere Aktivierung des EGFR-abhängigen Signalweges zurückzuführen sein. Des Weiteren wurde deutlich, dass sich auch die BS153vIII--Zellen mit zunehmender Kultivierung veränderten, was sich durch einen nahezu vollständigen Verlust der EGFR-Wildtyp-Expression äußerte, einhergehend mit einer geringeren Proliferationsgeschwindigkeit (Daten nicht gezeigt). Obwohl sowohl für die DKMGvIII-/+- als auch für die BS153vIII-/+-Zellen zu Beginn der Kultivierung kein wesentlicher Unterschied bezüglich der Klonogenität festgestellt werden konnte, zeigten die BS153vIII+-Zellen im Gegensatz zu BS153vIII--Zellen nach 25 Passagen eine deutlich reduzierte Anwachsrate. Auch die DKMGvIII+-Zellen wiesen im Vergleich zu DKMGvIII--Zellen mit zunehmender Kultivierung eine geringere Klonogenität auf (Daten nicht gezeigt). Für beide EGFRvIII--Sub-Zelllinien konnte keine Veränderung des klonogenen Potentials beobachtet werden. Möglicherweise könnte die verminderte Klonogenität der EGFRvIII+-Zellen in dem durch den EGFRvIII induzierten Replikationsstress (vergl. Abschnitt 4.3), der auch entsprechend mit steigender Passagenzahl zunehmen könnte, begründet sein. Um sicherzugehen, dass die beobachteten Veränderungen nicht durch Kreuzkontaminationen zustande kamen, wurden sowohl das genetische Profil der EGFRvIII-- als auch der EGFRvIII+-Sub-Zelllinien analysiert. Mit Hilfe der Analyse von *short tandem repeats* (STR; *Fingerprinting*) konnte bestätigt werden, dass es sich bei den EGFRvIII-- und EGFRvIII+-Sub-Zelllinien auch zu späten Passagen um

isogenetische Zelllinien handelte. Darüber hinaus wiesen die EGFRvIII<sup>-/+</sup>-Sub-Zelllinien den gleichen DNA-Gehalt, Chromosomensatz sowie p53- und PTEN-Status auf (s. Tab. 4.1), was den Schluss zulässt, dass die beobachteten Veränderungen bezüglich der Proliferation, Klonogenität und des EGFR *signalings* ein spezifisches Charakteristikum der EGFRvIII<sup>-/+</sup> Sub-Zelllinien waren.

Während der Kultivierung der EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien wurde außerdem deutlich, dass sich die BS153vIII<sup>-</sup>- und BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen in ihrer Morphologie unterschieden. Während die BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen eher eine epithelartige Morphologie aufwiesen, fielen die BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen durch ihre Spindelform auf (s. Abb. 4.7 A). Die Assoziation der EGFRvIII-Expression mit dem Vorhandensein einer spindelförmigen Morphologie stimmt mit anderen prä-klinischen Studien überein. So konnten Zheng *et al.* beobachten, dass eine durch EGFRvIII-Expression induzierte Aktivierung des JAK2/STAT3-Signalwegs zu einer Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen führte, die mit einer spindelförmigen Morphologie verbunden waren und wiederum eine gesteigerte Tumordinvasion zur Folge hatte [128]. EGFRvIII-Expression in Ovarialkarzinom-Zellen hatte hingegen eine reduzierte Integrin- $\alpha$ 2-Expression zur Folge und war dementsprechend ebenfalls mit einer erhöhten Invasionsrate assoziiert [147]. Da für die DKMGvIII<sup>-</sup>- und DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen solch ein Unterschied in der Morphologie nicht beobachtet werden konnte, scheint dieser Unterschied nicht nur in der EGFRvIII-Expression begründet zu sein, sondern auch durch andere zellspezifische Faktoren oder Mutationen beeinflusst zu werden.

Des Weiteren wurde neben Signaltransduktion und Zellwachstum auch die DSB-Reparaturkapazität der EGFRvIII<sup>-/+</sup>-Sub-Zelllinien untersucht. Hierfür wurden  $\gamma$ H2AX/53BP1 doppelt-positive Reparaturfoci nach 2 Gy Röntgenbestrahlung analysiert. Hierbei fiel zunächst auf, dass BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen im unbestrahlten Zustand signifikant mehr  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci aufwiesen. Diese Daten deuten darauf hin, dass EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen im unbehandelten Zustand mehr spontane DNA-Schäden besitzen und könnte somit der Grund für die geringere Klonogenität der BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen sein. Für die DKMG-Zellen konnte dieser Zusammenhang nicht beobachtet werden. Hier konnte kein Unterschied in der Anzahl residueller  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci in DKMGvIII<sup>-</sup>- und DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden. Da allerdings in beiden EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien im Vergleich zu den EGFRvIII<sup>-</sup>-Sub-Zelllinien mehr  $\gamma$ H2AX (s. Abb. 4.23) detektiert werden konnte, sollte im Rahmen der

Bachelorarbeit von Leonie Ott (Studiengang *Molecular Life Sciences* (MLS), UNI Hamburg) untersucht werden, ob EGFRvIII-exprimierende DKMG- und BS153-Zellen im unbehandelten Zustand mehr  $\gamma$ H2AX-Foci aufweisen.

In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass sowohl in den DKMGvIII+- als auch BS153vIII+-Zellen mehr  $\gamma$ H2AX-Foci im Vergleich zu den entsprechenden EGFRvIII--Sub-Zelllinien nachgewiesen werden konnten, was die Hypothese bestätigt, dass EGFRvIII+-Zellen mehr basale DNA-Schäden besitzen.

Wie im unbehandelten Zustand zeigte auch die Analyse residueller doppelt-positiver  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci nach 2 Gy Röntgenbestrahlung in DKMGvIII-- und DKMGvIII+-Zellen keinen Unterschied, was im Einklang mit den Daten der Koloniebildungstests war. Die BS153vIII+-Zellen wiesen jedoch im Vergleich zu BS153vIII--Zellen deutlich mehr residuelle DNA-Reparaturfoci auf (s. Abb. 4.8 C), was im Widerspruch zu den Koloniedaten war, da sich hier für die BS153vIII+-Zellen eine leichte Tendenz zur Radioresistenz zeigte (s. Abb. 4.9).

Höchstwahrscheinlich handelte es sich bei diesen residuellen DNA-Reparaturfoci in BS153vIII+-Zellen nicht um echte DSB, sondern um nicht vollständig aufgelöste DNA-Reparaturzentren. Für die Dephosphorylierung von  $\gamma$ H2AX sind u.a. die Phosphatasen Wip1, PP2A und PP4C verantwortlich [148,149]. Möglicherweise liegt in den BS153vIII+-Zellen eine Deregulation einer der genannten Phosphatasen vor, so dass H2AX weiterhin phosphoryliert und am DSB gebunden bleibt. Eine weitere mögliche Erklärung für das Vorhandensein von mehr residuellen Foci in BS153vIII+-Zellen könnte sein, dass die EGFRvIII-Expression zu einer veränderten Chromatinstruktur führt, so dass DNA-Reparaturfaktoren länger an der DNA gebunden bleiben. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass eine EGFR-Stimulation durch EGF die Phosphorylierung und Acetylierung des Histons 3 induziert und somit eine drastische Veränderung der Chromatinstruktur zur Folge hat [150]. Darüber hinaus konnten, Lorat *et al.* zeigen, dass persistierende 53BP1-Foci im Heterochromatin, die teilweise auch mit  $\gamma$ H2AX ko-lokalisierten auf eine unvollständige oder inkorrekte Wiederherstellung der Chromatinstruktur zurückzuführen waren und somit kein Marker für echte DSB darstellten [151].

Die Beobachtungen, dass der EGFRvIII keinen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat, stehen im Widerspruch zu Daten, die von Mukherjee *et al.* generiert worden sind. Hier konnte eine erhöhte Radioresistenz von U87MG-Zellen beobachtet werden, die zuvor mit EGFRvIII transfiziert worden waren. Auch zeigte sich in

dieser Studie eine gesteigerte DNA-Reparaturkapazität in U87MG-EGFRvIII-Zellen, was in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht bestätigt werden [40].

Möglicherweise liegen die unterschiedlichen Beobachtungen in den verwendeten Modellsystemen begründet. Mukherjee *et al.* transfizierten U87MG-Zellen mit EGFRvIII, die normalerweise keine EGFR-Genamplifikation aufweisen und somit nicht die natürliche Situation widerspiegeln. Darüber hinaus handelt es sich beim GBM um eine sehr heterogene Tumorentität, die eine Vielzahl genetischer Veränderungen aufweist [5,40]. Es ist daher anzunehmen, dass sich die U87MG-Zellen, DKMG- und BS153-Zellen genetisch grundlegend voneinander unterscheiden und eine EGFRvIII-Expression in diesen Zellen somit einen anderen Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat. Zudem handelt es sich bei den U87MG-Zellen um sehr strahlenresistente Zellen (SF6: 35%), während die DKMG- (SF6: 11%) und BS153-Zellen (SF6: 2%) eher strahlenempfindlich sind (s. Abb. 4.2 B), was zeigt, dass U87MG-Zellen im Allgemeinen besser mit strahlungsinduzierten Schäden umgehen können, als DKMG- und BS153-Zellen. Da DKMG- und BS153-Zellen relativ strahlenempfindlich sind, könnte gemutmaßt werden, dass in diesen Zellen DNA-Reparaturwege entweder nicht aktiv oder fehlreguliert sind, so dass eine EGFRvIII-Expression in diesen Zellen möglicherweise keinen Einfluss auf die DNA-Reparaturkapazität hat.

Da in den BS153vIII+-Zellen, die eine starke Expression des EGFRvIII sowie eine starke basale Phosphorylierung des Rezeptors zeigten, eine Tendenz zur Radioresistenz beobachtet werden konnte, kann außerdem gemutmaßt werden, dass eine Resistenz gegenüber Strahlung erst bei sehr hoher EGFRvIII-Expression induziert werden kann. Dies würde auch erklären warum U87MG-EGFRvIII, die durch die Transfektion bedingt eine starke Überexpression des EGFRvIII aufwiesen, radioresistenter waren als U87MG-Zellen, die lediglich EGFR-Wildtyp exprimierten.

Um zu untersuchen, ob die EGFRvIII-Expression in BS153vIII+-Zellen die Situation in Tumoren widerspiegelt, oder ob in GBM-Patienten eine noch stärkere EGFRvIII-Expression beobachtet werden kann, wurden parallel immunhistochemische Färbungen von EGFRvIII-positiven Patientenproben und BS153-Tumoren angefertigt. Hierbei zeigte sich eine vergleichbare EGFRvIII-Expression in den Patientenproben sowie BS153-Tumoren (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt zeigen diese Daten deutlich, dass — anders als bisher vermutet — eine endogene EGFRvIII-Expression keinen bedeutenden Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat.



Neben den unterschiedlichen Sub-Zelllinien wurde in dieser Arbeit erstmalig auch die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der endogen EGFRvIII-exprimierenden parental Linien mit der von EGFRvIII-negativen Zellen verglichen. Hierfür wurden zunächst sechs GBM-Zelllinien hinsichtlich ihrer EGFR- sowie EGFRvIII-Expression analysiert, drei davon mit bekannter EGFRvIII-Expression, hierunter die bereits beschriebenen DKMG- und BS153-Zellen und zusätzlich die Zelllinie Cas-1 [35]. Während alle Zelllinien EGFR-Wildtyp-Expression zeigten, konnte nur in DKMG- und BS153-Zellen eine EGFRvIII-Expression nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Cas-1-Zellen (s. Abb. 4.1).

Im Hinblick auf die Strahlenempfindlichkeit zeigte sich ein sehr heterogenes Bild (Abb. 4.2 B). Die EGFRvIII-negativen und EGFRvIII-exprimierenden Zelllinien wiesen ganz unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten auf, welche nicht auf signifikante Unterschiede in der Zellzyklusverteilung zurückzuführen waren (s. Abb. 4.2 C). Hierbei waren die EGFRvIII-exprimierenden BS153- und DKMG-Zellen widererwartend im Vergleich zu den EGFRvIII-negativen Zellen deutlich strahlenempfindlicher. Dies könnte daran liegen, dass Zellen mit EGFR-Amplifikation chromosomal instabil sind und in diesen Zellen somit ein genereller DNA-Reparaturdefekt vorliegen könnte, welcher eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit zur Folge hätte [152]. Chavaudra *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass Zelllinien, die einen Defekt in der DSB-Reparatur und Chromatinkondensation hatten, die höchste Strahlenempfindlichkeit aufwiesen [153].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte keine EGFRvIII-Expression in Cas-1-Zellen festgestellt werden, was im Gegensatz zu den von Del Vecchio *et al.* publizierten Daten ist. Der Verlust der EGFRvIII-Expression könnte in der epigenetischen Regulation der EGFRvIII-Expression begründet liegen. Del Vecchio *et al.* beobachteten, dass voneinander getrennte EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>- DKMG-, BS153- und Cas-1-Populationen weiterhin EGFR-Genamplifikationen aufwiesen und dass aus EGFRvIII-exprimierenden Zellen sowohl EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen hervorgehen konnten. Lediglich Zellen, die kürzlich ihre EGFRvIII-Expression verloren hatten, konnten den EGFRvIII innerhalb von wenigen Wochen wieder re-exprimieren. Die Beobachtung, dass eine Demethylierung in einer EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellpopulation zu einem Anstieg von 20-60% EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen führte, ließ den Schluss zu, dass epigenetische Mechanismen an der Regulation der EGFRvIII-Expression beteiligt sind [35].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wird angenommen, dass der Verlust der EGFRvIII-Expression zunächst mit einer reversiblen Herunterregulation der EGFRvIII-Expression und anschließend mit einer Reduktion der Amplikons einhergeht [35]. Es ist anzunehmen,

dass die Cas-1-Zellen auf diesem Wege ihre EGFRvIII-Expression und möglicherweise auch ihre EGFR-Genamplifikation verloren haben, so dass eine erneute Re-Expression auch unter den hier verwendeten serumfreien Kulturbedingungen nicht möglich war. Diese Annahme wurde durch Analysen bestätigt, die im Rahmen einer Kooperation mit dem Hans Dietrich Hermann Labor für Hirntumorbiologie am UKE durchgeführt worden sind. Hierbei konnte mittels EGFR-spezifischer PCR (*Polymerase Chain Reaction*) in den Cas-1 Zellen keine EGFR-Genamplifikation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus konnten mittels durchflusszytometrischer Analyse lediglich 2,6% (s. Abb. 4.3) EGFRvIII+-Zellen in der Cas-1-Population detektiert werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine EGFRvIII-Expression nicht mit einer erhöhten Radioresistenz assoziiert ist und Zellen mit endogener EGFRvIII-Expression im Vergleich zu EGFRvIII-negativen Zellen sogar strahlenempfindlicher sind.

## **5.2 Einfluss des EGFRvIII auf eine EGFR-Inhibition mittels Gefitinib**

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde der Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib verwendet, da dieser bereits in klinischen Studien als Monotherapie oder in Kombination mit Bestrahlung und/oder Chemotherapie eingesetzt wird [37-39]. Zuvor publizierte Daten zeigen, dass in BS153-Zellen eine verstärkte EGFRvIII-Expression mit einer Resistenz gegenüber dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib assoziiert ist und gleichzeitig mit einer Aktivierung des PI3K-Signalweges einhergeht. Die Erlotinib-resistenten Zellen konnten in der Gegenwart von Erlotinib proliferieren und durch die Behandlung mit einem PI3K-Inhibitor oder durch einen gezielten EGFRvIII *knock down* wieder gegenüber Erlotinib sensitiviert werden [146]. Diese Daten deuten somit an, dass der EGFRvIII eine Resistenz gegenüber Erlotinib vermittelt. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass eine EGFRvIII-Expression auch in humanen Fibroblasten zu einer Resistenz gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren führt [154].

Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob eine endogene EGFRvIII-Expression in humanen GBM-Zellen ebenfalls eine Resistenz gegenüber einer EGFR-Inhibition vermittelt. Hierfür wurde Gefitinib verwendet, weil es bereits in mehreren klinischen Studien getestet wurde und spezifischer als Erlotinib gegenüber dem EGFR ist [38,39,50].

Im Rahmen dieser Analysen wurde deutlich, dass Gefitinib-Konzentrationen, die unter Therapie im Tumor erzielt werden können, weder in EGFRvIII<sup>-</sup>- noch in EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen zu einer robusten Zellinaktivierung mit und ohne Bestrahlung führten und eine EGFRvIII-Expression somit keinen Einfluss auf das EGFR *targeting* zu haben scheint. Einen deutlichen Effekt erzielte die Gefitinib-Behandlung auf die Signalweiterleitung in BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen, da hier die AKT-Phosphorylierung deutlich inhibiert und die ERK1/2-Phosphorylierung sogar vollständig unterdrückt wurde. Dies resultierte in einer nahezu vollständigen Wachstumsinhibition der BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen. In den BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen, die nach Gefitinib-Behandlung kaum eine Reduktion ihrer AKT- bzw. ERK1/2-Phosphorylierung zeigten, bewirkte die Gefitinib-Behandlung wie erwartet nur eine geringe Wachstumsverzögerung (s. Abb. 4.10 A+B). Dies bestätigt zunächst die Annahme, dass der EGFRvIII eine Resistenz gegenüber Gefitinib hinsichtlich der Zellproliferation vermittelt. In Fibroblasten führte die EGFRvIII-Expression ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Gefitinib und EGFRvIII-exprimierende Zellen wurden durch die Gefitinib-Behandlung weniger stark in ihrer Proliferation gehemmt, als Zellen, die den EGFRvIII nicht exprimierten [155]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Gefitinib-Behandlung die Invasion EGFRvIII-exprimierender Zellen nicht hemmen konnte, während die Invasionsrate von EGFR-Wildtyp exprimierenden Zellen reduziert war [154].

Dass der EGFRvIII ein genereller Marker für die Resistenz gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren ist, konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, da sowohl in den DKMGvIII<sup>-</sup>- als auch in den DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen lediglich eine leichte Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung detektiert werden konnte. Hierbei führte Gefitinib zu einer geringen Wachstumsverzögerung der DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen, während die Behandlung keinen Einfluss auf das Wachstum von DKMGvIII<sup>-</sup>-Zellen hatte (s. Abb. 4.10 B).

Eine mögliche Erklärung dafür, dass die AKT- und ERK1/2-Aktivierung in BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen im Vergleich zu den anderen Sub-Zelllinien nach Gefitinib-Behandlung stärker inhibiert wurde, könnte in der niedrigeren EGFR-Expression begründet liegen (s. Abb. 4.10 A). Möglicherweise reicht hier die Gefitinib-Konzentration aus, um die geringere Anzahl an EGFR-Molekülen in ihrer Aktivität zu inhibieren. Darüber hinaus ist bekannt, dass Gefitinib auch HER2 inhibieren kann, welcher ebenfalls die Aktivität von AKT- und ERK1/2 reguliert [156]. Im Hinblick auf die Klonogenität zeigte sich, dass eine

Gefitinib-Behandlung von 24 h keinen zytotoxischen Effekt auf die DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen hatte.

In den hier vorliegenden Versuchen wurde eine relativ niedrige Gefitinib-Konzentration von 5  $\mu$ M verwendet. Die hier beobachteten geringen Effekte sind aber im Einklang mit bereits publizierten Daten von Schulte *et al.* zu sehen. In dieser prä-klinischen Studie wurden BS153-Zellen, die eine heterogene EGFRvIII-Expression aufwiesen mit 25  $\mu$ M Gefitinib behandelt und es konnte hierbei nur eine Reduktion der AKT- und nicht der MAPK-Phosphorylierung beobachtet werden [146]. Trotz der schwachen Effekte wurde die Gefitinib-Konzentration nicht weiter erhöht, da es sich bei 5  $\mu$ M um die Konzentration handelt, die im Gehirn eines Patienten unter Therapie erreicht wird [157].

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass Gefitinib-Konzentrationen, die unter Therapie im Gehirn von GBM-Patienten erreichbar sind, nicht zu einer effektiven Zellinaktivierung von EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen führen, obwohl sich die Sub-Zelllinien in ihrem Ansprechen auf die EGFR-Inhibition hinsichtlich der Signaltransduktion und der Proliferation deutlich unterscheiden.

Um zu überprüfen, ob Gefitinib einen Einfluss auf die DSB-Reparatur der DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Sub-Zelllinien hat, wurden residuelle  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci nach Gefitinib-Behandlung und Bestrahlung analysiert. In diesem Zusammenhang konnten Kriegs *et al.* zeigen, dass eine Inhibition des EGFR-Signalweges zu einer verminderten DNA-Reparaturkapazität führen kann, was wiederum über den MAPK-Signalweg vermittelt wird [62].

Da wie im vorherigem Abschnitt beschrieben in den DKMGvIII<sup>-/+</sup>-Zellen keine Inhibition der AKT- sowie ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet werden konnte, wäre zu erwarten, dass sich auch kein Unterschied in der Anzahl residueller Reparaturfoci nach Gefitinib-Behandlung und Bestrahlung zeigt. Überraschenderweise wiesen jedoch die DKMGvIII<sup>+/+</sup>-Zellen signifikant mehr residuelle Foci im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf, während für die DKMGvIII<sup>-/-</sup>-Zellen nach Gefitinib-Behandlung und Bestrahlung kein Anstieg beobachtet werden konnte (s. Abb. 4.12 A). Die BS153vIII<sup>-/-</sup>-Zellen zeigten nach Gefitinib-Behandlung einen starken Anstieg residueller  $\gamma$ H2AX/53BP1-Foci, welcher somit vermutlich auf die vollständige Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung zurückzuführen war (s. Abb. 4.10 A). Die Beobachtung, dass BS153vIII<sup>+/+</sup>-Zellen keinen Anstieg residueller DSB-Foci zeigten, stehen im Einklang mit

den Signaltransduktions-Daten aus Abb. 4.11 A. Hier konnte kaum eine Beeinträchtigung der AKT- sowie ERK1/2-Aktivität beobachtet werden (s. Abb. 4.12 B).

Im Hinblick auf die Strahlenempfindlichkeit konnte außer für die DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen in keiner der Sub-Zelllinien eine Radiosensitivierung durch Gefitinib festgestellt werden (s. Abb. 4.13). Somit scheint auch eine deutliche Inhibition der EGFR-abhängigen Signalwege - wie für die BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen beobachtet - oder ein Anstieg an residuellen Reparaturfoci nicht zwingend mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit assoziiert zu sein. Dies ist eine Beobachtung, die in mehreren aktuellen Projekten unabhängig von GBM-Zellen gemacht wurde, für die es aber bisher keine ausreichenden Literaturdaten oder Erklärungsmodelle gibt. Es ist anzunehmen, dass eine Inhibition der EGFR-abhängigen Signalwege somit nicht zwangsläufig zu einer schlechteren DNA-Reparatur, sondern eher zu einer Verzögerung der Reparatur oder zu einer Veränderung der Chromatinstruktur führt, so dass DNA-Reparaturkomplexe länger bestehen bleiben und diese somit mittels Immunfluoreszenz länger nachgewiesen werden können.

Interessanterweise konnten Mukherjee *et al.* eine Radiosensitivierung von EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen durch Gefitinib-Behandlung erzielen [40]. Allerdings wurde in dieser Studie auch eine durch den EGFRvIII vermittelte Radioresistenz beobachtet, was in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Daher liegen die beobachteten Diskrepanzen vermutlich an den verwendeten Modellsystemen, die sich grundlegend voneinander unterscheiden (vgl. Abschnitt 5.1).

Im Gegensatz zu den anderen EGFRvIII<sup>-/+</sup>-Sub-Zelllinien konnte in den DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen, die p53-Wildtyp exprimieren, eine Radiosensitivierung durch Gefitinib erreicht werden. Die Arbeiten von Kriegs *et al.*, zeigen auf, dass Tumorzellen durch EGFR-Inhibitoren radiosensitiviert werden können, wenn sie einen intakten p53/p21-Signalweg aufweisen. Die erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit nach EGFR-Inhibition beruht in Zellen, die p53-Wildtyp exprimieren auf einem transienten G1-Arrest, der durch Re-Platierung (*delayed plating*) wieder aufgehoben werden kann. Um zu überprüfen, ob es sich bei der beobachteten Radiosensitivierung in DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen ebenfalls um einen reversiblen Zellzyklusarrest handelt, wurden daher Koloniebildungstests unter *delayed plating* Bedingungen durchgeführt [136]. Unter diesen Bedingungen zeigte sich keine erhöhte Strahlenempfindlichkeit von DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen nach EGFR-Inhibition mehr. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die unter *pre-plating* Bedingungen beobachtete Radiosensitivierung reversibel ist und somit nicht auf eine verminderte DNA-Reparaturkapazität, sondern auf einen transienten G1-Arrest zurückzuführen war (s. Abb.

4.12 A). Da BS153-Zellen p53 mutiert sind, könnte sich trotz starker Inhibition der AKT- sowie ERK1/2-Aktivierung in BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen die fehlende Radiosensitivierung erklären.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass unter Therapie erzielbare Gefitinib-Konzentrationen weder in EGFRvIII<sup>-</sup>- noch in EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen zu einer robusten Zellinaktivierung mit und ohne Bestrahlung führten und eine EGFRvIII-Expression somit keinen Einfluss auf das EGFR-*targeting* zu haben scheint. Dies ist in Einklang mit aktuellen klinischen Studien zu sehen, die ebenfalls kein deutliches Ansprechen von GBM-Patienten auf Tyrosinkinaseinhibitoren feststellen konnten.

### 5.3 Bedeutung einer EGFRvIII-Expression für die Empfindlichkeit gegenüber Temozolomid

Sowohl für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit als auch für das EGFR *targeting* konnte in dieser Arbeit kein eindeutiger Einfluss der EGFRvIII-Expression beobachtet werden. Da im Gegensatz zur EGFR-Inhibition mittels Tyrosinkinaseinhibitoren, die bisher in GBM nur in klinischen Studien getestet wurden, der Einsatz von TMZ zur Standardtherapie des GBM gehört, sollte in der vorliegenden Arbeit auch untersucht werden, ob eine endogene EGFRvIII-Expression einen Einfluss auf die TMZ-Sensitivität hat.

Das Ausmaß der Zellinaktivierung nach TMZ-Behandlung hängt von der Anzahl der induzierten O<sup>6</sup>-meG, der MGMT-Expression sowie der Expression bzw. der Aktivität der MMR-Proteine ab. Ist MGMT nicht vorhanden, bleibt O<sup>6</sup>-meG bestehen und kann infolgedessen Fehlpaarungen mit Thymin eingehen, die mittels MMR behoben werden. Jedoch wird nicht das O<sup>6</sup>-meG selbst prozessiert, sondern verbleibt in der DNA. Auf diese Weise entstehen erneut Fehlpaarungen und sich wiederholende MMR-Zyklen ( *futile mismatch repair cycles*), welche immer wieder zu DSB und somit zur Zellinaktivierung führen können (s. Abb. 1.4) [112,117]. Daher ist davon auszugehen, dass bei einer gesteigerten Kapazität der MMR auch eine erhöhte TMZ-Sensitivität zu beobachten ist.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstaunlicherweise ein starker Einfluss des EGFRvIII auf die TMZ-Sensitivität beobachtet werden. Es zeigte sich, dass sowohl DKMGvIII<sup>+</sup>- als auch BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen deutlich sensibler gegenüber im Gehirn erreichbaren TMZ-Konzentrationen (bis zu 20 µM) waren (s. Abb. 4.15) [158].

Diese Ergebnisse sind von größtem Interesse, da sie die klinischen Daten von Montano *et al.* sowie aktuelle Daten von Van den Bent *et al.* unterstützen, die eine signifikant geringere EGFRvIII-Expression in GBM-Rezidiven von Patienten aufzeigten, die zuvor mit Radio- und Chemotherapie behandelt wurden [58,159]. Diese Beobachtungen deuten an, dass EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen nach Standardtherapie effektiver inaktiviert werden als EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen. Die Studie von Montano *et al.* konnte darüber hinaus aufzeigen, dass eine EGFRvIII-Expression mit einem besseren Überleben von GBM-Patienten assoziiert ist, die mit Standardtherapie behandelt wurden. Des Weiteren ist dies die einzig bekannte Studie, die neben EGFRvIII auch nach dem MGMT-Status differenziert hat. Hierbei konnte beobachtet werden, dass Patienten mit EGFRvIII-Expression und methyliertem MGMT-Promotor (keine MGMT-Expression eine deutlich bessere Prognose aufwiesen, als Patienten ohne EGFRvIII-Expression und fehlender MGMT-Expression. Um den Zusammenhang zwischen einer EGFRvIII-Expression und der TMZ-Sensitivität zu untersuchen, wurden in dieser Studie außerdem EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Neurosphären hinsichtlich ihrer TMZ-Sensitivität analysiert. Auch hier zeigte sich eine erhöhte TMZ-Sensitivität in EGFRvIII-exprimierenden Zellen [58].

Dies unterstützt die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung, dass EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen, die kein MGMT exprimierten deutlich sensitiver gegenüber der TMZ-Behandlung waren (s. Abb. 4.15). Die hier dargestellte Assoziation zwischen TMZ-Empfindlichkeit und EGFRvIII-Expression ist außerdem im Einklang mit einer präklinischen Studie von Wachsberger *et al.* Hier wurden EGFRvIII-exprimierende U87MG-Zellen in Mäuse transplantiert und hinsichtlich ihres Ansprechens auf Radio- und Chemotherapie mit Tumoren verglichen, die lediglich EGFR Wildtyp-Expression aufwiesen. Hierbei zeigte sich, dass die EGFRvIII<sup>+</sup>-Tumoren deutlich besser auf die TMZ-Behandlung sowie auf die kombinierte Behandlung mit Radio- und Chemotherapie ansprachen, was auf eine durch den EGFRvIII induzierte verminderte HR-Kapazität zurückgeführt wurde [160].

Die Unterschiede in der TMZ-Sensitivität von EGFRvIII<sup>-</sup>/<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien waren innerhalb der BS153-Zellen, die im Vergleich zu DKMGvIII<sup>+</sup>-Zellen den EGFRvIII stärker exprimierten, deutlicher ausgeprägt. Eine gezielter *knock down* des EGFRvIII in BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen konnte in diesem Zusammenhang bestätigen, dass die beobachtete TMZ-Sensitivität durch die EGFRvIII-Expression induziert wird (s. Abb. 4.18 C). Weitere Analysen zeigten darüber hinaus, dass eine verstärkte Expression von MMR-Proteinen in den TMZ-empfindlichen EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen vorlag, was auf eine gesteigerte MMR-

Kapazität schließen lässt. Solch ein Zusammenhang wurde bereits von Dosch *et al.* für CHO-Zellen beschrieben. Hier zeigte sich, dass MNNG - wie TMZ ebenfalls eine alkylierende Substanz - sensitive Zellen im Vergleich zu MNNG-resistenten Zellen eine höhere Expression der MMR-Proteine MSH2 und MSH6 aufwiesen und somit eine erhöhte Expression dieser Proteine mit einer gesteigerten MMR-Kapazität bzw. höheren Chemosensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien assoziiert zu sein scheint [137].

Im Rahmen der Analyse der MMR-Proteine fiel auf, dass in BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen keine MSH6-Expression detektiert werden konnte. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass eine EGFRvIII-Expression eine verstärkte Expression von MMR-Proteinen induziert. Diese Hypothese konnte durch einen gezielten EGFRvIII *knock down* bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass eine gezielte Herunterregulation von EGFRvIII in BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen zu einer deutlichen Reduktion des MSH6-Proteins führte (s. Abb. 4.20). In diesem Zusammenhang konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass sowohl MSH2 als auch MSH6 durch EGFR-abhängige Signalwege reguliert werden [161,162].

Die Unterschiede in der TMZ-Sensitivität der EGFRvIII<sup>-/+</sup>-Sub-Zelllinien konnten zudem nicht auf Unterschiede in der MGMT-Expression zurückgeführt werden (s. Abb. 4.16). Eine mögliche Ursache für eine höhere MMR-Proteinexpression bzw. MMR-Kapazität ist ein EGFRvIII-induzierter Replikationsstress. Dabei wird davon ausgegangen, dass EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen als Reaktion auf den Replikationsstress MMR-Proteine hochregulieren. Der Nachweis des Replikationsstresses erfolgte mittels *Western Blot* und *Fiber Assay*. Die gewonnenen Daten bestätigen die Hypothese, dass EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen vermehrt unter Replikationsstress leiden. Mittels *Fiber Assay* konnten eine geringere Elongationsrate, mehr angehaltene Replikationsgabeln sowie mehr Initiationsereignisse in DKMGvIII<sup>+</sup>- sowie BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden, welche Marker für Replikationsstress sind. Darüber hinaus wiesen DKMGvIII<sup>+</sup>- und BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu den EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen, wie bereits erwähnt, mehr basale H2AX-Phosphorylierung auf, was ebenfalls ein Indiz für Replikationsstress ist. Des Weiteren zeigten die EGFRvIII<sup>+</sup>-Sub-Zelllinien im unbehandelten Zustand eine aktivierte DDR, welche sich u.a. durch eine stärkere Aktivierung von Chk2 und ATM in DKMGvIII<sup>+</sup>- und BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu den jeweiligen EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen äußerte (s. Abb. 4.23 B). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass im Zuge des durch den EGFRvIII-induzierten Replikationsstress sekundäre DSB entstehen, wodurch ATM und Chk2 aktiviert werden. Sekundäre DSB, die eine Aktivierung von ATM und Chk2 zur



Folge haben, entstehen in Folge von Replikationsstress oftmals in der Nähe von Replikationsgabeln. Dabei liegen in der Regel einzelsträngige DNA-Abschnitte vor, die von Nukleasen abgebaut werden, wodurch wiederum DSB induziert werden können [138]. Diese Beobachtungen werden durch Daten, die von Nitta *et al.* publiziert wurden unterstützt. In dieser prä-klinischen Studie konnte sowohl in U87MG-EGFRvIII-Zellen als auch in U87MG-EGFRvIII-Tumoren eine verstärkte Chk2- sowie H2AX-Phosphorylierung nachgewiesen werden, die auf eine erhöhte Konzentration an ROS zurückzuführen war. Darüber hinaus exprimierten U87MG-EGFRvIII-Zellen ein erhöhten Level an Proteinen, die an der Reparatur von oxidativen Basenschäden beteiligt sind [118].

BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen zeigten darüber hinaus im Gegensatz zu BS153vIII<sup>-</sup>-Zellen auch eine erhöhte Expression von ATM und Chk1 sowie eine stärkere Chk1-Phosphorylierung (s. Abb. 4.23 B). Chk1 ist maßgeblich an der Regulation der Replikation beteiligt und wird im Zuge von Replikationsstress durch ATR aktiviert [106,125,126,138]. Interessanterweise konnten Petermann *et al.* in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine erhöhte Initiation der Replikation zu einer langsameren Elongation führt (vgl. Fiber-Daten, Abb. 4.23) und Chk1 die Progression der Replikationsgabeln durch die Kontrolle der Ori-Aktivität fördert. Somit könnte die verstärkte Expression und Aktivierung von Chk1 in den BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen mit der langsameren Elongation und der vermehrten Initiation der Replikation assoziiert sein. Darüber hinaus ist Chk1 wesentlich an der Stabilisierung angehaltener Replikationsgabeln beteiligt und reguliert die Aktivierung schlafender Replikationsursprünge im Zuge von Replikationsstress [122,163]. Die Daten der hier vorliegenden Arbeit werden außerdem durch eine Studie von Li *et al.* gestützt, die in PTEN-defizienten neuronalen Vorläuferzellen, die mit EGFRvIII transfiziert worden waren, ebenfalls eine erhöhte basale H2AX- sowie Chk1-Phosphorylierung beobachten konnten [152].

Somit wird die Hypothese unterstützt, dass in EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen vermehrt Replikationsstress vorliegt und dieser zu einer erhöhten MMR-Proteinexpression sowie einer hiermit verbundenen gesteigerten TMZ-Sensitivität führt. Dieser Replikationsstress führt darüber hinaus zu sekundären DSB und sogar zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Topotecan (Daten nicht gezeigt). Topotecan, welches die Topoisomerase I inhibiert, führt zu Einzelstrangbrüchen und DSB während der Replikation. Somit sind Zellen, die unter basalem Replikationsstress leiden in der Regel empfindlich gegenüber der Topotecan-Behandlung.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass in EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen als Reaktion auf den Replikationsstress MMR-Proteine hochreguliert werden. Dies ist bei den BS153vIII<sup>+</sup>-

Zellen, die sehr viel EGFRvIII exprimieren, besonders stark ausgeprägt. Auch zeigen diese Zellen eine geringere Anwachsrate, was vermutlich auch auf den EGFRvIII-induzierten Replikationsstress zurückzuführen ist, da es durch die entstehenden DNA-Schäden zu einer permanenten Zellinaktivierung kommen kann.

Erste Daten, die im Rahmen der Bachelorarbeit von Leonie Ott entstanden sind, deuten daraufhin, dass sowohl ROS als auch eine fehlregulierte Transkription an dem EGFRvIII-induzierten Replikationsstress beteiligt sind. Da durch ROS-induzierte DNA-Schäden wie 8-Oxoguanin u.a. durch MMR repariert werden, könnte die erhöhte MMR-Proteinexpression in BS153vIII<sup>+</sup>-Zellen auf diese Beobachtung zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen deutlich empfindlicher gegenüber TMZ sind und diese Sensitivität vermutlich auf eine erhöhte MMR-Kapazität, die durch Replikationsstress induziert wird, zurückzuführen ist.

## 5.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit erstmalig, dass eine endogene EGFRvIII-Expression nicht zu einer veränderten Strahlenempfindlichkeit von EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen führt und eine EGFRvIII-Expression kein Marker für das Ansprechen oder die Resistenz gegenüber einer EGFR-Inhibition mittels Gefitinib ist. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass MGMT-negative EGFRvIII-exprimierende Zellen im Vergleich zu EGFRvIII<sup>-</sup>-Zellen eine deutlich erhöhte TMZ-Sensitivität aufweisen. Diese liegt mutmaßlich in einer gesteigerten MMR-Kapazität begründet, die durch vermehrten Replikationsstress in EGFRvIII<sup>+</sup>-Zellen induziert wird.

## 5.5 Modell und Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind aus mehreren Gründen von großer Bedeutung:

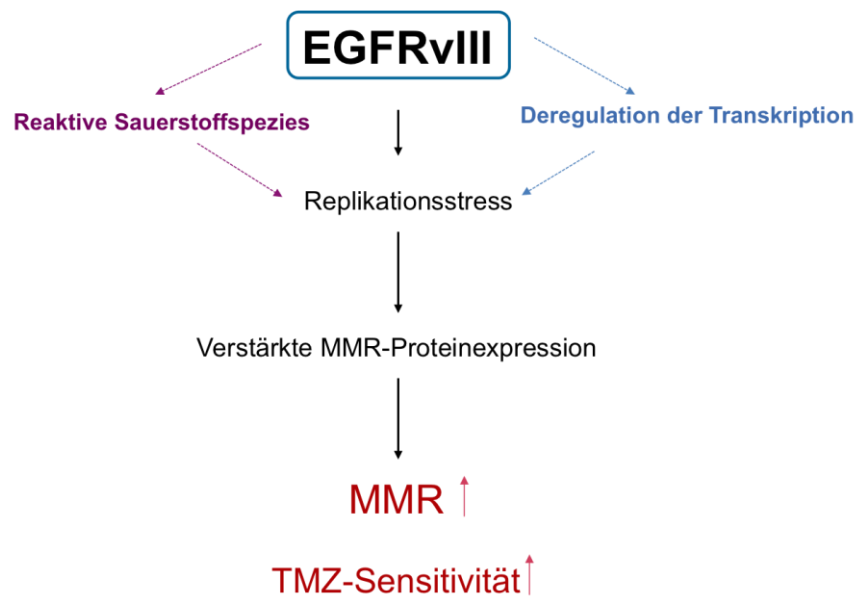
1. Sie unterstützen von prä-klinischer Seite aktuelle klinische Studien, die – im Gegensatz zu älteren Studien - sowohl keinen Zusammenhang zwischen einer EGFRvIII-Expression und einer Radioresistenz erkennen lassen, als auch keine Verbesserung der Therapie von GBM-Patienten bei EGFR-Inhibition aufzeigen, unabhängig vom EGFRvIII-Status. [27,37,38].

2. Die Arbeiten zeigen aber auch, dass sich der EGFRvIII als möglicher prädiktiver Biomarker für die Empfindlichkeit von MGMT-negativen Tumoren gegenüber TMZ eignet, wofür ein molekulares und mechanistisches Modell erarbeitet werden konnte (s. Abb. 5.1).

Vor diesem Hintergrund stellt sich aber die Frage, warum bisher in den meisten Studien nicht beobachtet werden konnte, dass EGFRvIII-positive GBM-Patienten besser auf die TMZ-basierte Standardtherapie ansprechen. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass in diesen Studien lediglich nach EGFRvIII-Status und nicht zusätzlich nach MGMT-Status differenziert wurde. Auf Basis der Daten, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit generiert worden sind, sollten aber Patienten mit EGFRvIII-Expression und MGMT-Hypermethylierung, d.h. keiner MGMT-Expression, besonders gut auf die TMZ-Therapie ansprechen, was sich bereits in der Studie von Montano *et al.* angedeutet hat [58].

Abb. 5.1 zeigt das postulierte Modell, welches das unterschiedliche zelluläre Überleben nach TMZ-Behandlung in Zellen mit und ohne EGFRvIII-Expression erklärt.

Der EGFRvIII induziert Replikationsstress, welcher zu einer gesteigerten MMR-Kapazität sowie einer hierdurch bedingten erhöhten TMZ-Sensitivität in EGFRvIII+-Zellen führt. In EGFRvIII--Zellen liegt eine geringere MMR-Proteinexpression vor, wodurch die TMZ-abhängigen DNA-Schäden weniger prozessiert werden und infolgedessen auch weniger DSB entstehen, so dass EGFRvIII--Zellen resistenter gegenüber der TMZ-Behandlung sind. Wegen des geringeren Replikationsstress weisen die EGFRvIII--Zellen weniger basale DNA-Schäden als EGFRvIII+-Zellen auf, wodurch die TMZ-Behandlung ebenfalls einen weniger zytotoxischen Effekt auf die Zellen haben könnte. Es gilt abschließend zu klären, ob der Replikationsstress auf eine erhöhte ROS-Konzentration oder auf eine Deregulation der Transkription zurückzuführen ist.



**Abb. 5.1: Modell zur Erklärung der erhöhten TMZ-Sensitivität in EGFRvIII+-Zellen.** Eine EGFRvIII-Expression induziert Replikationsstress, welcher für die erhöhte MMR-Proteinexpression in EGFRvIII+ Zellen verantwortlich ist. Diese führt wiederum zu einer gesteigerten MMR-Kapazität und einer hiermit assoziierten verstärkten TMZ-Sensitivität. In Folgearbeiten soll abschließend geklärt werden, ob dem EGFRvIII-induzierten Replikationsstress eine Deregulation der Transkription oder eine erhöhte ROS-Konzentration zugrunde liegt. Erste Experimente stützen diese Hypothese.

Aktuelle klinische Daten unterstützen diese Beobachtungen, da erstens Glioblastomrezidive von Patienten, die mit Radio- und Chemotherapie nach heutigem klinischem Standard behandelt wurden, eine signifikant geringere EGFRvIII-Expression aufweisen [58,159] und zweitens Patienten mit EGFRvIII-Expression und methyliertem MGMT-Promotor eine deutlich bessere Prognose hatten, als Patienten ohne EGFRvIII-Expression und fehlender MGMT-Expression [58]. Somit scheinen EGFRvIII-exprimierende Zellen im Vergleich zu EGFRvIII--Zellen besser auf die Therapie anzusprechen.

Basierend auf dem aktuellen Kenntnisstand und der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eröffnen sich somit neue potenzielle therapeutische Perspektiven und Strategien. In zukünftigen klinischen Studien sollte sowohl nach MGMT- als auch nach EGFRvIII-Status differenziert werden, da Patienten ohne MGMT-Expression, die jedoch eine EGFRvIII-Expression aufweisen, möglicherweise besonders von der TMZ-Behandlung profitieren. Des Weiteren könnten Patienten, die nicht oder nur schlecht auf die Therapie ansprechen würden, identifiziert werden, so dass diese nicht unnötig durch die TMZ-Behandlung belastet würden. Hier wäre eine alleinige Radiotherapie vermutlich sinnvoller und hätte zudem weniger Nebenwirkungen. Darüber hinaus wäre es auch

sinnvoll Tumoren mit gesteigerter MMR-Proteinexpression sowie Replikationsstress zu identifizieren, da diese besonders gut auch auf alternative Therapeutika wie Topotecan oder PARP-Inhibitoren ansprechen sollten. Denkbar wäre für solche Tumoren auch eine kombinierte Therapie dieser Substanzen plus Röntgenbestrahlung.

Vor diesem Hintergrund sollen in Folgearbeiten orthotrope Mausmodelle basierend auf DKMGvIII<sup>-/+</sup>- und BS153vIII<sup>-/+</sup>-Zellen etabliert werden, um das Ansprechen der EGFRvIII<sup>-</sup>- und EGFRvIII<sup>+</sup>-Tumoren auf IR, TMZ und alternative Substanzen zu analysieren. Zudem soll in Tumoren mittels Immunhistochemie untersucht werden, ob eine erhöhte MMR-Proteinexpression sowie aktivierte DDR auch in Patientenproben nachgewiesen werden können und somit als Biomarker für sensitive Tumoren etabliert werden können.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
53BP1	p53-bindendes Protein
Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
Alt-NHEJ	Alternative Nicht-homologe Endverknüpfung ( <i>alternative non-homologous endjoining</i> )
APNG	Alkylpurin-DNA-N-Glykosylase
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM- and Rad3-related</i>
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
Bim	<i>bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BRCA1	<i>breast cancer early onset 1</i>
BRCA2	<i>breast cancer early onset 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	Beziehungsweise
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4
Chk1	<i>checkpoint kinase 1</i>
Chk2	<i>checkpoint kinase 2</i>
CldU	5-Chloro-2'-deoxyuridine
cMet	Hepatozellulärer Wachstumsfaktorrezeptor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DDR	DNA-Schadensantwort ( <i>DNA damage response</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNA-PKcs	DNA-abhängige Proteinkinase ( <i>cs, catalytic subunit</i> )
DSB	Doppelstrangbruch
FKS	fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGFRvIII	Deletionsmutante des EGFR (Variante III)
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	und andere
ExoI	<i>exonuclease I</i>
G1	1. Lücke ( <i>gap</i> ) des Zellzyklus
G2	2. Lücke ( <i>gap</i> ) des Zellzyklus
GBM	Glioblastom
GHS	Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
HCl	Salzsäure
HER2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HER3	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 3
HER4	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 4
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HR	Homologie-vermittelte Reparatur
h	Stunde
IDH1/2	Isocitrat-Dehydrogenase $\frac{1}{2}$
IdU	5-Iodo-2'-deoxyuridine
IR	Bestrahlung ( <i>irradiation</i> )
JAK2	c-Jun N-terminale Kinase 2
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Max	Maximum
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>

---

MDM2	<i>mouse double minute 2</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minuten
Min	Minimum
MLH1	<i>DNA mismatch repair protein MLH 1</i>
mm	Millimeter
MMR	<i>mismatch repair</i>
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
MSH2	<i>DNA mismatch repair protein MSH2</i>
MSH3	<i>DNA mismatch repair protein MSH3</i>
MSH6	<i>DNA mismatch repair protein MSH6</i>
MTIC	<i>5-(-3-methyltriazin-1-yl)imidazole-4-carboxamid</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
NF1	Neurofibromin
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung ( <i>non-homologous endjoining</i> )
ns	nicht signifikant
p53	Tumorsuppressorprotein 53 kDa
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptors</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKB	Proteinkinase B
PMS2	<i>mismatch repair endonuclease PMS2</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Rad50	DNA Reparaturprotein RAD50
Rad51	DNA Reparaturprotein RAD51 Homolog 1
Rad52	DNA Reparaturprotein RAD52
Raf	Zelluläre Variante des <i>virus-induced rapidly accelerated fibrosarcoma proteins</i>



Ras	<i>rat sarcoma protein</i>
RB1	Retinoblastom-Protein
RFC	<i>replication factor C</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SF6	<i>survival fraction at 6 Gy</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SSA	Einzelstrangverknüpfung (single strand annealing)
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TGF $\alpha$	<i>transforming growth factor <math>\alpha</math></i>
TMZ	Temozolomid
Tyr	Tyrosin
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultra-violette Strahlung
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume/volume</i> (Volumen/Volumen)
WHO	<i>World Health Organisation</i>
wt/vol	<i>weight/volume</i> (Gewicht/Volumen)
WT	Wildtyp
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing</i>
$\gamma$ H2AX	Phosphoryliertes Histon 2A

## 7 Literaturverzeichnis

1. Westermark B (2012) Glioblastoma--a moving target. *Ups J Med Sci* 117: 251-256.
2. Ohgaki H, Kleihues P (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 100: 2235-2241.
3. Kesari S (2011) Understanding Glioblastoma Tumor Biology: The Potential to Improve Current Diagnosis and Treatments. *Seminars in Oncology* 38, Supplement 4: S2-S10.
4. Marumoto T, Saya H (2012) Molecular biology of glioma. *Adv Exp Med Biol* 746: 2-11.
5. Kleihues P, Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1: 44-51.
6. Chen J, McKay RM, Parada LF (2012) Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell* 149: 36-47.
7. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321: 1807-1812.
8. Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K (2005) The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med* 3: 38.
9. Liu L, Backlund LM, Nilsson BR, Grandner D, Ichimura K, et al. (2005) Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl)* 83: 917-926.
10. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, et al. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2965-2969.
11. Huang PH, Xu AM, White FM (2009) Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal* 2: re6.
12. Roth P, Weller M (2014) Challenges to targeting epidermal growth factor receptor in glioblastoma: escape mechanisms and combinatorial treatment strategies. *Neuro Oncol* 16 Suppl 8: viii14-19.
13. Bianco R, Shin I, Ritter CA, Yakes FM, Basso A, et al. (2003) Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 22: 2812-2822.
14. Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, Peters N, Meyer-Puttlitz B, et al. (1998) PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 16: 2259-2264.
15. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997) Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 94: 303-309.
16. Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170: 1445-1453.
17. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, et al. (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 997-1003.

18. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, et al. (2008) Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 26: 4189-4199.
19. Ichimura K, Schmidt EE, Miyakawa A, Goike HM, Collins VP (1998) Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer* 22: 9-15.
20. Karlbom AE, James CD, Boethius J, Cavenee WK, Collins VP, et al. (1993) Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10. *Hum Genet* 92: 169-174.
21. Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, et al. (1995) Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10: 2243-2246.
22. Korf BR (2000) Malignancy in neurofibromatosis type 1. *Oncologist* 5: 477-485.
23. Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H (1997) Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 180-185.
24. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H (2009) IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res* 15: 6002-6007.
25. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H (2009) IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 174: 1149-1153.
26. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 360: 765-773.
27. Weller M, Kaulich K, Hentschel B, Felsberg J, Gramatzki D, et al. (2014) Assessment and prognostic significance of the epidermal growth factor receptor vIII mutation in glioblastoma patients treated with concurrent and adjuvant temozolomide radiochemotherapy. *Int J Cancer* 134: 2437-2447.
28. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, et al. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10: 459-466.
29. Horsman M, Wouters BG, Joiner MC, Overgaard J (2009) The oxygen effect and fractionated radiotherapy, in *Basic clinical radiobiology*. Editors. 2009, Hodder Arnold: London. ed. pp. p. 207-2016.
30. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996.
31. Chalmers AJ, Ruff EM, Martindale C, Lovegrove N, Short SC (2009) Cytotoxic effects of temozolomide and radiation are additive- and schedule-dependent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75: 1511-1519.
32. Kaina B, Christmann M (2002) DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40: 354-367.

33. Kaina B, Ochs K, Grosch S, Fritz G, Lips J, et al. (2001) BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 41-54.
34. Stupp R, Hegi M, Weller M (2010) Neuro-oncology, a decade of temozolomide and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther* 10: 1675-1677.
35. Del Vecchio CA, Giacomini CP, Vogel H, Jensen KC, Florio T, et al. (2013) EGFRvIII gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. *Oncogene* 32: 2670-2681.
36. Shinjima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, et al. (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63: 6962-6970.
37. Brown PD, Krishnan S, Sarkaria JN, Wu W, Jaeckle KA, et al. (2008) Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J Clin Oncol* 26: 5603-5609.
38. Chakravarti A, Wang M, Robins HI, Lautenschlaeger T, Curran WJ, et al. (2013) RTOG 0211: a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 85: 1206-1211.
39. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, et al. (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 353: 2012-2024.
40. Mukherjee B, McEllin B, Camacho CV, Tomimatsu N, Sirasanagandala S, et al. (2009) EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Res* 69: 4252-4259.
41. Stea B, Falsey R, Kislin K, Patel J, Glanzberg H, et al. (2003) Time and dose-dependent radiosensitization of the glioblastoma multiforme U251 cells by the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa'). *Cancer Lett* 202: 43-51.
42. Padfield E, Ellis HP, Kurian KM (2015) Current Therapeutic Advances Targeting EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma. *Front Oncol* 5: 5.
43. Saker J, Kriegs M, Zenker M, Heldt JM, Eke I, et al. (2013) Inactivation of HNSCC cells by <sup>90</sup>Y-labeled cetuximab strictly depends on the number of induced DNA double-strand breaks. *J Nucl Med* 54: 416-423.
44. Eller JL, Longo SL, Hicklin DJ, Canute GW (2002) Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 51: 1005-1013; discussion 1013-1004.
45. Jutten B, Dubois L, Li Y, Aerts H, Wouters BG, et al. (2009) Binding of cetuximab to the EGFRvIII deletion mutant and its biological consequences in malignant glioma cells. *Radiother Oncol* 92: 393-398.
46. Neyns B, Sadones J, Joosens E, Bouttens F, Verbeke L, et al. (2009) Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol* 20: 1596-1603.
47. Pardridge WM (2002) Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron* 36: 555-558.
48. Mrugala MM (2013) Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discov Med* 15: 221-230.

49. Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, Eberhard DA, Jelluma N, et al. (2005) Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J Natl Cancer Inst* 97: 880-887.
50. Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, et al. (2004) Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 22: 133-142.
51. De Witt Hamer PC (2010) Small molecule kinase inhibitors in glioblastoma: a systematic review of clinical studies. *Neuro Oncol* 12: 304-316.
52. Peereboom DM, Shepard DR, Ahluwalia MS, Brewer CJ, Agarwal N, et al. (2010) Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 98: 93-99.
53. Babu R, Adamson DC (2012) Rindopepimut: an evidence-based review of its therapeutic potential in the treatment of EGFRvIII-positive glioblastoma. *Core Evid* 7: 93-103.
54. Heimberger AB, Crotty LE, Archer GE, Hess KR, Wikstrand CJ, et al. (2003) Epidermal growth factor receptor VIII peptide vaccination is efficacious against established intracerebral tumors. *Clin Cancer Res* 9: 4247-4254.
55. Sampson JH, Aldape KD, Archer GE, Coan A, Desjardins A, et al. (2011) Greater chemotherapy-induced lymphopenia enhances tumor-specific immune responses that eliminate EGFRvIII-expressing tumor cells in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol* 13: 324-333.
56. Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, et al. (2010) Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 28: 4722-4729.
57. Schuster J, Lai RK, Recht LD, Reardon DA, Paleologos NA, et al. (2015) A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro Oncol*.
58. Montano N, Cenci T, Martini M, D'Alessandris QG, Pelacchi F, et al. (2011) Expression of EGFRvIII in glioblastoma: prognostic significance revisited. *Neoplasia* 13: 1113-1121.
59. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y (2004) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 903-913.
60. Herbst RS (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59: 21-26.
61. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19: 3159-3167.
62. Krieger M, Kasten-Pisula U, Rieckmann T, Holst K, Saker J, et al. (2010) The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst)* 9: 889-897.
63. Myllynen L, Rieckmann T, Dahm-Daphi J, Kasten-Pisula U, Petersen C, et al. (2011) In tumor cells regulation of DNA double strand break repair through EGF receptor involves both NHEJ and HR and is independent of p53 and K-Ras status. *Radiother Oncol* 101: 147-151.

64. Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, et al. (2008) Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* 15: 209-219.
65. Huang Y, Chang YHaY (2011) Epidermal Growth Factor (EGFR) Phosphorylation, Signaling and Trafficking in Prostate Cancer. *Prostate Cancer*.
66. Drosten M, Lechuga CG, Barbacid M (2013) Genetic analysis of Ras genes in epidermal development and tumorigenesis. *Small GTPases* 4: 236-241.
67. Batzer AG, Blaikie P, Nelson K, Schlessinger J, Margolis B (1995) The phosphotyrosine interaction domain of Shc binds an LXNPXY motif on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 15: 4403-4409.
68. Dhillon AS, von Kriegsheim A, Grindlay J, Kolch W (2007) Phosphatase and feedback regulation of Raf-1 signaling. *Cell Cycle* 6: 3-7.
69. Wortzel I, Seger R (2011) The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* 2: 195-209.
70. Qi XJ, Wildey GM, Howe PH (2006) Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *J Biol Chem* 281: 813-823.
71. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P (2012) PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 195-203.
72. Koul D (2008) PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther* 7: 1321-1325.
73. Zahonero C, Sanchez-Gomez P (2014) EGFR-dependent mechanisms in glioblastoma: towards a better therapeutic strategy. *Cell Mol Life Sci* 71: 3465-3488.
74. Prigent SA, Nagane M, Lin H, Huvar I, Boss GR, et al. (1996) Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem* 271: 25639-25645.
75. Fernandes H, Cohen S, Bishayee S (2001) Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DeltaEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem* 276: 5375-5383.
76. Gan HK, Kaye AH, Luwor RB (2009) The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 16: 748-754.
77. Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H (2004) Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol* 14: 131-136.
78. Vogt N, Lefevre SH, Apiou F, Dutrillaux AM, Cor A, et al. (2004) Molecular structure of double-minute chromosomes bearing amplified copies of the epidermal growth factor receptor gene in gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11368-11373.
79. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, et al. (2010) New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol* 23: 856-865.
80. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, et al. (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10: 619-624.

81. Viana-Pereira M, Lopes JM, Little S, Milanezi F, Basto D, et al. (2008) Analysis of EGFR overexpression, EGFR gene amplification and the EGFRvIII mutation in Portuguese high-grade gliomas. *Anticancer Res* 28: 913-920.
82. Wells A (2000) Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 78: 31-101.
83. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, et al. (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282: 11221-11229.
84. Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, et al. (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 56: 5079-5086.
85. Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ (1998) Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5724-5729.
86. Garnett J, Chumbalkar V, Vaillant B, Gururaj AE, Hill KS, et al. (2013) Regulation of HGF expression by DeltaEGFR-mediated c-Met activation in glioblastoma cells. *Neoplasia* 15: 73-84.
87. Golding SE, Morgan RN, Adams BR, Hawkins AJ, Povirk LF, et al. (2009) Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells. *Cancer Biol Ther* 8: 730-738.
88. Pelloski CE, Ballman KV, Furth AF, Zhang L, Lin E, et al. (2007) Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol* 25: 2288-2294.
89. Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071-1078.
90. Dikomey E, Borgmann K, Kriegs M, Mansour W, Petersen C, et al. (2012) Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen. *Onkologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen* (Hrsg Zeller, zur Hausen): Ecomed Medizin: Landsberg/Lech. p. 20.
91. Yaromina A, Krause M, Thames H, Rosner A, Krause M, et al. (2007) Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 83: 304-310.
92. de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, et al. (2001) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* 8: 1129-1135.
93. Shibata A, Jeggo PA (2014) DNA double-strand break repair in a cellular context. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 26: 243-249.
94. Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, et al. (2003) Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278: 20303-20312.

95. Liu S, Opiyo SO, Manthey K, Glanzer JG, Ashley AK, et al. (2012) Distinct roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA phosphorylation and checkpoint activation in response to replication stress. *Nucleic Acids Res* 40: 10780-10794.
96. Shibata A, Moiani D, Arvai AS, Perry J, Harding SM, et al. (2014) DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol Cell* 53: 7-18.
97. Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276: 47759-47762.
98. Petrini JH, Stracker TH (2003) The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* 13: 458-462.
99. Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, et al. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12: 162-169.
100. Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23: 5706-5715.
101. Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, Bonner WM (2003) Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther* 2: 233-235.
102. Doil C, Mailand N, Bekker-Jensen S, Menard P, Larsen DH, et al. (2009) RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* 136: 435-446.
103. Mattioli F, Vissers JH, van Dijk WJ, Ikpa P, Citterio E, et al. (2012) RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell* 150: 1182-1195.
104. Frit P, Barboule N, Yuan Y, Gomez D, Calsou P (2014) Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA Repair (Amst)* 17: 81-97.
105. Lord CJ, Ashworth A (2012) The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481: 287-294.
106. Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 66: 1039-1056.
107. Arnaudeau C, Lundin C, Helleday T (2001) DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol* 307: 1235-1245.
108. van Gent DC, van der Burg M (2007) Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* 26: 7731-7740.
109. Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J (2010) Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, Vol 44 44: 113-139.
110. Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, et al. (2002) Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* 420: 93-98.
111. Bobola MS, Kolstoe DD, Blank A, Chamberlain MC, Silber JR (2012) Repair of 3-methyladenine and abasic sites by base excision repair mediates glioblastoma resistance to temozolomide. *Front Oncol* 2: 176.
112. Roos WP, Kaina B (2013) DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* 332: 237-248.



113. Kaina B (2003) DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol* 66: 1547-1554.
114. Roos WP, Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12: 440-450.
115. Colussi C, Parlanti E, Degan P, Aquilina G, Barnes D, et al. (2002) The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. *Curr Biol* 12: 912-918.
116. Mojas N, Lopes M, Jiricny J (2007) Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev* 21: 3342-3355.
117. Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 335-346.
118. Nitta M, Kozono D, Kennedy R, Stommel J, Ng K, et al. (2010) Targeting EGFR induced oxidative stress by PARP1 inhibition in glioblastoma therapy. *PLoS One* 5: e10767.
119. Lange SS, Takata K, Wood RD (2011) DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer* 11: 96-110.
120. Gillespie PJ, Blow JJ (2010) Clusters, factories and domains: The complex structure of S-phase comes into focus. *Cell Cycle* 9: 3218-3226.
121. Sorensen CS, Syljuasen RG (2012) Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res* 40: 477-486.
122. Ge XQ, Blow JJ (2010) Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J Cell Biol* 191: 1285-1297.
123. Bahassi EM, Ovesen JL, Riesenberger AL, Bernstein WZ, Hasty PE, et al. (2008) The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene* 27: 3977-3985.
124. Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewska J, Syljuasen RG, Lundin C, et al. (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* 7: 195-201.
125. Patil M, Pabla N, Dong Z (2013) Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci* 70: 4009-4021.
126. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, et al. (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14: 1448-1459.
127. Okita N, Minato S, Ohmi E, Tanuma S, Higami Y (2012) DNA damage-induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by an intramolecular mechanism. *FEBS Lett* 586: 3974-3979.
128. Zheng Q, Han L, Dong Y, Tian J, Huang W, et al. (2014) JAK2/STAT3 targeted therapy suppresses tumor invasion via disruption of the EGFRvIII/JAK2/STAT3 axis and associated focal adhesion in EGFRvIII-expressing glioblastoma. *Neuro Oncol* 16: 1229-1243.

129. Cerrato JA, Yung WK, Liu TJ (2001) Introduction of mutant p53 into a wild-type p53-expressing glioma cell line confers sensitivity to Ad-p53-induced apoptosis. *Neuro Oncol* 3: 113-122.
130. Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, O'Rourke DM, Maity A (2003) PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res* 63: 236-241.
131. Brazdova M, Quante T, Togel L, Walter K, Loscher C, et al. (2009) Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences. *Nucleic Acids Res* 37: 1486-1500.
132. Trepel M, Groscurth P, Malipiero U, Gulbins E, Dichgans J, et al. (1998) Chemosensitivity of human malignant glioma: modulation by p53 gene transfer. *J Neurooncol* 39: 19-32.
133. Wick W, Furnari FB, Naumann U, Cavenee WK, Weller M (1999) PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis. *Oncogene* 18: 3936-3943.
134. Jackson DA, Pombo A (1998) Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* 140: 1285-1295.
135. Zürich E (2015) <http://www.facs.ethz.ch/FACS>. In: Alfredo Franco-Obregón P, Institute for Biomedical Engineering, editor: Alfredo Franco-Obregón, PhD, Institute for Biomedical Engineering.
136. Kriegs M, Gurtner K, Can Y, Brammer I, Rieckmann T, et al. (2015) Radiosensitization of NSCLC cells by EGFR inhibition is the result of an enhanced p53-dependent G1 arrest. *Radiother Oncol*.
137. Dosch J, Christmann M, Kaina B (1998) Mismatch G-T binding activity and MSH2 expression is quantitatively related to sensitivity of cells to methylating agents. *Carcinogenesis* 19: 567-573.
138. Cimprich KA, Cortez D (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 616-627.
139. Lammering G, Hewit TH, Valerie K, Contessa JN, Amorino GP, et al. (2003) EGFRvIII-mediated radioresistance through a strong cytoprotective response. *Oncogene* 22: 5545-5553.
140. Schulte A, Gunther HS, Martens T, Zapf S, Riethdorf S, et al. (2012) Glioblastoma stem-like cell lines with either maintenance or loss of high-level EGFR amplification, generated via modulation of ligand concentration. *Clin Cancer Res* 18: 1901-1913.
141. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Friedman HS, Werner MH, et al. (1988) Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts. *Cancer Res* 48: 2231-2238.
142. Pandita A, Aldape KD, Zadeh G, Guha A, James CD (2004) Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR. *Genes Chromosomes Cancer* 39: 29-36.
143. Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, et al. (2003) Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal

- growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res* 63: 413-416.
144. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emler DR, Montgomery RB, Wong AJ (1998) Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273: 200-206.
  145. Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, et al. (2007) Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12867-12872.
  146. Schulte A, Liffers K, Kathagen A, Riethdorf S, Zapf S, et al. (2013) Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110delta. *Neuro Oncol* 15: 1289-1301.
  147. Ning Y, Zeineldin R, Liu Y, Rosenberg M, Stack MS, et al. (2005) Down-regulation of integrin alpha2 surface expression by mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) induces aberrant cell spreading and focal adhesion formation. *Cancer Res* 65: 9280-9286.
  148. Cha H, Lowe JM, Li H, Lee JS, Belova GI, et al. (2010) Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. *Cancer Res* 70: 4112-4122.
  149. Chowdhury D, Xu X, Zhong X, Ahmed F, Zhong J, et al. (2008) A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell* 31: 33-46.
  150. Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, et al. (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* 5: 905-915.
  151. Lorat Y, Schanz S, Schuler N, Wennemuth G, Rube C, et al. (2012) Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PLoS One* 7: e38165.
  152. Li L, Dutra A, Pak E, Labrie JE, 3rd, Gerstein RM, et al. (2009) EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors. *Neuro Oncol* 11: 9-21.
  153. Chavaudra N, Bourhis J, Foray N (2004) Quantified relationship between cellular radiosensitivity, DNA repair defects and chromatin relaxation: a study of 19 human tumour cell lines from different origin. *Radiother Oncol* 73: 373-382.
  154. Learn CA, Hartzell TL, Wikstrand CJ, Archer GE, Rich JN, et al. (2004) Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 10: 3216-3224.
  155. Pedersen MW, Pedersen N, Ottesen LH, Poulsen HS (2005) Differential response to gefitinib of cells expressing normal EGFR and the mutant EGFRvIII. *Br J Cancer* 93: 915-923.
  156. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, Rosen N (2001) The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 61: 7184-7188.
  157. Hegi ME, Diserens AC, Bady P, Kamoshima Y, Kouwenhoven MC, et al. (2011) Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the

- 
- EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib--a phase II trial. *Mol Cancer Ther* 10: 1102-1112.
158. Portnow J, Badie B, Chen M, Liu A, Blanchard S, et al. (2009) The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation. *Clin Cancer Res* 15: 7092-7098.
159. van den Bent MJ, Gao Y, Kerkhof M, Kros JM, Gorlia T, et al. (2015) Changes in the EGFR amplification and EGFRvIII expression between paired primary and recurrent glioblastomas. *Neuro Oncol*.
160. Wachsberger PR, Lawrence RY, Liu Y, Rice B, Daskalakis C, et al. (2013) Epidermal growth factor receptor mutation status and rad51 determine the response of glioblastoma to multimodality therapy with cetuximab, temozolomide, and radiation. *Front Oncol* 3: 13.
161. Christmann M, Tomicic MT, Kaina B (2002) Phosphorylation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 affecting MutSalpha mismatch-binding activity. *Nucleic Acids Res* 30: 1959-1966.
162. Fan QW, Cheng C, Knight ZA, Haas-Kogan D, Stokoe D, et al. (2009) EGFR signals to mTOR through PKC and independently of Akt in glioma. *Sci Signal* 2: ra4.
163. Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, et al. (2005) Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 25: 3553-3562.



## 8 Anhang

Tab. 8.1: Auflistung der Gefahrstoffe nach GHS.

Bezeichnung	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Dithiothreitol	GHS07	302, 315, 319	305+352, 305+351+338
Ethylendiamin- tetraessig-säure	GHS07	319	305+351+338
Eisessig	GHS05, GHS07	226, 314	280, 301+ P330+P331, 305+ 351+338
Ethanol	GHS02	225	403+233
Formaldehyd	GHS05, GHS06, GHS08	351, 331, 311, 301, 314, 317	301+310, 303+361+353, 305+351+338, 320, 361, 405, 501
Salzsäure	GHS05, GHS07	290, 314, 335	234, 360, 304+340, 303+361+353, 305+351+338, 309+311, 501
Kristallviolett	GHS05, GHS07, GHS08, GHS09	351, 302, 318, 410	273, 280, 305+351+338, 308+313
$\beta$ -Mercaptoethanol	GHS08	318, 410	304+340, 305+351+338, 309, 310
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352
Natriumhydroxid	GSH05	314, 290	280, 301+330+331, 309+310, 305+351+338
2-Propanol	GSH02, GSH07	225, 319, 336	210, 233, 305+351+338

---

Propidiumiodid	GSH07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Sodiumdodecylsulfat	GSH02, GSH06	228, 311, 302, 335, 315, 319	210, 280, 304+340, 305+351+338, 309+310
Temozolomid	GSH07, GSH08	302, 315, 319, 335, 350, 360	201, 261, 305+351+338, 308+313
Tris	GSH07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Triton X-100	GSH05, GSH07, GSH09	302, 318, 411	273, 280, 305+351+338

---

## Danksagung

Mein erster, herzlichster Dank geht an PD Dr. Malte Kriegs, der diese Arbeit betreut hat. Ich möchte mich bei Dir für die andauernde Unterstützung bedanken, für die lebhaften Diskussionen, für die Begeisterung für das Thema und ganz besonders für die Freiheiten, die ich in den letzten drei Jahren hatte. Du hast mir immer das Gefühl gegeben an mich und das Thema zu glauben, daher bin ich Dir unendlich dankbar.

Bei Prof. Dr. Ekkehard Dikomey möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, ein so spannendes Thema in seinem Labor bearbeiten zu dürfen. Ich danke Dir besonders für Deine Diskussionsbereitschaft, Deine ehrlichen und direkten Worte sowie für Deinen grenzenlosen Optimismus zu jeder Zeit.

Bei Prof. Dr. Dr. Christian Betzel möchte ich mich ganz herzlich für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Ein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Wolfram Brune und Prof. Dr. Harmut Schlüter, die sich bereit erklärt haben meine Disputation zu begutachten.

Dr. Jasna Seelbach möchte ich für ihre Freundschaft danken. Ich danke Dir für die immer offenen Ohren, die gemeinsamen Yoga-Sessions sowie die aufbauenden und ehrlichen Worte.

Konstantin Hoffer möchte ich für seine Freundschaft, die gemeinsamen Dattelabende sowie für seine Hilfe im Labor bedanken. Du hast es immer geschafft mich wieder aufzubauen und mich zum Lachen gebracht, auch wenn ich mal von Rückschlägen im Forschungsalltag gefrustet war und ich das Gefühl hatte auf der Stelle zu treten.

Bei Britta Riepen möchte ich mich ganz herzlich für die technische Unterstützung im Labor bedanken.

Bei Jasmin Burmester, Anna Lena Ahrens, Dr. Ann Parplys und PD Dr. Kerstin Borgmann möchte ich mich sowohl für die technische, als auch für die theoretische Unterstützung bei der Durchführung des *Fiber Assays* bedanken.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des Labors für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie, die für ein so gutes Arbeitsklima gesorgt haben. Ich bin immer sehr gerne zur Arbeit gekommen und daran habt ihr einen wesentlichen Anteil!



Bei Matthias Riedel möchte ich mich für den engagierten Einsatz während seiner Doktorarbeit bedanken. Die Zusammenarbeit mit Dir hat mir immer viel Spaß gemacht.

Bei Leonie Ott möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung während ihrer Bachelorarbeit bedanken.

Meinen Freunden danke ich für die Ablenkung zu jeder Zeit, den Spaß und für die andauernde Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Basti den Formatierungskünstler. Danke Basti für Deine Geduld und vor allem dafür, dass ich mich immer auf Dich verlassen kann.

Bei meiner Familie und vorallem bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders bedanken. Ihr Beide habt mich immer ermutigt meinen Weg zu gehen. Danke, dass ihr an mich glaubt, mich so tatkräftig unterstützt und mir immer das Gefühl gebt schon die richtige Entscheidung zu treffen.

Mein größter Dank geht an Michell! Du weißt am besten wie viel Du für mich getan hast. Ohne Deine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke, dass du immer für mich da bist, zu mir hältst und mich zu jeder Zeit auffängst. Danke auch dafür, dass Du mir immer wieder eine andere Sicht auf die Dinge zeigst und mir verdeutlichst, dass es auch noch andere wichtige Dinge im Leben neben der Wissenschaft gibt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation „Bedeutung der EGFRvIII-Expression für die Radio- und Chemosensitivität von humanen Glioblastomzellen“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Ich versichere, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem früheren Prüfungsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 22. Mai 2015

Nina Struve