

**Die Rolle einzelner Komponenten der
EGFR-vermittelten PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade
für die Strahlenresistenz von Tumorzellen
und damit assoziierte molekulare Targeting Strategien
zur Verbesserung der zellulären Strahlenempfindlichkeit**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Marina Holler, geb. Bechtel

aus Brackenheim

Tübingen

2015

Die vorliegende Arbeit wurde an der Eberhard Karls Universität Tübingen, Universitätsklinik für Radioonkologie, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, in der Zeit von Dezember 2010 bis November 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. H. Peter Rodemann angefertigt. Finanziell unterstützt wurde die Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (internationales Graduiertenkolleg 1302: „Der PI3K-Signalweg bei Tumorwachstum und Diabetes“).

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 24.09.2015

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Peter Rodemann

2. Berichterstatter: Prof. i. R. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Nikolaus Blin

ZUSAMMENFASSUNG

Immer mehr Menschen erkranken im Laufe ihres Lebens an Krebs, eine Krankheit, die immer noch mit Hoffnungslosigkeit und Unheilbarkeit in Verbindung gebracht wird. In der Tat stellen Krebserkrankungen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar – aber erfreulicherweise geht die Krebssterblichkeit in Deutschland seit Jahren zurück, was nicht zuletzt den enormen medizinischen Fortschritten zu verdanken ist. In der konventionellen Medizin ist neben der chirurgischen Entfernung und medikamentösen Behandlung die Strahlentherapie eine wesentliche Strategie zur Behandlung maligner Tumorerkrankungen. Besonders heikel ist bei dieser Therapieform die Tatsache, dass Tumore sehr heterogen sind und somit jeder Patient unterschiedlich auf ionisierende Strahlung anspricht. Ein fundamentales und bisher unüberwindbares Problem stellen dabei inhärente oder erworbene Resistenzen der Tumorzellen dar, die zu einer schlechten Prognose führen. In diesem Zusammenhang spielt die EGFR-vermittelte PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade eine entscheidende Rolle. Dieser Signalweg wird u. a. durch ionisierende Strahlung, wie sie etwa bei der Strahlentherapie zum Einsatz kommt, aktiviert und induziert infolgedessen zahlreiche Mechanismen, die den Tumorzellen zum Überleben verhelfen. So führt beispielsweise die Aktivierung der Signalwegskomponente Akt zur Aktivierung der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), welche maßgeblich an der Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) über die Nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) beteiligt ist. Mittlerweile gibt es neue und vielversprechende Ansätze, bei denen durch Kombination von Bestrahlung mit molekular zielgerichteten Substanzen gegen Komponenten der EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade das Behandlungsansprechen verbessert werden soll.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der EGFR-vermittelten PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade für die Strahlenresistenz von Tumorzellen beleuchtet. Anhand von molekularen Targeting Strategien wurde untersucht, inwieweit die Signalwegskomponenten PI3K, panAkt bzw. die Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 sowie mTOR das klonogene Überleben von bestrahlten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) und Mammakarzinomzellen beeinflussen und ob es möglich ist, diese Zellen durch Einsatz gezielter Signalwegshemmstoffe gegenüber Strahlung zu sensitivieren. Weiterhin war von Interesse, inwieweit die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB durch diese Signalwegskomponenten gelenkt wird. Zudem wurden mögliche Kombinationsstrategien, bestehend aus Bestrahlung und mehreren Signalwegsinhibitoren, beleuchtet, um den Endpunkt Überleben weiter zu optimieren. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

PI3K:

- Durch Hemmung der PI3K mittels LY294002 konnten Mamma- (MDA-MB-231) und Lungenkarzinomzelllinien (A549, SK-MES-1, HTB-182, H460, H661) gegenüber ionisierender Strahlung sensitiviert werden. Die strahlensensitivierende Wirkung des eingesetzten pharmakologischen Inhibitors war dabei durch eine reduzierte Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB bedingt.

Akt:

- Durch Hemmung des PI3K-Effektors Akt mittels des panAkt-Inhibitors MK2206 konnte die Strahlentoxizität in den Lungenkarzinomzelllinien A549 und H460 verstärkt werden. Dies ging mit einer verringerten Kapazität der Tumorzellen für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB einher.
- Durch eine exaktere Betrachtung der einzelnen Akt-Isoformen wurde sichtbar, dass Akt1, Akt2 und Akt3 in der Transduktion strahleninduzierter Signale und der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB unterschiedliche Rollen einnehmen. Mittels siRNA- und shRNA-Analysen in A549 bzw. MDA-MB-231 Zellen konnte nach Hemmung der Akt1- bzw. Akt3-Proteinexpression eine verschlechterte Kapazität dieser Zellen für die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden nachgewiesen werden, was eine Erhöhung der Radiotoxizität mit sich zog. Bei Hemmung der Akt2-Isoform zeigte sich diese Wirkung nicht.

mTOR:

- Durch Hemmung von mTOR mittels Rapamycin wurde in den Lungenkarzinomzelllinien A549, SK-MES-1, HTB-182, H460 und H661 eine zytostatische Wirkung erzielt.
- Rapamycin wirkte sich auf das klonogene Überleben von bestrahlten Tumorzellen unterschiedlich aus. Entsprechend des Ansprechens auf eine kombinierte Rapamycin-/Strahlentherapie gab es nicht-responsive (A549, SK-MES-1, HTB-182, MDA-MB-231) und responsive (H460, H661) Zellen. In letzteren war die strahlensensitivierende Wirkung zumindest teilweise durch eine reduzierte Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB erklärbar. Andere, hier nicht untersuchte Mechanismen, die das Überleben von Tumorzellen nach Strahlenexposition begünstigten, scheinen ebenso involviert zu sein.
- In nicht-responsiven Zellen induzierte die Behandlung mit Rapamycin die PI3K-abhängige Aktivierung der Proteinkinase Akt1. Wie gezeigt werden konnte, korrelierte diese Rapamycin-induzierte Akt1-Aktivierung mit einer fehlenden Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung.

- Durch Blockade der Rapamycin-induzierten Akt1-Aktivierung konnte der fehlende bzw. minimierte strahlensensitivierende Effekt in nicht-responsiven Zelllinien wiederhergestellt werden. Effektive Kombinationsstrategien, die in dieser Arbeit getestet wurden, waren dabei Bestrahlung + mTOR-Inhibition + PI3K-Inhibition, Bestrahlung + mTOR-Inhibition + panAkt-Inhibition und Bestrahlung + mTOR-Inhibition + Akt1-Inhibition.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass Kombinationsstrategien aus ionisierender Strahlung und molekularem Targeting eine geeignete Vorgehensweise *in vitro* darstellen, mit der die Überwindung inhärenter und erworbener Strahlenresistenzen ermöglicht wird. Diese präklinischen Daten erscheinen äußerst vielversprechend und rechtfertigen die Erprobung *in vivo* und in der Klinik.

SUMMARY

More and more people are diagnosed from cancer in the course of their lifetimes. Cancer is a disease that is still associated with hopelessness and incurability. It is the second most common cause of death, exceeded only by cardiovascular diseases. But fortunately, cancer mortality has declined in recent years, which is not least due to the enormous medical progress. In conventional medicine, together with surgical resection and cytostatic therapy, radiotherapy is an essential treatment modality for malignant tumors. A particularly sensitive aspect of this treatment modality is the heterogeneity of tumors and the associated very different responses of patients to ionizing radiation. Thereby, inherent and required resistance of tumor cells remains a yet unsolved major problem, resulting in a poor prognosis. In this context, the EGFR-induced PI3K/Akt/mTOR signaling pathway plays a crucial role. This pathway is activated for example by ionizing radiation, which is used in radiotherapy. Consequently, several survival mechanisms are invoked, which lead to resistance against radiation. For example, activation of the signaling pathway component Akt results in activation of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). DNA-PK is the major enzyme involved in repair of irradiation-induced DNA double-strand breaks (DNA-DSB) through non-homologous end joining (NHEJ). Meanwhile, new and promising approaches have been taken, which aim to improve treatment response by combining irradiation with targeted molecular drugs directed against components of the EGFR/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

In the present study, the role of EGFR-dependent PI3K/Akt/mTOR signaling in the context of radioresistance of tumor cells was investigated. It was analyzed by means of molecular targeting strategies to what extent PI3K, panAkt or the Akt isoforms Akt1, Akt2 and Akt3 as well as mTOR influence clonogenic survival of irradiated non-small cell lung cancer (NSCLC) and breast cancer cells and whether it is possible to radiosensitize these cells by using specific inhibitors against the above-mentioned pathway components. Moreover, it was of interest to what extent these signaling pathway components influence repair of radiation-induced DNA-DSB. To further improve the end point survival, the combination of irradiation with multiple inhibitors of the EGFR-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway was illuminated. The following major results were obtained:

PI3K:

- Breast cancer (MDA-MB-231) and NSCLC cells (A549, SK-MES-1, HTB-182, H460, H661) could be radiosensitized by the PI3K inhibitor LY294002. Thereby, the radiosensitizing effect of LY294002 resulted from reduced repair of radiation-induced DNA-DSB.

Akt:

- Inhibition of Akt by the panAkt inhibitor MK2206 enhanced the cytotoxic effects of radiotherapy in the NSCLC cell lines A549 and H460. This was due to suppression of the ability of tumor cells to repair radiation-induced DNA-DSB.
- A more detailed analysis of the specific Akt isoforms illuminated the different roles of Akt1, Akt2 and Akt3 in transduction of radiation-induced signals and repair of radiation-induced DNA-DSB. As shown by siRNA- and shRNA analyses in A549 and MDA-MB-231 cells, inhibition of Akt1 or Akt3 protein expression suppressed the ability of tumor cells to repair radiation-induced DNA damage, which then resulted in radiosensitization. Inhibition of Akt2 did not exert any effect.

mTOR:

- Inhibition of mTOR by Rapamycin resulted in a cytostatic effect in all the NSCLC cell lines tested (A549, SK-MES-1, HTB-182, H460, H661).
- Rapamycin differentially affected clonogenic survival of irradiated tumor cells. According to the response to radiotherapy, non-responsive (A549, SK-MES-1, HTB-182, MDA-MB-231) and responsive (H460, H661) cells were defined. In the latter, radiosensitization was, at least partially, a result of a poor repair procedure of DNA-DSB induced by ionizing radiation. However, besides the mechanism under examination, other mechanisms leading to improved post-irradiation survival should be involved as well.
- In non-responsive cells, Rapamycin mediated PI3K-dependent activation of Akt1. Thereby, Rapamycin-induced Akt1 activation correlated with the lack of Rapamycin-induced radiosensitization.
- Inhibition of Rapamycin-induced Akt1 activation restored/improved Rapamycin-induced radiosensitization in non-responsive cell lines. Herein, the following effective combination strategies were tested: irradiation + mTOR inhibition + PI3K inhibition, irradiation + mTOR inhibition + panAkt inhibition and irradiation + mTOR inhibition + Akt1 inhibition.

Thus, based on the described major findings in this study, it is proposed that combination of irradiation with molecular targeting strategies directed against the EGFR-dependent PI3K/Akt/mTOR pathway might be an effective *in vitro* approach towards overcoming inherent and required radiotherapy resistance. These preclinical data seem extremely promising and warrant *in vivo* as well as clinical evaluation.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	III
SUMMARY	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Krebs: Inzidenz, Prognose, Therapiestrategien.....	1
1.2 Strahlenbiologie	2
1.2.1 Physikalische Grundlagen der Strahlenbiologie.....	2
1.2.2 Molekulare und zelluläre Grundlagen der Strahlenbiologie	2
1.2.2.1 Reparatur von DNA-DSB.....	3
1.2.2.2 Klonogener Zelltod.....	4
1.2.2.3 Einflussfaktoren für das zelluläre Überleben nach Bestrahlung	4
1.3 Die EGFR-vermittelte PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade und mit ihr verbundene molekulare Targeting Strategien	6
1.3.1 EGFR.....	6
1.3.2 PI3K.....	8
1.3.3 Akt.....	9
1.3.4 mTOR.....	10
1.3.5 Die Rolle des EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in der DNA-DSB-Reparatur	14
1.4 Zielsetzung.....	17
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.3 Software.....	21
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.5 Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen	22
2.1.6 Kits	23
2.1.7 siRNAs	24
2.1.8 Inhibitoren	24
2.1.8.1 Proteaseinhibitor.....	24
2.1.8.2 Phosphataseinhibitoren.....	24
2.1.8.3 Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs	24
2.1.9 Antikörper	24
2.1.9.1 Primäre Antikörper.....	24

2.1.9.2	Sekundäre Antikörper.....	25
2.1.10	Zelllinien und Zellkulturmedien	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Zellkultur.....	26
2.2.2	Behandlung der Zellen mit Inhibitoren.....	26
2.2.3	Transfektion mit spezifischen siRNAs.....	26
2.2.4	Bestrahlung der Zellen.....	27
2.2.5	Proliferationsassay.....	27
2.2.6	Koloniebildungstest.....	28
2.2.7	γ -H2AX Focus Assay.....	29
2.2.8	Western Blot.....	30
2.2.8.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	30
2.2.8.2	Proteinbestimmung.....	30
2.2.8.3	SDS-PAGE.....	31
2.2.8.4	Transfer der Proteine auf eine Membran.....	31
2.2.8.5	Ponceau S-Färbung.....	32
2.2.8.6	Blocken.....	32
2.2.8.7	Immundetektion.....	32
2.2.8.8	Strippen von Western Blot Membranen.....	32
2.2.8.9	Densitometrische Auswertung.....	33
2.2.9	Statistik.....	33
3	ERGEBNISSE.....	34
3.1	Strahlenbiologische Charakterisierung der verwendeten Tumorzellen.....	34
3.1.1	Intrinsische Strahlensensitivität und Koloniebildungseffizienz der Tumorzellen	34
3.2	Molekulares Targeting einzelner Komponenten des PI3K/Akt-Signalwegs moduliert die Strahlenempfindlichkeit der Tumorzellen	35
3.2.1	Die Rolle der PI3K für die Strahlenantwort der Tumorzellen und die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden	36
3.2.1.1	Einfluss einer PI3K-Hemmung durch LY294002 auf das klonogene Überleben	36
3.2.1.2	Einfluss einer PI3K-Hemmung durch LY294002 auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB	38
3.2.2	Die Rolle von Akt für die Strahlenantwort der Tumorzellen und die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden	40
3.2.2.1	Einfluss einer Akt-Hemmung durch MK2206 auf das klonogene Überleben	40
3.2.2.2	Einfluss einer Akt-Hemmung durch MK2206 auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB	41
3.2.2.3	Einfluss einer Akt1-Herunterregulation auf das klonogene Überleben	44
3.2.2.3.1	Akt1-Herunterregulation durch siRNA	44
3.2.2.3.2	Akt1-Herunterregulation durch shRNA	45
3.2.2.4	Einfluss einer Akt1-Herunterregulation auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB.....	46
3.2.2.4.1	Akt1-Herunterregulation durch siRNA	46
3.2.2.4.2	Akt1-Herunterregulation durch shRNA	47
3.2.2.5	Einfluss einer Akt3-Herunterregulation durch siRNA auf das klonogene Überleben	48

3.2.2.6	Einfluss einer Akt3-Herunterregulation durch siRNA auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB	50
3.2.2.7	Einfluss einer Akt2-Herunterregulation durch siRNA auf das klonogene Überleben	51
3.2.2.8	Einfluss einer Akt2-Herunterregulation durch siRNA auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB	53
3.2.2.9	Einfluss einer kombinatorischen Akt-Isoformen-Herunterregulation durch siRNA auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB.....	55
3.2.3	GSK3 α/β und PRAS40 als Substrate spezifischer Akt-Isoformen	56
3.3	Molekulares Targeting von mTOR mittels Rapamycin in Tumorzellen.....	58
3.3.1	Einfluss einer mTOR-Hemmung durch Rapamycin auf die Proliferation	58
3.3.2	Einfluss einer mTOR-Hemmung durch Rapamycin auf das klonogene Überleben	60
3.3.3	Einfluss einer mTOR-Hemmung durch Rapamycin auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB	62
3.3.4	Einfluss einer mTOR-Hemmung durch Rapamycin auf den Akt1-Phosphorylierungs- und Aktivitätsstatus	64
3.4	Kombinationsstrategien zur Wiederherstellung der fehlenden Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung in Tumorzellen	68
3.4.1	Kombination von Rapamycin mit dem PI3K-Inhibitor LY294002	68
3.4.1.1	Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/LY294002-Behandlung auf das klonogene Überleben	70
3.4.1.2	Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/LY294002-Behandlung auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB	72
3.4.2	Kombination von Rapamycin mit dem Akt-Inhibitor MK2206.....	75
3.4.2.1	Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/MK2206-Behandlung auf das klonogene Überleben	76
3.4.2.2	Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/MK2206-Behandlung auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB	77
3.4.3	Kombination von Rapamycin mit einem AKT1-Knockdown	78
3.4.3.1	Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/AKT1-Knockdown-Behandlung auf das klonogene Überleben	79
3.4.3.1.1	Akt1-Herunterregulation durch siRNA	79
3.4.3.1.2	Akt1-Herunterregulation durch shRNA	81
3.4.3.2	Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/AKT1-Knockdown-Behandlung auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB	82
3.4.3.2.1	Akt1-Herunterregulation durch siRNA	82
3.4.3.2.2	Akt1-Herunterregulation durch shRNA	83
4	DISKUSSION.....	85
4.1	Molekulares Targeting von PI3K/Akt	85
4.1.1	Die durch PI3K-Targeting bedingte Strahlensensitivierung ist durch die Hemmung der DNA-DSB-Reparatur bedingt.....	86
4.1.2	Hemmung von panAkt, Akt1, Akt2 und Akt3 führt zu isoformspezifischen Unterschieden bezüglich des zellulären Überlebens nach Bestrahlung und scheint mit der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB zu korrelieren.....	88

4.2	Molekulares Targeting von mTOR	91
4.2.1	Rapamycin in Form einer Monotherapie.....	91
4.2.2	Rapamycin in Form einer Kombinationstherapie mit Bestrahlung.....	93
4.2.3	Co-Targeting Strategien zur Wiederherstellung der fehlenden/minimierten Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung in nicht-responsiven Tumorzellen	97
4.3	Schlussbetrachtung	100
5	LITERATURVERZEICHNIS	102
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	114
7	CURRICULUM VITAE	117
8	DANKSAGUNG	119

1 EINLEITUNG

1.1 Krebs: Inzidenz, Prognose, Therapiestrategien

Mittlerweile werden in ganz Deutschland flächendeckend alle neuauftretenden Krebserkrankungen systematisch erfasst. Laut des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut in Berlin, das die Daten der epidemiologischen Landeskrebsregister auf Bundesebene zusammenführt, wurden im Jahre 2010 in Deutschland rund 500.000 Krebsneuerkrankungen diagnostiziert. Die Tendenz ist aufgrund des demografischen Wandels steigend. Demnach müssen mittlerweile 51 % aller Männer und 43 % aller Frauen damit rechnen, im Laufe ihres Lebens an einem Tumor zu erkranken. Die relative Sterberate liegt in Deutschland bei knapp 50 %. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten der Krebspatienten sind sehr stark von der Tumorentität abhängig. Sie reichen von sehr günstigen Raten über 90 % für das maligne Melanom der Haut, den Hodenkrebs und das Prostatakarzinom bis hin zu Überlebensraten unter 20 % bzw. 10 % bei Lungenkrebs bzw. Bauchspeicheldrüsenkrebs (ZfKD). Dank enormer medizinischer Fortschritte hat sich die Prognose für Krebspatienten in Deutschland in den letzten 40 Jahren deutlich verbessert, was nicht zuletzt auf stetig verbesserte Behandlungsmethoden zurückzuführen ist. In der konventionellen Medizin ist die Bestrahlung, ebenso wie die chirurgische Entfernung des Tumors und die Behandlung mit Medikamenten (Chemotherapie, Hormontherapie), schon seit über 100 Jahren eine wesentliche Therapiestrategie zur Behandlung maligner Tumorerkrankungen (Deutsches Krebsforschungszentrum). Die klassische Strahlentherapie erfolgt perkutan mit hochenergetischer ionisierender Strahlung (Röntgen-, γ -Strahlung), die in so genannten Linearbeschleunigern erzeugt wird. Dabei ist es möglich, mit alleiniger Strahlentherapie (Monotherapie) Tumore im Frühstadium zu heilen (kurative Strahlentherapie). Eine komplikationslose Tumorheilung ist jedoch nur dann möglich, wenn die Toleranzdosis des Normalgewebes, das den Tumor umgibt und daher mitbestrahlt wird, höher ist als die zur lokalen Tumorkontrolle notwendige Strahlendosis (Holthusen, 1936) oder aber das Volumen des mitbestrahlten Normalgewebes so gering ist, dass auch die vollständige Zerstörung nicht zu schwerwiegenden funktionellen Beeinträchtigungen des Gesamtorgans führt (Schutze *et al.*, 2010). Wenn die Krankheit schon zu weit fortgeschritten und eine Heilung nicht mehr möglich ist, so kann zumindest die Lebensqualität des Tumorpatienten verbessert oder erhalten werden (palliative Strahlentherapie). Grundsätzlich wird bei der Krebsbehandlung eine Kombination mehrerer Behandlungsformen angestrebt. So kann die lokal wirkende Strahlentherapie präoperativ-neoadjuvant (vor der Operation) bzw. postoperativ-adjuvant (nach der Operation) erfolgen oder auch zusammen mit einer systemischen Behandlungsmethode wie der Chemotherapie (Tannock, 1996; Herrmann *et al.*, 2006; Beckmann, 2012). Es gibt mittlerweile auch vielversprechende Ansätze zur Verbesserung der

Behandlungschancen durch Kombination von Strahlentherapie mit molekular zielgerichteten Substanzen (Schutze *et al.*, 2010). Kaum ein anderer medizinischer Bereich hat sich in den letzten Jahren so schnell weiterentwickelt wie die Strahlenbiologie (Streffler *et al.*, 2012).

1.2 Strahlenbiologie

Die Strahlenbiologie ist eine interdisziplinäre Wissenschaft, die die Wirkungen ionisierender Strahlung auf biologische Objekte untersucht und dabei physikalische, chemische und biologische Phasen unterschiedlicher zeitlicher Ausdehnung durchläuft (Boag, 1975; Joiner *et al.*, 2009). Am Anfang der strahlenbiologischen Wirkungskette steht die Auslösung physikalischer Primärereignisse (Ionisationsprozess), denen chemische und biochemische Prozesse (Radikalbildung) folgen und schließlich zu molekularen (DNA, Proteine) und zellulären Veränderungen führen können. Die Strahlenbiologie stellt zudem die Grundlagen für die medizinische Strahlentherapie (Herrmann *et al.*, 2006).

1.2.1 Physikalische Grundlagen der Strahlenbiologie

Ionisierende Strahlung, die bei der Radiotherapie zum Einsatz kommt, besitzt genügend Energie, um Atome und Moleküle zu ionisieren. Wenn ionisierende Strahlung Materie durchdringt, wird diese zum Teil von der durchstrahlten Materie absorbiert. Um die Wirkung ionisierender Strahlung auf ein biologisches System beschreiben zu können, wird ein Maß für die absorbierte Energiemenge benötigt. Ein solches Maß ist die Energiedosis, die durch folgende Formel beschrieben wird (Harms, 1998):

$$\text{Energiedosis} = \frac{\text{absorbierte Energie [J]}}{\text{durchstrahlte Materie [kg]}} = [\text{Gy}]$$

Die Energiedosis drückt die Energie aus, die ein Stoff pro angegebener Masseinheit aufnimmt. Dabei wird die absorbierte Energie in Joule (J) angegeben und die Masse in der Einheit Kilogramm (kg) gemessen. Der Quotient aus den Einheiten J und kg erhält den Namen Gray (Gy). Strahlung, die die biologische Materie ohne Energieübertrag wieder verlässt, trägt nicht zur Energiedosis bei und ruft im Organismus keine Wirkung hervor.

1.2.2 Molekulare und zelluläre Grundlagen der Strahlenbiologie

Ionisierende Strahlen können auf molekularer Ebene Veränderungen hervorrufen und dadurch Zellstrukturen und -funktionen schädigen – eine Wirkung, die bei der Strahlentherapie zur Krebsbekämpfung erwünscht ist. Die meisten biologischen Effekte, die durch ionisierende Strahlung verursacht werden, werden indirekt erzielt. Lebende Materie enthält nämlich bis zu 80 % Wasser, so dass in erster Linie durch Radiolyse des Wassers chemisch sehr reaktive Radikale entstehen, die über Radikalkettenreaktionen letztendlich zu einer sekundären Schädigung biologisch kritischer Zielmoleküle führen. Im Gegensatz dazu erfolgen bei der

direkten Strahlenwirkung Energieabsorption, nachfolgende Reaktionen und resultierende Schäden im biologisch kritischen Zielmolekül selbst (Friedberg *et al.*, 2006).

Die Strahlenempfindlichkeit einzelner Zellbestandteile ist sehr unterschiedlich. Auch wenn Makromoleküle wie Proteine oder Lipidbestandteile von Membranstrukturen der Strahlenwirkung unterworfen sind, so gilt nach heutigem Kenntnisstand die Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) als biologisch relevantestes intrazelluläres Target (Joiner *et al.*, 2009). Eine Energiedosis von 1 Gy induziert in einer menschlichen Zelle etwa 4.000 bis 5.000 DNA-Schäden, darunter finden sich DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB), Basenschäden (Modifikation, Verlust), Crosslinks (zwischen den beiden DNA-Strängen oder zwischen einem DNA-Strang und einem Protein), Bruch von Wasserstoffbrückenbindungen oder auch Bulky Lesions, d. h. mehrere dicht nebeneinander liegende, verschiedene Arten von Schäden (Reiser *et al.*, 2011). Es gibt zwei Strategien, mit denen eine geschädigte Zelle auf strahleninduzierte DNA-Schäden reagieren kann. Kommt es zum Zeitpunkt der Schädigung zum Zellzyklusarrest, wird der Zelle die benötigte Zeit gewährt, um strahleninduzierte DNA-Schäden zu reparieren (Khanna *et al.*, 2001; Sancar *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2007; Weterings *et al.*, 2008; Joiner *et al.*, 2009). Der überwiegende Teil der strahleninduzierten Schäden kann tatsächlich innerhalb weniger Minuten bis Stunden unter Beteiligung verschiedener Reparaturprozesse repariert werden (Ataian *et al.*, 2006). Ist die geschädigte Zelle dazu nicht oder nicht ausreichend in der Lage, gibt die Zelle ihre Funktion auf und stirbt (Khanna *et al.*, 2001; Joiner *et al.*, 2009). Nicht-reparierte oder falsch reparierte DNA-DSB und der damit verbundene Zelltod werden nach heutigem Kenntnisstand als wichtigster Mechanismus für die biologische Wirkung einer Bestrahlung angesehen.

1.2.2.1 Reparatur von DNA-DSB

In eukaryotischen Zellen werden strahleninduzierte DNA-DSB fast ausschließlich über die Nicht-homologe Endverknüpfung (*non homologous end-joining*, NHEJ) repariert (Iliakis *et al.*, 2004; Lohrich *et al.*, 2005). Dieser Reparaturmechanismus basiert auf der direkten Verknüpfung freier DNA-Enden und läuft unabhängig vom Vorhandensein homologer DNA-Sequenzen, die als Matrize für den Reparaturvorgang dienen könnten, ab (Weterings *et al.*, 2007). Daher ist die NHEJ-Reparatur in allen Phasen des Zellzyklus möglich (Rothkamm *et al.*, 2003); sie findet jedoch vorzugsweise in der G₁-Phase statt. Unmittelbar nach der Induktion der DNA-DSB bindet das Ku70/Ku80-Heterodimer an die freien DNA-Bruchenden (Weterings *et al.*, 2007; Weterings *et al.*, 2008; Mahaney *et al.*, 2009) und rekrutiert die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs), welche über ihre N-terminale Domäne an den C-Terminus der Ku80-Untereinheit bindet (Weterings *et al.*, 2008; Mahaney *et al.*, 2009). Durch diese DNA/Ku/DNA-PKcs-Komplexbildung, für die eine direkte Interaktion zwischen DNA-PKcs und dem C-terminalen Teil von Akt notwendig ist (Toulany *et al.*, 2012), werden die beiden DNA-Bruchenden in räumliche Nähe gebracht (Weterings *et al.*,

2008) und die DNA-PKcs-Kinase-Aktivität aktiviert. Für eine erfolgreiche Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB sind spezifische DNA-PKcs-Trans- und Autophosphorylierungen, die zumindest teilweise Akt-abhängig sind, von großer Bedeutung (Ding *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007a; Povirk *et al.*, 2007; Toulany *et al.*, 2008). Schließlich stimuliert die aktivierte DNA-PKcs neben anderen DNA-Reparaturfaktoren (Nukleasen, Polymerasen), die für die Prozessierung der DNA-Enden zuständig sind (Weterings *et al.*, 2007), das Protein XRCC4, welches daraufhin einen Komplex mit der DNA-Ligase IV bildet (Leber *et al.*, 1998). Infolge der Akt-stimulierten Autophosphorylierung dissoziiert die DNA-PKcs von der DNA-Bruchstelle, so dass abschließend die Ligation der DNA-Enden durch den DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex ermöglicht wird (Ding *et al.*, 2003; Block *et al.*, 2004; Mahaney *et al.*, 2009; Toulany *et al.*, 2012).

1.2.2.2 Klonogener Zelltod

Repariert die Zelle den strahleninduzierten DNA-Schaden nicht oder nur fehlerhaft, kommt es zum Zelltod. Man unterscheidet verschiedene Formen des Zelltodes: Nekrose, Autophagie, Seneszenz, Apoptose und klonogener Zelltod (Mitosetod, mitotische Katastrophe), wobei letzterer für die Strahlenbiologie von großer Bedeutung ist. In der Regel sterben nur wenige Zellen unmittelbar oder innerhalb weniger Stunden nach Bestrahlung (Endlich *et al.*, 2000). Vielmehr durchlaufen die meisten Zellen noch eine oder mehrere Mitose(n) bis sie schließlich ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit verlieren und den klonogenen Zelltod sterben (Forrester *et al.*, 1999). In der Zellkultur zeigt sich der klonogene Zelltod als Verlust der Fähigkeit zur Koloniebildung (**Kapitel 2.2.6**). Der klonogene Zelltod ist nicht initial das Resultat strahleninduzierter DNA-Schäden, sondern vielmehr Folge einer gescheiterten Mitose. Dabei fungiert die mitotische Katastrophe nicht nur als Zelltod-Mechanismus, sondern vermag auch andere Zelltod-Signalwege (Apoptose, Nekrose, Seneszenz, Autophagie) unabhängig vom initialen strahleninduzierten DNA-Schaden auszulösen (Joiner *et al.*, 2009).

1.2.2.3 Einflussfaktoren für das zelluläre Überleben nach Bestrahlung

Das Hauptziel der Radiotherapie bei malignen Tumorerkrankungen ist die maximale lokale Tumorkontrolle bei maximaler Schonung des gesunden Gewebes. Um dieses Ziel zu erreichen, erfolgt die Bestrahlung in der Klinik nicht mit einer einzelnen Bestrahlung (Einzeitbestrahlung), sondern fraktioniert. Bei der konventionellen Fraktionierung wird die notwendige Gesamtdosis, die abhängig ist von der Tumorentität, der Tumorgröße und der Lokalisation, auf mehrere Einzeldosen (Fraktionen) von 5 x 1,8 bis 2,0 Gy/Woche aufgeteilt (Herrmann *et al.*, 2006). Der Erfolg der Fraktionierung basiert auf biologischen Faktoren, die das Überleben von Tumor- und Normalgewebe nach Bestrahlung beeinflussen. Bereits 1975 wurden diese Einflussfaktoren von Withers als die „4 R's der Strahlenbiologie“

zusammengefasst (Withers, 1975). 1989 ergänzte Steel diese Liste mit einem fünften „R“ (Steel *et al.*, 1989):

Reparatur

Tumorzellen weisen im Vergleich zu gesunden Normalzellen eine schlechtere Reparaturkapazität strahleninduzierter DNA-Schäden auf. Während Normalzellen sublethale Strahlenschäden in den Bestrahlungspausen zwischen den Fraktionen effizient reparieren können, fehlt Tumorzellen diese Fähigkeit (Beyzadeoglu *et al.*, 2010; Pajonk *et al.*, 2010; Reiser *et al.*, 2011; Mitchell, 2013).

Repopulation

In den Bestrahlungspausen treten Zellen, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, wieder in den aktiven Zellzyklus ein, um so den strahleninduzierten Zellverlust zu kompensieren. Dieser Sachverhalt ist für Normalzellen äußerst positiv und gewährt ihnen eine erhöhte Strahlentoleranz. Die Repopulation hat aber auch eine erhöhte Proliferationsrate von Tumorzellen und eine damit verbundene Zunahme des Tumolvolumens zur Folge. Daher sollte eine Strahlentherapie, einmal begonnen, zügig zu Ende gebracht werden (Beyzadeoglu *et al.*, 2010; Pajonk *et al.*, 2010; Reiser *et al.*, 2011; Mitchell, 2013).

Redistribution

Wenn Zellen bestrahlt werden, befinden sie sich in der Regel in unterschiedlichen Zellzyklusphasen. Es ist bekannt, dass Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten aufweisen. Generell sind Zellen in der M-Phase am strahlensensibelsten, gefolgt von Zellen in der G₁- und frühen S-Phase. In der späten S-Phase sind Zellen sehr strahlenresistent, am G₂/M-Übergang werden die Zellen wieder empfindlich (Sinclair *et al.*, 1969). Bei der fraktionierten Strahlentherapie werden zunächst die strahlensensiblen Zellen abgetötet. Klonogene Zellen, die sich nach Bestrahlung in strahlenresistenten Zellzyklusphasen befinden, können in den Bestrahlungspausen in strahlensensible Zyklusphasen übergehen und sprechen dann gut auf eine erneute Bestrahlung an (Beyzadeoglu *et al.*, 2010; Pajonk *et al.*, 2010; Reiser *et al.*, 2011; Mitchell, 2013).

Reoxygenierung

Generell ist die Wirkung ionisierender Strahlung in Anwesenheit von Sauerstoff (Normoxie) größer als bei Sauerstoffmangel (Hypoxie, Anoxie). Demnach sind oxygenierte Zellen zwei- bis dreimal strahlenempfindlicher als Zellen mit Sauerstoffmangel. Da gerade solide Tumore in ihrem Zentrum meist unzureichend mit Sauerstoff versorgt sind, ist der Erfolg der Strahlentherapie oft gefährdet. Überleben nämlich einige dieser hypoxischen/anoxischen Zellen wegen ihrer verminderten Strahlensensibilität, können sie Ausgangspunkt eines Tumorrezidivs werden. Diesen Sachverhalt versucht man mit fraktionierter Bestrahlung zu umgehen. Nach jeder Fraktion nimmt die Zahl hypoxischer/anoxischer Tumorzellen im Zentrum ab, da der Tumor durch Zelluntergang kleiner wird und der Diffusionsweg des

Sauerstoffs zu den Tumorzellen im Tumorrinneren abnimmt (Beyzadeoglu *et al.*, 2010; Pajonk *et al.*, 2010; Reiser *et al.*, 2011; Mitchell, 2013).

Radiosensitivität

Das fünfte „R der Strahlenbiologie“ ist die intrinsische, d. h. die genetisch determinierte Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Strahlung. Diese ist maßgeblich für den Erfolg der Strahlentherapie verantwortlich. Wünschenswert wären prädiktive Tests, die es ermöglichen, die Strahlenwirkung bei unterschiedlichen Tumorentitäten vorauszusagen (Beyzadeoglu *et al.*, 2010; Hirst *et al.*, 2010; Reiser *et al.*, 2011).

Neben den „5 R's der Strahlenbiologie“ hat auch die intrazelluläre Signaltransduktion einen erheblichen Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit. Ein Beispiel für den Einfluss der Signaltransduktion auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen ist der EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg. Da durch gezieltes, molekulares Targeting bestimmter Komponenten die Empfindlichkeit von Tumoren modifiziert werden kann, stellt der EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ein attraktives Ziel in der onkologischen Therapie dar (Baumann *et al.*, 2007; Zips *et al.*, 2008).

1.3 Die EGFR-vermittelte PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade und mit ihr verbundene molekulare Targeting Strategien

Inhärente oder erworbene Resistenzen der Tumorzellen stellen trotz großer Fortschritte in der Krebstherapie ein noch nicht überwundenes Problem dar. Von großer Bedeutung für derartige Resistenzen und die damit einhergehenden schlechten Prognosen, aber auch für die Tumorentstehung, Progression und Therapierbarkeit, ist die Dysregulation der EGFR-vermittelten PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade. Die Dysregulation dieser Signalkaskade ist äußerst kritisch, da sie in Tumorzellen zahlreiche Zellüberlebensmechanismen induziert. Infolge dieser Mechanismen kommt es u. a. zu unkontrolliertem Zellwachstum, zu einer Stimulation der Zellproliferation, der Proteinsynthese und der Angiogenese, zur Zellzyklusprogression, zu einem verstärkten Metabolismus, zur Förderung der Zellmigration, zu einer gesteigerten DNA-Schadensreparatur und zur Hemmung der Apoptose (Manning *et al.*, 2007; Toulany *et al.*, 2010). Mittlerweile gibt es neue und vielversprechende Konzepte, bei denen durch molekulare Targeting Strategien versucht wird, derartige Signalwegsveränderungen als spezifische Therapieziele zu nutzen und so das klinische Ergebnis zu verbessern. Auf einzelne Komponenten der EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade sowie Möglichkeiten, diese gezielt zu hemmen, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.3.1 EGFR

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR, auch

ErbB1/HER1) ist ein 170 kDa großes transmembranes Glykoprotein und gehört zusammen mit ErbB2 (HER2/c-neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) zur Familie der ErbB-Rezeptoren, eine Subfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Der EGFR besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer transmembranen Region und einer intrazellulären, zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne (Schlessinger, 2000; Herbst, 2004). Die Aktivierung EGFR-vermittelter Signalkaskaden beginnt mit der Bindung spezifischer Liganden (z. B. EGF, TGF α , Amphiregulin, Epiregulin) an die extrazelluläre Domäne. Daraufhin kommt es zu einer Homodimerisierung des Rezeptors oder zu einer Heterodimerisierung mit einem anderen Rezeptor der ErbB-Rezeptorfamilie. Die Dimerisierung wiederum führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors und damit zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Durch Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste werden Bindungsstellen für unterschiedliche Adapter- und Effektorproteine geschaffen, welche dann eine Kaskade von Signalen einleiten und bestimmte Zellüberlebensmechanismen auslösen (Barnes *et al.*, 2003; Herbst, 2004). Zu diesen Signalkaskaden zählen der *Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT)*-Signalweg, der *Rat sarcoma (Ras)-Mitogen-activated protein kinase (MAPK)*-Signalweg, der *Phospholipase c gamma (PLC γ)*-Signalweg und der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, wobei letzterer von besonderem Interesse ist (Nyati *et al.*, 2006; Toulany *et al.*, 2010).

In Tumorzellen kann neben der Aktivierung durch spezifische natürliche Liganden auch ionisierende Strahlung im therapeutischen Dosisbereich eine EGFR-Aktivierung mit nachfolgender Signalweiterleitung hervorrufen (Dent *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung die Autophosphorylierung des Rezeptors induziert und über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs eine Strahlenresistenz von Tumorzellen begünstigt (Toulany, 2013). Zudem besitzt der EGFR in vielen Tumorentitäten aufgrund von Mutationen oder Überexpression eine unphysiologisch hohe Aktivität (Moscatello *et al.*, 1995; Salomon *et al.*, 1995; Fontanini *et al.*, 1998; Rubin Grandis *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1999; Frederick *et al.*, 2000; Luwor *et al.*, 2004). Dabei ist eine Überexpression häufig mit einer Chemo-/Radioresistenz assoziiert, die letztendlich zu einer schlechten Prognose führt (Barker *et al.*, 2001; Ang *et al.*, 2002; Kasten-Pisula *et al.*, 2011).

Mittlerweile gibt es therapeutisch einsetzbare und bereits zugelassene Medikamente, mit denen es möglich ist, die Funktion des EGFR zu hemmen. Monoklonale Antikörper, zu denen u. a. Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®) gehören, verhindern durch Bindung an die extrazelluläre Domäne des EGFR die Bindung des endogenen Liganden und können somit lediglich die ligandenabhängige Signaltransduktion unterbinden (de Bono *et al.*, 2002; Nyati *et al.*, 2006). Eine sowohl ligandenabhängige als auch ligandenunabhängige Hemmung EGFR-vermittelter Signalkaskaden wird durch den Einsatz so genannter Tyrosinkinaseinhibitoren (Gefitinib (Iressa®), Erlotinib (Tarceva®)) ermöglicht. Diese blockieren die ATP-Bindestellen der intrazellulären Tyrosinkinasen des EGFR kompetitiv

und unterbinden die Autophosphorylierung (de Bono *et al.*, 2002; Nyati *et al.*, 2006).

1.3.2 PI3K

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) sind Mitglieder einer Familie intrazellulärer Lipidkinasen. Diese Superfamilie besteht aus den funktionellen Klassen IA, IB, II und III (Paez *et al.*, 2003), wobei im Zusammenhang mit dieser Arbeit die PI3K der Untergruppe IA relevant sind. Zur Vereinfachung werden die Isoenzyme dieser Untergruppe unter der Bezeichnung PI3K zusammengefasst. PI3K bestehen aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Untereinheit. Die regulatorische Untereinheit ist aus einer *Src-homology 3* (SH3)-Domäne, zwei prolinreichen Sequenzen, die durch die BCR-Domäne getrennt werden, und zwei *Src-homology 2* (SH2)-Domänen, die durch die *inter-Src homology 2* (iSH2)-Domäne separiert werden, aufgebaut. In nicht-proliferierenden Zellen wird über die iSH2-Domäne der Kontakt zur katalytischen Untereinheit hergestellt und diese inaktiviert. Sofern der EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg durch Wachstumsfaktoren oder Bestrahlung aktiviert wird, interagiert die regulatorische Untereinheit über die beiden SH2-Domänen mit Phosphotyrosinresten vorgeschalteter Rezeptortyrosinkinasen oder Adaptermolekülen. Diese Interaktion induziert in der katalytischen Untereinheit eine Konformationsänderung, wodurch die Bindung zwischen regulatorischer p85- und katalytischer p110-Untereinheit getrennt wird. Die freie p110-Untereinheit ist nun aktiv und transloziert an die Innenseite der Zellmembran, wo ihre Substrate, darunter das Membranlipid Phosphatidylinositol(4,5)biphosphat (PIP₂), lokalisiert sind. Nun katalysiert die aktivierte p110-Untereinheit die Phosphorylierung von PIP₂ zu Phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphat (PIP₃). PIP₃ wiederum bindet Proteine mit einer *Pleckstrin homology* (PH)-Domäne, die aufgrund dieser Bindung an die Innenseite der Zellmembran transloziert werden (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Krasilnikov, 2000; Paez *et al.*, 2003; Wagener *et al.*, 2010). Zu den Proteinen, die eine PH-Domäne besitzen, zählen beispielsweise Akt und *Phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1), deren Funktion in der EGFR-vermittelten Signalkaskade im nächsten Abschnitt (**Kapitel 1.3.3**) erläutert wird.

Aufgrund ihrer Rolle in der Regulation zellulärer Überlebensmechanismen sind PI3K der Untergruppe IA auch an der Tumorentstehung und -progression beteiligt. Dabei steht die katalytische Untereinheit p110 α im Vordergrund. Die Wildtypform der p110 α , die durch das PIK3CA-Gen codiert wird, wirkt an sich nicht transformierend. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Amplifikationen in diesem Gen, Deletionen und somatische Missense-Mutationen in humanen Tumoren der Brust, Lunge, Leber, des Darms und Gehirns nicht selten sind. Tatsächlich gehört das PIK3CA-Gen zu denjenigen Genen, die in Tumoren des Menschen am häufigsten mutiert sind. PIK3CA-Mutationen führen u. a. zu einer erhöhten Kinaseaktivität, zu einer Überexpression oder zu einer dauerhaften Verankerung der p110 α -Untereinheit in der Zellmembran und bedingen dadurch zelluläre Veränderungen (Samuels *et*

al., 2004; Karakas *et al.*, 2006; Samuels *et al.*, 2006; Engelman, 2009; Wagener *et al.*, 2010).

In vielen Studien wird derzeit nach PI3K-Inhibitoren gesucht, von denen man sich eine starke Wirkung auf das Tumorzellwachstum erhofft (Marone *et al.*, 2008). Der erste synthetische PI3K-Inhibitor war LY294002 (Vlahos *et al.*, 1994; Rewcastle, 2009). In der Zellkultur wurden die Wirkungen dieser Klasse IA PI3K-Inhibitors bereits extensiv untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass LY294002 das Zellwachstum *in vitro* retardiert (Guo *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2013a). Aber auch in Kombination mit Chemotherapeutika oder Bestrahlung zeigte dieser PI3K-Inhibitor enorme Wirkung (Lee *et al.*, 2006; Fujiwara *et al.*, 2008).

1.3.3 Akt

Akt, auch Proteinkinase B (PKB), ist eine 56 kDa große Serin/Threoninkinase, die in Säugern in den drei Isoformen Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) und Akt3 (PKB γ) vorkommt und bei normalen zellulären Prozessen eine wesentliche Rolle spielt (Dummler *et al.*, 2007). Trotz der hohen Homologie zwischen den Isoformen besitzen sie spezifische Funktionen. Dabei wird Akt1 eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellüberlebens zugeschrieben (Cho *et al.*, 2001b) und ist daher im Hinblick auf diese Arbeit von besonderem Interesse. Akt2 scheint in der Erhaltung des Glukosehaushalts eine zentrale Rolle zu spielen (Cho *et al.*, 2001a; Gonzalez *et al.*, 2009) und Akt3 ist stark in die Gehirnentwicklung involviert (Easton *et al.*, 2005; Tschopp *et al.*, 2005). Alle Akt-Isoformen bestehen aus einer C-terminalen regulatorischen Domäne mit einem hydrophoben Motiv (HM), einer zentralen Kinasedomäne und einer N-terminalen PH-Domäne (Song *et al.*, 2005). Über ihre PH-Domäne bindet Akt an PIP₃, das zuvor, katalysiert durch PI3K, aus PIP₂ gebildet wird. Damit einher geht die Translokation von Akt zur Plasmamembran. Hierfür ist die PH-Domäne essentiell, denn eine Akt-Mutante, die die Fähigkeit zur Interaktion mit PIP₃ fehlt, kann nicht translozieren (Andjelkovic *et al.*, 1997). In der Akt-Kinasedomäne befindet sich ein hochkonservierter Threoninrest (T308 für Akt1, T309 für Akt2, T305 für Akt3), dessen Phosphorylierung wichtig für die Akt-Aktivierung ist (Nicholson *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005). Die ebenfalls zur Plasmamembran rekrutierte PDK1 ist für diese aktivierende Phosphorylierung zuständig (Alessi *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1998). Für eine vollständige Akt-Aktivierung ist aber auch die Phosphorylierung an einer zweiten konservierten Phosphorylierungsstelle, einem Serin (S473 für Akt1, S474 für Akt2, S472 für Akt3), welches sich in der C-terminalen Domäne von Akt befindet, erforderlich (Alessi *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 2002; Bellacosa *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Bisher konnte noch nicht abschließend geklärt werden, welche Kinase/n für die Serin-Phosphorylierung zuständig ist/sind. Im Moment ist eine vollständige Aktivierung durch Autophosphorylierung (Toker *et al.*, 2000) oder durch die hypothetische Kinase namens PDK2 denkbar. Als mögliche PDK2-Kandidaten kommen u. a. mTORC2 und DNA-PKcs in Betracht (Feng *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2005; Sarbassov *et al.*, 2005). Vollständig aktiviert transloziert Akt von der Plasmamembran ins Zytoplasma und in den

Nukleus, wo die Serin/Threoninkinase ihre Substrate phosphoryliert und dadurch aktiviert oder inhibiert, was schließlich zur Beeinflussung verschiedener zellulärer Mechanismen wie Zellüberleben/Apoptose, Angiogenese, Proliferation/Zellzyklus, Glukosemetabolismus, Translation oder Zellmigration führt (Bellacosa *et al.*, 2004; Manning *et al.*, 2007; Toulany *et al.*, 2010). Zudem scheint Akt direkt in die DNA-Schadensreparatur und die Strahlenresistenz involviert zu sein, worauf später noch ausführlicher eingegangen wird (**Kapitel 1.3.5**). Die EGFR-vermittelte Signalkaskade über PI3K und Akt wird durch die *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) negativ reguliert. Der Tumorsuppressor PTEN dephosphoryliert PIP₃ zu PIP₂, wirkt der PI3K daher direkt entgegen und schaltet die Akt-Aktivierung ab (Simpson *et al.*, 2001).

Die Serin/Threoninkinase Akt nimmt in der Transformation und Krebsentstehung eine bedeutende Rolle ein. In vielen malignen Tumoren findet man in den Genen, die für Akt1, Akt2 und Akt3 codieren, Amplifikationen oder Mutationen, die zu einer Akt-Überexpression oder Akt-Überaktivierung und folglich zur Malignität führen (Bellacosa *et al.*, 2004; Altomare *et al.*, 2005). Bisher wurde die Isoform Akt1 in diesem Zusammenhang am besten untersucht. So konnte gezeigt werden, dass in Tumoren unterschiedlicher Entität das Phospho (P)-Akt-Level häufig erhöht ist und eine Akt-Überaktivierung mit einer schlechten Prognose korreliert (Ringel *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005; Robertson, 2005; Dobashi *et al.*, 2012).

Molekulare Targeting Strategien, die gegen die Serin/Threoninkinase gerichtet sind, scheinen daher vielversprechend (Garcia-Echeverria *et al.*, 2008). Gegen Akt gerichtete Wirkstoffe wurden *in vitro* und *in vivo* ausgiebig untersucht. So konnte bereits gezeigt werden, dass Akt-Inhibitoren wie beispielsweise Perifosine oder MK2206 nicht nur per se das Wachstum von Tumorzellen hemmen (Liu *et al.*, 2011; Yap *et al.*, 2011), sondern auch in Kombination mit Chemotherapeutika, anderen antitumoralen Substanzen oder ionisierender Strahlung sehr wirksam sind (Vink *et al.*, 2006; Hirai *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2012). Einige der Wirkstoffe gegen Akt werden derzeit in Form einer Mono- oder Kombinationstherapie in klinischen Studien getestet (www.clinicaltrials.gov).

1.3.4 mTOR

Mammalian target of Rapamycin (mTOR) ist eine 289 kDa große Serin/Threoninkinase, die in Säugern in zwei verschiedenen Komplexen vorkommt. Beide Komplexe, *mTOR complex 1* (mTORC1) und *mTOR complex 2* (mTORC2), verfügen neben mTOR über *G protein beta subunit-like* (GβL) und *DEP domain-containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR). mTORC1 enthält zusätzlich die Proteine *regulatory associated protein of mTOR* (Raptor) und *proline-rich Akt substrate 40 kDa* (PRAS40), mTORC2 die Proteine *Rapamycin-insensitive comapnion of mTOR* (Rictor), *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1* (mSIN1) und *protein observed with rictor* (Protor) (Sabatini, 2006; Zoncu *et al.*, 2011).

Grundsätzlich haben die beiden Komplexe unterschiedliche Aufgaben. mTORC1 ist in der EGFR-vermittelten Signalkaskade PI3K und Akt nachgeschaltet. Aktiviert wird mTORC1 entweder direkt durch Phosphorylierung an S2448 oder aber indirekt durch die Phosphorylierung und Hemmung eines Komplexes, der aus *Tuberous sclerosis 1* (TSC1) und *Tuberous sclerosis 2* (TSC2) gebildet wird (Hay *et al.*, 2004). Darüber hinaus scheint der Phosphorylierungsstatus an S2481 mit dem mTORC1-Aktivitätszustand zu korrelieren (Foster *et al.*, 2010; Soliman *et al.*, 2010). mTORC1 kontrolliert die Translation der regulatorischen Proteine des Zellzyklus und des Zellwachstums über zwei Wege. Zum einen phosphoryliert mTORC1 die Kinase *p70 ribosomal protein S6 kinase 1* (S6K1), welche dann verschiedene Translationsfaktoren und RNA-Bindungsproteine, wie z. B. das ribosomale Protein S6, phosphoryliert. Dies führt zu einer erhöhten Proteinsyntheserate (Bjornsti *et al.*, 2004; Hay *et al.*, 2004). Zum anderen phosphoryliert mTORC1 in seinem aktivierten Zustand *eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1* (4E-BP1). Während unphosphoryliertes 4E-BP1 an *eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E) bindet und dadurch die Translationsinitiation hemmt, führt die Phosphorylierung von 4E-BP1 zur Freisetzung von eIF4E und somit zur Translationsinitiation mehrerer Proteine, die die Zellproliferation kontrollieren und das Zellwachstum regulieren (Bjornsti *et al.*, 2004; Hay *et al.*, 2004). Die genaue Rolle von mTORC2 ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass mTORC2 Akt vorgeschaltet ist und diese durch Phosphorylierung an S473 vollständig aktiviert (Sarbasov *et al.*, 2005).

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf dem mTORC1-Komplex, der der Einfachheit halber ab jetzt lediglich als mTOR bezeichnet wird. Eine Dysregulation des mTOR-Komplexes spielt bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen des Menschen eine wichtige Rolle. So konnte neben einer erhöhten mTOR-Aktivität in Tumoren der Lunge eine Korrelation zwischen dem mTOR-Aktivitätsgrad und dem Metastasierungspotenzial beobachtet werden (Dobashi *et al.*, 2011). Sowohl für den experimentellen als auch für den klinischen Einsatz wurden eine Reihe von mTOR-Inhibitoren entwickelt (Ballou *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit spielt vor allem der mTOR-Inhibitor Rapamycin eine bedeutende Rolle.

Rapamycin wurde im Jahre 1975 auf der Suche nach neuen Antibiotika entdeckt. Es wurde aus einem Stamm von *Streptomyces hygroscopicus* gewonnen, der in einer Bodenprobe der im Südostpazifik gelegenen Osterinseln (Rapa Nui) gefunden wurde (Mita *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2012). Rapamycin hat allerdings keine antibakterielle Wirkung. Vielmehr wurde seine antifugale, dann seine immunsuppressive Wirkung nachgewiesen (Singh *et al.*, 1979; Eng *et al.*, 1984; Abraham *et al.*, 1996). Mittlerweile ist bekannt, dass Rapamycin ein potenter allosterischer mTOR-Inhibitor ist, der zudem starke antitumorale Wirkung besitzt (Douros *et al.*, 1981; Yuan *et al.*, 2009). Um seine Wirkung zu entfalten, bindet Rapamycin an den intrazellulären Rezeptor *12 kDa FK506 Binding Protein* (FKBP12) und bildet mit diesem einen Komplex. Dieser Komplex bindet mit hoher Affinität an mTOR des mTORC1 und

hemmt seine intrinsische Kinaseaktivität (Mita *et al.*, 2003). Die Kinaseaktivität von mTORC2 wird nicht gehemmt. Rapamycin zeigte in *In-vitro*-Studien eine starke zytostatische Wirkung auf eine Reihe von Tumorzellen (Eng *et al.*, 1984; Seufferlein *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2001; Noh *et al.*, 2004; Gulhati *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011). Ebenso konnte in Mäusen, denen humane Magenkarzinomzellen oder Zellen eines humanen Cholangiokarzinoms implantiert wurden, eine Rapamycin-bedingte, signifikante Hemmung des subkutanen Tumorwachstums beobachtet werden (Lang *et al.*, 2005; Serr *et al.*, 2006). Aufgrund dieser vielversprechenden präklinischen Ergebnisse wurden große Hoffnungen in diesen Inhibitor gesetzt. Allerdings beschränkte seine schlechte chemische Löslichkeit ebenso wie seine schlechte Bioverfügbarkeit seine klinische Anwendung, was zur Entwicklung synthetischer Derivate wie Temsirolimus (CCI-779) und Everolimus (RAD001) führte (Bjornsti *et al.*, 2004; Fasolo *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2012). Rapamycin-Derivate werden auch als Rapaloge bezeichnet und haben denselben Wirkmechanismus wie Rapamycin. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Rapamycin/Rapaloge das krankheitsfreie Überleben von Patienten mit fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom verbessern (Hudes *et al.*, 2007; Motzer *et al.*, 2008; Amato *et al.*, 2009; Motzer *et al.*, 2010). Auch beim Endometriumkarzinom und Mantelzell-Lymphom zeigten Rapamycin und seine Derivate gute Wirkung (Hess *et al.*, 2009). Allerdings waren die Ansprechraten und der klinische Nutzen in anderen Tumorentitäten bei einer Rapamycin/Rapalog-Monotherapie eher gering (Chan *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2005; LoPiccolo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wolpin *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012). Das könnte zum einen daran liegen, dass Rapamycin und seine Derivate nicht in der Lage sind, mTORC2-Komplexe sowie alle mTORC1-Komplexe vollständig zu hemmen (Thoreen *et al.*, 2009). Zum anderen, und dies ist viel bedeutender, könnte eine Rapamycin-Resistenz dadurch bedingt sein, dass eine Rapamycin/Rapalog-Behandlung zur PI3K/Akt-Aktivierung führt. Unter physiologischen Bedingungen wird der EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert. Dabei phosphoryliert die durch mTOR aktivierte S6K1 *insulin receptor substrate 1* (IRS1), welches dadurch inaktiviert wird und eine reduzierte PI3K/Akt-Aktivität mit sich zieht (Harrington *et al.*, 2004; Boura-Halfon *et al.*, 2009). Durch eine Behandlung mit Rapamycin wird dieser negative Rückkopplungsmechanismus aufgehoben, was, wie in präklinischen und/oder klinischen Studien gezeigt werden konnte, eine PI3K-abhängige Akt-Aktivierung zur Folge hat (Sun *et al.*, 2005; O'Reilly *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007; Roforth *et al.*, 2008; Taberner *et al.*, 2008; Dufour *et al.*, 2011; He *et al.*, 2011) (**Abb. 1.1**). Die Rapamycin/Rapalog-induzierte Akt-Aktivierung wirkt dem therapeutischen Potenzial dieser Inhibitoren entgegen und geht mit einer schlechten Prognose einher. So war beispielsweise in Patienten mit einem PTEN-negativen Glioblastom-Rezidiv, die nach einem operativen Eingriff mit Rapamycin behandelt wurden und daher eine erhöhte Akt-Aktivität besaßen, der Zeitraum bis zum Fortschreiten der Tumorerkrankung verkürzt (Cloughesy *et al.*, 2008).

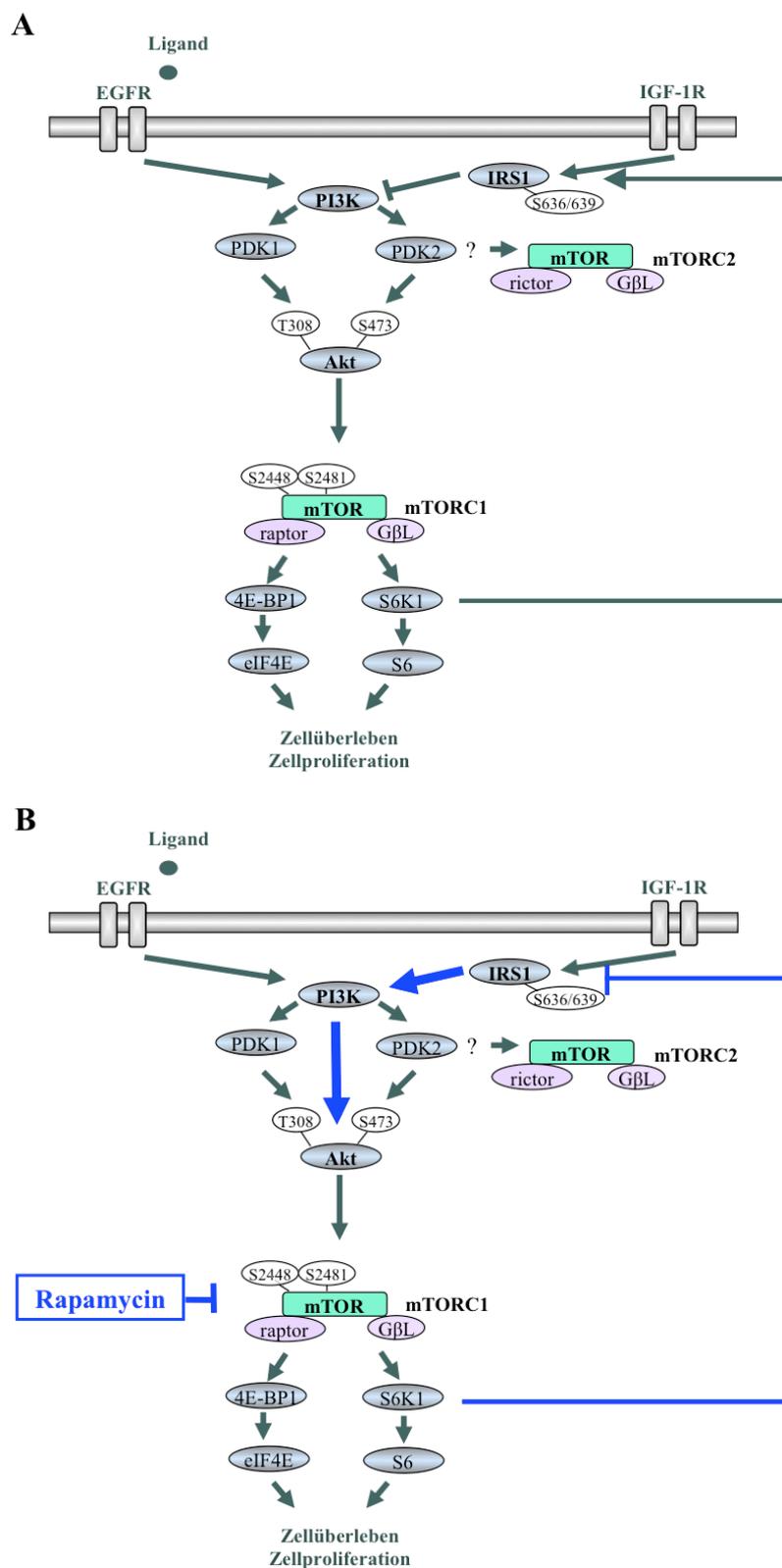


Abb. 1.1: EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg. (A) Ein negativer Rückkopplungsmechanismus reguliert die Signalkaskade unter physiologischen Bedingungen, wobei S6K1 IRS1 an S636/639 phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Dies resultiert in einer reduzierten PI3K/Akt-Aktivität. (B) Rapamycin hebt diesen negativen Rückkopplungsmechanismus auf, was eine PI3K/Akt-Aktivierung zur Folge hat.

Trotz zum Teil sehr ermutigender Resultate zeigte sich insgesamt, dass Rapamycin und seine Derivate als Einzelsubstanzen die in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllen konnten. Derzeit geht man davon aus, dass mTOR-Inhibitoren ihren Platz innerhalb von Kombinationstherapien haben, die das Auftreten einer Rapamycin/Rapalog-Resistenz und damit ein Wirksamkeitsverlust im Verlauf der kontinuierlichen Therapie verhindern sollen. Denkbar sind dabei Kombinationen von mTOR-Inhibitoren mit Substanzen, die in andere Knotenpunkte des EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs eingreifen, mit klassischen Zytostatika oder auch mit strahlentherapeutischen Verfahren (Zhou *et al.*, 2012). Tatsächlich wurde gezeigt, dass sich Rapamycin/Rapaloge und der PI3K-Inhibitor LY294002 in Zellen des Lungenkarzinoms und der T-Zell-Leukämie (Ikezoe *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008) sowie Rapamycin/Rapaloge und der Akt-Inhibitor MK2206 (Ewald *et al.*, 2013) in Zellen und Xenograft-Modellen des Cholangiokarzinoms in ihrer antitumoralen Wirkung synergistisch verstärken. Ebenso konnte, wie in der *Breast Cancer Trials of Oral Everolimus 2* (BOLERO2)-Studie gezeigt, beim fortgeschrittenen Hormonrezeptor-positivem, HER2/c-neu-negativem Mammakarzinom ein verlängertes progressionsfreies Überleben durch die Kombination von Rapamycin/Rapaloge mit dem Aromataseinhibitor Exemestan erzielt werden (Dumont *et al.*, 2012; Beck *et al.*, 2014). Daneben gibt es auch Ansätze, die eine Rapamycin-induzierte Strahlensensitivierung zeigten (Dumont *et al.*, 2012). Allerdings war dieser Effekt stark zelllinienabhängig (Shinohara *et al.*, 2005; Albert *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2006; Ekshyyan *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; No *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Nagata *et al.*, 2010; Schiewer *et al.*, 2012; Nassim *et al.*, 2013). Unverstanden bleibt bisher, welche genauen Mechanismen die zelllinienabhängige Rapamycin-induzierte Strahlensensitivierung bedingen. Ein besseres Verständnis der Resistenzmechanismen auf molekularer Ebene könnte in diesem Zusammenhang zusätzliche Möglichkeiten für ein gezielteres Entgegensteuern eröffnen.

1.3.5 Die Rolle des EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in der DNA-DSB-Reparatur

Der EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg spielt in der Strahlenresistenz von Tumorzellen eine bedeutende Rolle (**Abb. 1.2**). In *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien konnte bereits sehr eindrücklich gezeigt werden, dass durch gezieltes, molekulares Targeting gegen bestimmte Komponenten dieses Signalwegs die Radiotoxizität der Strahlentherapie signifikant verstärkt werden kann. Während man anfangs davon ausging, dass der strahlensensitivierende Effekt der eingesetzten Inhibitoren durch eine erhöhte Apoptoserate, durch Induktion der Autophagie oder des Zellzyklusarrests bzw. durch Hemmung der Angiogenese begründet ist, zeigen aktuelle Studien ganz anschaulich, dass der strahlensensitivierende Effekt vieler Inhibitoren primär mit einer Unterdrückung der Kapazität der Tumorzellen für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB korreliert (Toulany *et al.*, 2010; Toulany, 2013).

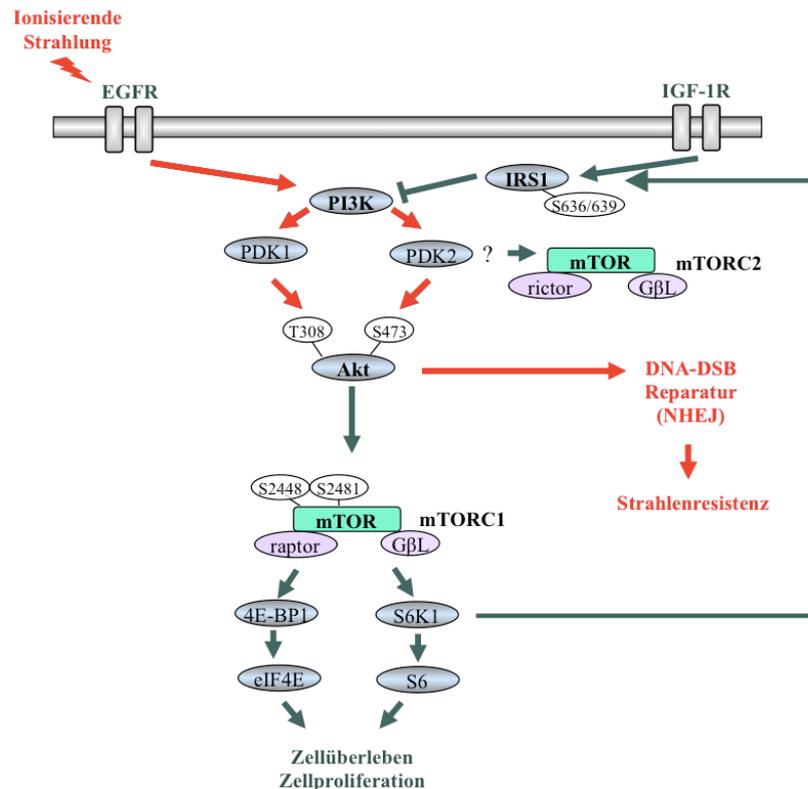


Abb. 1.2: Die Bedeutung des EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in der zellulären Strahlenresistenz. Der EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg spielt in der Strahlenresistenz der Tumorzellen eine bedeutende Rolle. Da Akt in die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB via NHEJ involviert ist, nimmt Akt in diesem Prozess eine zentrale Rolle ein.

Der erste Hinweis, dass der EGFR die DNA-DSB-Reparatur beeinflussen könnte, erhielt man, als nach Behandlung mit C225 (Cetuximab) eine physikalische Interaktion zwischen dem EGFR und dem Schlüsselenzym des NHEJ-Signalwegs, der DNA-PKcs, nachgewiesen werden konnte (Bandyopadhyay *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2007b). Detailliertere Studien zeigen, dass der EGFR in unbestrahlten Zellen normalerweise im perinuklearen Zellraum vorliegt, nach Bestrahlung aber ins Nukleoplasma transloziert und dort an die DNA-PKcs bindet. Dabei korreliert die EGFR/DNA-PKcs-Interaktion mit der strahleninduzierten DNA-PKcs-Phosphorylierung an T2609, die als Maß für ihre Aktivität gilt (Dittmann *et al.*, 2005a; Chen *et al.*, 2007b). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte in einer *In-vitro*-Studie gezeigt werden, dass C225 die strahleninduzierte Translokation des EGFR in den Zellkern unterbindet, was mit einer Reduktion der DNA-PKcs-Aktivität einhergeht und zu einer signifikanten Strahlensensitivierung der untersuchten Zellen führt (Dittmann *et al.*, 2005a; Dittmann *et al.*, 2005b). In klinischen Studien verlängerte Cetuximab in Kombination mit Bestrahlung sogar das Überleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (Bonner *et al.*, 2006). Ebenso wie monoklonale Antikörper gegen den EGFR zeigte auch der Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib in präklinischen Untersuchungen strahlensensitivierende Wirkung (Tanaka *et al.*, 2008); allerdings gibt es noch keine klinische Daten, die eine Verbesserung des Überlebens durch Tyrosinkinaseinhibitoren belegen (Toulany *et al.*, 2010).

Toulany und Kollegen publizierten im Jahre 2006, dass die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB in *Ki-ras2 Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS)-mutierten Lungenkarzinomzellen beeinträchtigt ist, nicht nur wenn der EGFR mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor BIBX1382BS inhibiert wurde, sondern auch bei Hemmung der PI3K mittels LY294002. Damit einher ging eine Reduktion der strahleninduzierten DNA-PKcs-Phosphorylierung an T2609, was deren Kapazität für die Reparatur strahleninduzierter DSB stark minderte und zur Verstärkung der Radiotoxizität führte (Toulany *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen sind in Einklang mit den Daten von Kao *et al.*, Choi *et al.* und Tanno *et al.*, welche in bestrahlten, LY294002 behandelten Glioblastom-, Lungenkarzinom- bzw. Gallengangkrebszellen ebenfalls eine reduzierte Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden, ein reduziertes DNA-PKcs-Phosphorylierungslevel (T2609) bzw. eine damit einhergehende erhöhte zelluläre Strahlenempfindlichkeit nachweisen konnten (Tanno *et al.*, 2004; Kao *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2010).

Hinzu kommt, dass nicht nur der EGFR und die PI3K in die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB involviert sind, sondern auch der PI3K-Effektor Akt. Im Zusammenhang mit einer Strahlenresistenz ist vor allem die Akt-Isoform Akt1 gut untersucht; für die beiden anderen Isoformen, Akt2 und Akt3, liegen noch keine Daten vor. Die pharmakologische Inhibition (mittels API) und genetische Modulation (mittels AKT1-siRNA) der Akt1 sind mit einer Reduktion strahleninduzierter DNA-PKcs-Phosphorylierungen (T2609, S2056) und einer damit einhergehenden reduzierten DNA-Schadensreparatur verbunden. Dies wiederum führt zu einer Verstärkung der Radiotoxizität (Toulany *et al.*, 2006; Toulany *et al.*, 2008). Diese Daten sind mit denen von Choi *et al.* bzw. Golding *et al.* in Einklang zu bringen, die Versuche mit anderen Akt-Inhibitoren, Akt Inhibitor VIII bzw. SH-5, durchgeführt haben (Golding *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010). Es gibt Hinweise dafür, dass gerade Akt1 als Komponente des EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in der Regulation der NHEJ-Reparatur strahleninduzierter DSB eine bedeutende Rolle spielt. Wie aus dem Labor der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen, aber auch von Park und Kollegen berichtet wurde, interagiert Akt1 über ihre C-terminale Domäne mit der DNA-PKcs und bildet mit dieser nach Bestrahlung einen Komplex (Toulany *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Toulany *et al.*, 2012). Diese Komplexbildung stimuliert daraufhin nicht nur die Bindung der DNA-PKcs an Ku-markierte freie DNA-Bruchenden, sondern führt auch zu deren Aktivierung. Darüber hinaus stimuliert Akt die Autophosphorylierung der DNA-PKcs, wodurch diese von der DNA dissoziieren kann – ein bedeutender Schritt, der zur Beendigung der DNA-Reparatur beiträgt (Toulany *et al.*, 2012).

Daneben gibt es Ansätze, die eine mTOR-Inhibitor-induzierte Strahlensensitivierung von Tumorzellen zeigen. Eine strahlensensitivierende Wirkung des mTOR-Inhibitors Rapamycin und dessen Derivate konnte beispielsweise in definierten Prostata- (Cao *et al.*, 2006; Schiewer *et al.*, 2012), Mamma- (Albert *et al.*, 2006; No *et al.*, 2009), Lungen- (Kim *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Nagata *et al.*, 2010) und Blasenkarzinomzellen (Nassim *et al.*, 2013) beobachtet

werden, während in Zellen von Kopf-Hals-Tumoren (Ekshyyan *et al.*, 2009) kein nennenswerter Effekt zu beobachten war. In Glioblastomzelllinien zeigte sich, abhängig von den Zelllinien, entweder ein strahlensensitivierender oder kein Effekt (Shinohara *et al.*, 2005). Unverstanden bleibt bisher, welche Mechanismen die zelllinienabhängige mTOR-Inhibitor-induzierte Strahlensensitivierung bedingen. Zwei bislang veröffentlichte Studien bringen die strahlensensitivierende Wirkung der mTOR-Inhibitoren mit einer verminderten DNA-DSB-Reparatur in Verbindung (Choi *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011) – und diese sind die bisher einzigen Publikationen, die die Rapamycin-induzierte Strahlensensitivierung mit einer verminderten DNA-DSB-Reparatur begründen. Es gibt auch vereinzelt Hinweise dafür, dass mTOR-Inhibitoren über die Induktion der Autophagie (Zhuang *et al.*, 2011; Anbalagan *et al.*, 2012), des Zellzyklusarrests (Choi *et al.*, 2010) oder der Apoptose (Anandharaj *et al.*, 2011) sowie über die Hemmung der Vaskularisierung der Tumore (Guba *et al.*, 2002; Shinohara *et al.*, 2005) die Radiotoxizität erhöhen könnten. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die genauen Mechanismen, die die zelllinienabhängige, Rapamycin-induzierte Strahlensensitivierung bedingen, zu verstehen.

1.4 Zielsetzung

Vorarbeiten der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen, belegen eine wichtige Rolle des EGFR/PI3K/Akt-Signalwegs in der Strahlenresistenz von Tumorzellen. In verschiedenen Arbeiten konnte durch molekulare Targeting Strategien, die gegen einzelne Komponenten dieses Signalwegs gerichtet waren, die Radiotoxizität der Strahlentherapie verstärkt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die strahlensensitivierende Wirkung der verwendeten Inhibitoren mit einer verminderten Fähigkeit der Tumorzellen, die strahleninduzierten DNA-DSB zu reparieren, korreliert. In diesen Vorarbeiten lag das Hauptaugenmerk auf dem EGFR, welcher durch den Einsatz monoklonaler Antikörper oder Tyrosinkinaseinhibitoren in verschiedensten Tumorzelllinien gezielt gehemmt wurde (Dittmann *et al.*, 2005a; Dittmann *et al.*, 2005b; Toulany *et al.*, 2005; Toulany *et al.*, 2006; Saki *et al.*, 2013). Vielversprechende Ergebnisse liegen auch für die Signalwegskomponente PI3K vor, deren Bedeutung für die DNA-Schadensreparatur und die damit einhergehende Strahlenresistenz mittels pharmakologischen Inhibitoren wie LY294002 untersucht wurde (Toulany *et al.*, 2006). Die Ergebnisse beschränken sich dabei auf die Lungenkarzinomzelllinie A549 und die Kopf-Hals-Tumorzelllinie FaDu. Wie weitere Arbeiten zeigen, ist auch der PI3K-Effektor Akt in die Reparatur strahleninduzierter DSB und die damit einhergehende Strahlenresistenz involviert. Bei diesen Versuchen lag der Fokus auf der Akt-Isoform Akt1 (Toulany *et al.*, 2008; Toulany *et al.*, 2012); für Akt2 und Akt3 gibt es bislang keine Ergebnisse.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden verschiedene Tumorzelllinien untersucht. So wurde neben den Lungenkarzinomzelllinien A549, SK-MES-1, HTB-182, H460 und H661 auch die

Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 analysiert. Das Hauptaugenmerk lag zunächst auf den Knotenpunkten PI3K und Akt. Mittels geeigneten molekularen Targeting Strategien (pharmakologische Inhibitoren, siRNA- und/oder shRNA-Analysen) sollten folgende Fragestellungen *in vitro* untersucht werden:

PI3K:

- Welche Rolle spielt die PI3K für die Strahlenantwort der verwendeten Tumorzelllinien?
- Inwieweit wird die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB durch die PI3K beeinflusst?

Akt:

- Welche Rolle spielen die verschiedenen Akt-Isoformen (Akt1, Akt2, Akt3) für das klonogene Überleben der verwendeten Tumorzelllinien nach Bestrahlung?
- In welcher Hinsicht beeinflussen die einzelnen Akt-Isoformen die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB? Agieren die verschiedenen Akt-Isoformen dabei konform oder gar konträr?

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf mTOR. mTOR ist ein Effektor der Proteinkinase Akt, dem – wie bereits gezeigt (**Kapitel 1.3.4**) – in der Karzinogenese eine wichtige Rolle zuteil wird. Molekulare Targeting Strategien gegen mTOR sind in der Krebstherapie keine Seltenheit mehr. In präklinischen Studien konnte die antitumorale Wirkung des mTOR Inhibitors Rapamycin und dessen Derivate (Rapaloge) anschaulich demonstriert werden. Doch trotz sehr ermutigender Resultate hat sich gezeigt, dass Rapamycin/Rapaloge als Einzelsubstanzen die in sie gesetzten Erwartungen in der Klinik nicht erfüllen konnten. Möglicherweise haben mTOR-Inhibitoren ihren Platz innerhalb von Kombinationstherapien. Im Labor der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen, wurden bisher noch keine Experimente durchgeführt, bei denen die Wirkung von Rapamycin auf Tumorzellen untersucht wurde. Durch die gezielte Behandlung mit Rapamycin sollten deshalb folgende Fragestellungen *in vitro* beantwortet werden:

mTOR

- Kann in den verwendeten Tumorzelllinien durch die Behandlung mit Rapamycin eine Proliferationshemmung erzielt werden?
- Welche Wirkung zeigt Rapamycin in Kombination mit ionisierender Strahlung? Kann durch Rapamycin die Radiotoxizität verstärkt werden?
- Inwiefern wird die DNA-Schadensreparatur nach Strahlenexposition durch Rapamycin beeinflusst?
- Wie ändert sich nach einer Rapamycin-Exposition die Expression der Proteine des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs?

- Ist die bereits mehrfach publizierte Rapamycin-induzierte PI3K/Akt-Aktivierung in den hier verwendeten Zelllinien vorzufinden und welche Rolle spielt sie in diesen?

Abschließend sollten Kombinationsstrategien untersucht werden, mit denen gegebenenfalls synergistische Effekte erzielt werden können. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf folgenden Kombinationen:

- Bestrahlung + mTOR-Inhibition + PI3K-Inhibition
- Bestrahlung + mTOR-Inhibition + panAkt-Inhibition
- Bestrahlung + mTOR-Inhibition + Akt1-Inhibition

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Kern & Sohn
Binokular	Carl Zeiss
Brutschrank	Binder, Heraeus
Bunsenbrenner	Carl Roth
ELISA-Reader	Anthos Labtec Instruments
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Witeg Labortechnik
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch
Gelelektrophorese-Kammer	Hofer
Kühlschrank (4 °C)	Siemens
Lichtmikroskop	Leitz
Magnetrührer	Heidolph Instruments
Netzteil für Elektrophorese	Pharmacia
pH-Meter	WTW
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe, Pipetboy	Integra Biosciences
Präzisionswaage	Sartorius
Röntgenbestrahlungseinheit (RS-225)	Gulmay Medical
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert
Schüttelgerät (rotierend)	Heidolph Instruments
Schüttelgerät (schüttelnd)	Edmund Bühler
Semi-Dry-Blot-System	Hofer
Sterilbank für die Zellkultur	BDK Luft- u. Reinraumtechnik
Ultraschallgerät Sonifier B-12	Branson Ultrasonics Corporation
Vakuumsystem	KNF Neuberger
Vortexer	UniEquip
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Andreas Hettich, Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6 cm-Zellkulturschalen	BD Falcon
10 cm-Zellkulturschalen	BD Falcon
Culture Slides (4-Well)	BD Falcon
Filterpipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1.000 µl)	Sarstedt
Filtropur Filtrationseinheiten	Sarstedt
Gewebekulturflaschen	BD Falcon

Multi-Well-Platten (6-Well)	BD Falcon
Multi-Well-Platten (96-Well)	Greiner Bio-One
Nitrilhandschuhe	Hartmann, Kimberly-Clark
Nitrocellulosemembran (0,2 µm)	Carl Roth
Pasteurpipetten aus Glas	Wu Mainz
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (50 ml)	Greiner Bio-One
Röntgenfilme (Curix Cronex 5)	Agfa-Gevaert
Stripetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar
Whatman-Chromatografiepapier (3 mm)	Whatman, GE Healthcare
Zellschaber	Costar

2.1.3 Software

Software	Hersteller
Adobe Acrobat X Pro	Adobe
Adobe Photoshop CS6	Adobe
AxioVision Rel. 4.8.2	Carl Zeiss MikroImaging
ImageJ 1.47v	National Institutes of Health
IrfanView Thumbnails 4.37	Irfan Skiljan
Microsoft Office für Mac 2011	Microsoft
SigmaPlot 2001	Systat Software

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1), 30 %	Carl Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Borsäure	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Applichem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Entwickler	Agfa-Gevaert
Ethanol	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech
Fixierer	Agfa-Gevaert
Formaldehydlösung, 37 %	Merck
Glycerin	Applichem
Glycerol-2-phosphat	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth
Isopropanol	Merck
Kaleidoscope Molekulargewicht-Marker	BioRad
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth

Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kristallviolett	Applichem
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Biochrom
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich
Puromycin	Sigma-Aldrich
Salzsäure, 37 %, (HCl)	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris Base	Applichem
Tris HCl	Applichem
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich
Tween-20	Carl Roth
Vectashield Mounting Medium mit Dapi	Vector Laboratories

2.1.5 Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Anodenpuffer, pH 9,0	3,1 g Borsäure 4 ml 10 % SDS (v/v) 200 ml Methanol ad 1 l H ₂ O _{dest}
Kathodenpuffer, pH 9,0	3,1 g Borsäure 4 ml 10 % SDS (v/v) 50 ml Methanol ad 1 l H ₂ O _{dest}
Kristallviolett-Färbelösung	0,5 g Kristallviolett 27 ml Formaldehydlösung, 37 % ad 1 l PBS
Ladepuffer (2x)	25 ml Sammelgelpuffer (4x) 20 ml 10 % SDS (v/v) 20 ml Glycerin 2,5 mg Bromphenolblau ad 100 ml H ₂ O _{dest} <i>5 % 2-Mercaptoethanol vor Gebrauch zugeben</i>

Lysispuffer, pH 7,5	50 mM Tris HCl 50 mM Glycerol-2-phosphat 150 mM NaCl 1 mM Na ₃ VO ₄ 10 % Glycerin 1 % Tween-20 1 mM NaF <i>0,1 % 1 M DTT, 1 % Proteaseinhibitoren und je 1 % Phosphataseinhibitoren- Cocktail 2 bzw. 3 vor Gebrauch zugeben</i>
PBS, pH 7,4	13,7 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Sammelgelpuffer (4x), pH 6,8	30,3 g Tris Base 20 ml 10 % SDS (v/v) ad 500 ml H ₂ O _{dest}
SDS-Laufpuffer (5x), pH 8,6	144,1 g Glycin 30,3 g Tris Base 10 g SDS ad 2 l H ₂ O _{dest}
Strippingpuffer, pH 2,2	4,5 g Glycin 3 ml 10 % SDS (v/v) 3 ml Tween-20 ad 300 ml H ₂ O _{dest}
TBST, pH 7,5	3,152 g Tris HCl 11,688 g NaCl 2 ml Tween-20 ad 2 l H ₂ O _{dest}
Trenngelpuffer (4x), pH 8,8	90,85 g Tris Base 20 ml 10 % SDS (v/v) ad 500 ml H ₂ O _{dest}

2.1.6 Kits

Kit

Hersteller

ECL Western Blotting Detection Kit
DC Protein Assay

GE Healthcare
BioRad

2.1.7 siRNAs

siRNA	Hersteller
AKT1 (siGENOME SMARTpool)	Thermo Scientific
AKT2 (siGENOME SMART pool)	Thermo Scientific
AKT3 (siGENOME SMART pool)	Thermo Scientific
Non-targeting siRNA (siCON)	Thermo Scientific

2.1.8 Inhibitoren**2.1.8.1 Proteaseinhibitor**

Inhibitor	Hersteller
Protease Inhibitor Cocktail complete, Mini	Roche

2.1.8.2 Phosphataseinhibitoren

Inhibitor	Spezifität	Hersteller
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Tyrosin-Phosphatasen	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Serin/Threonin-Phosphatasen	Sigma-Aldrich

2.1.8.3 Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs

Inhibitor	Spezifität	Hersteller
LY294002	PI3K	Calbiochem
MK2206	Akt1, Akt2, Akt3	Selleckchem
Rapamycin	mTOR	Enzo

2.1.9 Antikörper**2.1.9.1 Primäre Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Typ	Klon	Konz.	Hersteller
Akt	Maus	mAb	2PKBa/Akt	1:1.000	BD Biosciences
P-Akt (S473)	Kaninchen	pAb	---	1:1.000	Cell Signaling
P-Akt (T308)	Kaninchen	pAb	---	1:1.000	Cell Signaling
Akt2	Kaninchen	mAb	5B5	1:1.000	Cell Signaling
Akt3	Kaninchen	mAb	62A8	1:1.000	Cell Signaling
GAPDH	Kaninchen	mAb	14C10	1:2.000	Cell Signaling
GSK3 α/β	Kaninchen	mAb	D75D3	1:2.000	Cell Signaling
P-GSK3 α/β (S21/9)	Kaninchen	mAb	D17D2	1:2.000	Cell Signaling
P-H2AX (S139)	Maus	mAb	JBW301	1: 300	Millipore
mTOR	Kaninchen	mAb	7C10	1:2.000	Cell Signaling
P-mTOR (S2448)	Kaninchen	pAb	---	1:2.000	Cell Signaling
P-mTOR (S2481)	Kaninchen	pAb	---	1:2.000	Cell Signaling

PRAS40	Kaninchen	mAb	D23C7	1:2.000	Cell Signaling
P-PRAS40 (T246)	Kaninchen	mAb	C77D7	1:2.000	Cell Signaling
S6	Maus	mAb	54D2	1:1.000	Cell Signaling
P-S6 (S235/236)	Kaninchen	mAb	2F9	1:1.000	Cell Signaling

2.1.9.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Typ	Konjugat	Konz.	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG	Esel	pAb	HRP	1:2.000	GE Healthcare
Anti-Maus IgG	Schaf	pAb	HRP	1:2.000	GE Healthcare
Anti-Maus IgG	Ziege	pAb	AlexaFluor [®] 488	1: 300	Invitrogen

2.1.10 Zelllinien und Zellkulturmedien

Es wurden folgende etablierte humane Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Beschreibung	Quelle, Referenz
A549	Lungenkarzinom	ATCC [®] , CCL-185 TM
H460	Lungenkarzinom	ATCC [®] , HTB-177 TM
H661	Lungenkarzinom	ATCC [®] , HTB-183 TM
HTB-182	Lungenkarzinom	ATCC [®] , HTB-182 TM
MDA-MB-231	Mammakarzinom	ATCC [®] , HTB-26 TM
MDA-MB-231 shSCR	Mammakarzinom, transfiziert mit Kontroll-shRNA (shSCR)	Prof. Dr. Wolfgang Jücker, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
MDA-MB-231 shAKT1	Mammakarzinom, transfiziert mit shRNA gegen AKT1 (shAKT1)	Prof. Dr. Wolfgang Jücker, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
SK-MES-1	Lungenkarzinom	ATCC [®] , HTB-58 TM

Entsprechend der jeweiligen Zelllinie wurden als Zellkulturmedien *Dullbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) und *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) verwendet. Die Medien wurden in Pulverform von Gibco bezogen. Für die herkömmliche Kultivierung der Zellen wurden alle Medien, wenn nicht anders angegeben, mit NaHCO₃ (DMEM: 3,66 g/l, RPMI: 2,00 g/l), 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt und steril filtriert. Für die Transfektion von Zellen mit siRNA wurde *Opti-Minimum Essential Medium Eagle* (Opti-MEM, von Gibco) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank bei aseptischer Arbeitsweise und unter Verwendung steriler Arbeitsmaterialien durchgeführt. Alle für die Zellkulturarbeiten notwendigen Lösungen wurden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in Gewebekulturflaschen im wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37 °C und unter 7 % Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Begasung. H460 und H661 Zellen wurden in RPMI, A549, HTB-182, SK-MES-1 und MDA-MB-231 Zellen wurden in DMEM kultiviert. Die Kultivierung von MDA-MB-231 shSCR und MDA-MB-231 shAKT1 Zellen erfolgte in DMEM, dem kurz vor Gebrauch für die Selektion der transduzierten Zellen 1,5 µg/ml Puromycin zugesetzt wurde. Um Zellen in ihrer logarithmischen Phase ihres Wachstums zu erhalten, wurden sie zweimal wöchentlich subkultiviert und auf neue Gewebekulturflaschen verteilt. Sowohl bei der Subkultivierung als auch bei der Aussaat der Zellen für die Experimente wurde die Zellzahl lichtmikroskopisch in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt. Die Zelllinien wurden routinemäßig mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Dapi)-Färbung auf Anwesenheit von Mykoplasmen untersucht. Im Falle eines positiven Testergebnisses wurden die Zellen verworfen und nicht für weitere Versuche verwendet.

2.2.2 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Abhängig vom Experiment wurden die Zellen entweder mit dem PI3K-Inhibitor LY294002, dem Akt-Inhibitor MK2206, dem mTOR-Inhibitor Rapamycin oder mit einer Kombination einzelner Inhibitoren behandelt. Alle Inhibitoren wurden in DMSO gelöst. Es wurden Stammlösungen (10 mM) hergestellt, die bis zu ihrer endgültigen Verwendung bei -20 °C gelagert wurden. Entsprechend der benötigten Konzentrationen wurden die Inhibitor-Stammlösungen mit Zellkulturmedium verdünnt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit der gleichen Menge des Lösungsmittels, verdünnt in Zellkulturmedium, behandelt. Die eingesetzten Endkonzentrationen sowie die Behandlungsdauer variierten abhängig vom Experiment und der verwendeten Zelllinie und sind daher beim jeweiligen Experiment im Ergebnisteil angegeben.

2.2.3 Transfektion mit spezifischen siRNAs

Um die Proteinexpression verschiedener Akt-Isoformen temporär zu hemmen, wurden siRNA-Analysen durchgeführt. Die Transfektionsmethode, die hier zum Einsatz kam, beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Zunächst wurden 150.000 A549 Zellen bzw. 160.000 H460 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. 24 Stunden später, als die Zellen 80 %

konfluent waren, konnte mit der Transfektion begonnen werden. Jeder Transfektionsansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 100 μl hergestellt. Dazu wurde zunächst die siRNA in der gewünschten Konzentration mit Opti-MEM in einem Gesamtvolumen von 50 μl vermischt. Die eingesetzten siRNA-Endkonzentrationen variierten abhängig von der zu transfizierenden Zelllinie und sind daher beim jeweiligen Experiment im Ergebnisteil angegeben. Dann wurde pro Transfektionsansatz 1 μl LipofectamineTM 2000 (Transfektionsreagenz) in 49 μl Opti-MEM verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die verdünnte siRNA (50 μl) mit dem verdünnten Transfektionsreagenz (50 μl) kombiniert, vorsichtig gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich konnte der siRNA-LipofectamineTM 2000-Komplex (100 μl) zu den Zellen, bei denen zuvor das Zellkulturmedium durch Opti-MEM ersetzt wurde, pipettiert werden. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen für Western Blot Analysen (**Kapitel 2.2.8**), Koloniebildungstests (**Kapitel 2.2.6**) und γ -H2AX Focus Assays (**Kapitel 2.2.7**) verwendet.

2.2.4 Bestrahlung der Zellen

Die Zellen wurden in der Gulmay-Röntgenbestrahlungseinheit R-225 mit unterschiedlichen Energiedosen bei 37 °C bestrahlt. Die Dosisleistung betrug dabei 1,06 Gy/Minute, die Röhrenspannung lag bei 200 kVp und der Röhrenstrom bei 15 mA. Der am Röhrenaustrittsfenster angebrachte Kupferfilter der Stärke 0,5 mm schwächte die Strahlung und veränderte durch Absorption der weichen niederenergetischen Strahlenanteile die Strahlenqualität im Sinne einer Aufhärtung. Dadurch wurde die Oberflächendosis gesenkt.

2.2.5 Proliferationsassay

Proliferationsassays wurden durchgeführt, um das Wachstum verschiedener Tumorzelllinien und die zytostatische Wirkung von Rapamycin über einen Zeitraum von 4 Tagen zu erfassen. Dazu wurden 30.000 Zellen pro 6 cm-Zellkulturschale (4 technische Replikate pro Versuchsbedingung) ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurde das Zellkulturmedium erneuert und die Zellen mit unterschiedlichen Rapamycin-Konzentrationen (100 nM, 200 nM, 500 nM) behandelt. Kontrollzellen erhielten DMSO. 2 Tage, 3 Tage und 4 Tage nach der Behandlung wurde die Anzahl lebender Zellen lichtmikroskopisch bestimmt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SD) der 4 technischen Replikate berechnet. Die Mittelwerte \pm SD wurden grafisch dargestellt. Zudem wurde der Mittelwert der Zellzahl 4 Tage nach Behandlung dazu verwendet, die Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinie unter DMSO- bzw. Rapamycin-Behandlung zu ermitteln. Die Verdopplungszeit wurde anhand folgender Formel berechnet (www.atcc.org: ATCC Animal Cell Culture Guide):

$$\text{Verdopplungszeit [h]} = \frac{\text{Kulturdauer [h]} \cdot \ln 2}{\ln \left(\frac{N(\text{Ende})}{N(\text{Anfang})} \right)}$$

wobei: N(Ende) = Zellzahl an Tag 4 nach Behandlung
 N(Anfang) = ausgesäte Zellzahl

Der Quotient aus Verdopplungszeit in Rapamycin-behandelten Zellen und Verdopplungszeit in DMSO-behandelten Zellen gibt das Ausmaß der antiproliferativen Wirkung von Rapamycin an.

2.2.6 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest wurde 1956 von Puck und Marcus (Puck *et al.*, 1956) entwickelt und gilt mittlerweile als Goldstandard zur Bestimmung der zellulären Strahlenempfindlichkeit. Viele Zellen besitzen das Potenzial, nach Bestrahlung noch mindestens 5 bis 6 Zellteilungen zu durchlaufen und dabei Kolonien von mindestens 50 Tochterzellen zu bilden. Solche Zellen bezeichnet man als klonogen. Andere Zellen besitzen dieses Potenzial nicht und sterben nach Bestrahlung den klonogenen Zelltod, der sich in der Zellkultur als Verlust der Fähigkeit zur Koloniebildung manifestiert (**Kapitel 1.2.2.2**). Zur Untersuchung der zellulären Strahlenempfindlichkeit nach Behandlung mit unterschiedlichen Inhibitoren wurden die Zellen in definierter Zellzahl in 6-Well-Platten (6 technische Replikate pro Versuchsbedingung) oder in 10 cm-Zellkulturschalen (3 technische Replikate pro Versuchsbedingung) ausgesät. Dabei wurde Zellkulturmedium verwendet, das 20 % FCS enthielt. Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen dann mit dem gewünschten Inhibitor bzw. DMSO behandelt. Die Inhibitorkonzentrationen und Behandlungszeiten variierten abhängig vom Experiment und sind daher beim jeweiligen Experiment im Ergebnisteil angegeben. Nach erfolgter Behandlung wurden die Zellen mit Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt, bevor sie im Brutschrank inkubiert wurden. Die Inkubationszeiten variierten je nach Zelllinie. Die gebildeten Kolonien wurden für einige Minuten in einer Kristallviolett-Lösung fixiert und gefärbt. Unter dem Binokular wurden alle Kolonien gezählt, die aus mehr als 50 Zellen bestanden. Da man in der Regel auch in den unbestrahlten Kontrollen keine hundertprozentige Koloniebildungseffizienz (*plating efficiency*, PE) erhält, wurde die tatsächliche Koloniebildungseffizienz anhand folgender Formel ermittelt:

$$PE(x \text{ Gy}) = \frac{\text{gezählte Kolonien} > 50 \text{ Zellen}}{\text{ausgesäte Zellzahl}}$$

Die relative Überlebensfraktion (*surviving fraction*, SF) ergab sich aus der PE nach Bestrahlung mit der jeweiligen Energiedosis (x Gy), normiert auf die PE der unbestrahlten Kontrollen:

$$SF(x \text{ Gy}) = \frac{PE(x \text{ Gy})}{PE(0 \text{ Gy})}$$

Mit Hilfe eines linear-quadratischen Modells (Kellerer *et al.*, 1973) wurden die Überlebensfraktionen (\pm SD) klonogener Zellen in Abhängigkeit unterschiedlicher Energiedosen in SigmaPlot grafisch dargestellt. Dabei wurde die SF logarithmisch und die Dosis linear aufgetragen.

Um die Wirkung der verwendeten Inhibitoren auf das klonogene Zellüberleben aufzuzeigen, wurde zudem der dosismodifizierende Faktor (*dose modification factor*, DMF) angegeben. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten der Dosis, bei der 37 % der DMSO-behandelten Zellen überleben und der Dosis, bei der 37 % der Inhibitor-behandelten Zellen überleben. Ein DMF < 1 bedeutet Strahlenprotektion, ein DMF > 1 Strahlensensitivierung.

2.2.7 γ -H2AX Focus Assay

Da davon ausgegangen wird, dass nicht-reparierte DNA-DSB den wichtigsten Mechanismus für die biologische Wirkung ionisierender Strahlung darstellen, wurden strahleninduzierte DSB, die nach 24 Stunden noch nicht repariert wurden, mittels γ -H2AX Focus Assay nachgewiesen. Dieser Test beruht auf der Detektion des Histons 2AX (H2AX), welches bereits wenige Minuten nach der DNA-DSB-Induktion an S139 phosphoryliert und dann als γ -H2AX bezeichnet wird. Durch Akkumulation dieser Proteinvariante an DNA-DSB bilden sich subnukleäre Strukturen aus, die nach Fluoreszenzfärbung als sogenannte γ -H2AX Foci zu erkennen sind (Rogakou *et al.*, 1998). Da die Anzahl der γ -H2AX Foci mit der Menge der residuellen DNA-DSB korreliert, ist es möglich durch Auszählen der Foci die Anzahl der DSB in den Zellen zu ermitteln. Zur Untersuchung residueller DNA-DSB wurden die Zellen in definierter Zellzahl in Culture Slides ausgesät und im Brutschrank bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Die Zellen wurden, wie im Ergebnisteil angegeben, mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt. Nach der gewünschten Behandlungszeit wurden die Zellen mit Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt. 24 Stunden später erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung, die, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Dazu wurden die Zellen mit PBS/2 % Formaldehydlösung (37 %) für 15 Minuten fixiert und dann dreimal mit PBS für insgesamt 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/1 % BSA/0,2 % Triton X-100 bei 4 °C für 5 Minuten permeabilisiert. Nach einem 5-minütigen Waschschrift mit PBS/1 % BSA wurden unspezifische Bindungsstellen mit PBS/3 % BSA für 1 Stunde geblockt, gefolgt von einer 1,5-stündigen Inkubation mit einem H2AX-spezifischen Antikörper (P-H2AX (S139)), der in PBS/1 % BSA/0,5 % Tween-20 verdünnt war. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS/1 % BSA/0,5 % Tween-20 für jeweils 5 Minuten gewaschen, bevor sie mit einem Fluoreszenz-konjugierten Sekundäantikörper (AlexaFluor[®]488), verdünnt in PBS/1 % BSA/0,5 % Tween-20, für 30 Minuten inkubiert wurden. Die Zellen wurden erneut dreimal

mit PBS/1 % BSA/0,5 % Tween 20 für jeweils 5 Minuten gewaschen und mit Vectashield Mounting Medium, das gleichzeitig zur Markierung der DNA Dapi enthält, eingebettet. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei einer 400-fachen Vergrößerung. Anhand der Aufnahmen wurden die Foci in 80 bis 200 Zellkernen pro Experiment und Versuchsbedingung gezählt und die Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) grafisch dargestellt.

2.2.8 Western Blot

2.2.8.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Alle Schritte der Gesamtzellextraktion erfolgten auf Eis. Dazu wurden konfluente Zellen, die in 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät und gegebenenfalls entsprechend behandelt wurden, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem adäquaten Volumen Lysispuffer, dem vor Gebrauch 0,1 % 1 M DTT, 1 % Proteaseinhibitoren und je 1 % Phosphataseinhibitoren-Cocktail 2 bzw. 3 zugesetzt wurden, überschichtet. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst und schließlich in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Aufschluss der Zellen wurde durch Sonifizieren im Puls-Modus und einer 30-minütigen Inkubation auf Eis komplettiert. Anschließend wurde das Gesamtzellextrakt durch Zentrifugation (14.000 rpm, 4 °C, 15 Minuten) vom Zellpellet getrennt.

2.2.8.2 Proteinbestimmung

Die Ermittlung des Proteingehalts der Gesamtzellextrakte erfolgte mit Hilfe des *DC* Protein Assay Kits (modifizierter Lowry Assay). Zunächst wurde eine Eichgerade mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellt. Dabei wurde BSA, entsprechend den Gesamtzellextrakten, in Lysispuffer gelöst. Die Durchführung des Tests erfolgte in einer 96-Well-Platte. Von den Proteinstandards und den Gesamtzellextrakten wurden je 5 μ l in ein Well pipettiert (Dreifachbestimmung) und mit 25 μ l Reagenz A (alkalische Copper-Tartrat-Lösung) versetzt. Dabei bildeten die Proteine mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex, wobei Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert wurden. Dann wurden 200 μ l Reagenz B (verdünnte Folin-Lösung) hinzugefügt. Innerhalb einer 6-minütigen Inkubation bildeten die Cu^+ -Ionen mit dem Folin-Reagenz einen instabilen blauen Komplex, der als Maß für die Proteinkonzentration diente und dessen Absorption bei 620 nm im ELISA-Reader gemessen wurde. Aus den Absorptionswerten der jeweiligen Dreifachbestimmungen wurden die Mittelwerte berechnet und mit Hilfe der durch die Standards erhaltenen Eichgerade die Proteinkonzentration im jeweiligen Zellextrakt bestimmt.

2.2.8.3 SDS-PAGE

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese), bei der ein SDS-haltiges, diskontinuierliches Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt wurde. Dabei passierten die Proteine zunächst ein Sammelgel, wo sie vor Eintritt in das eigentliche Trenngel fokussiert wurden. Entsprechend dem Molekulargewicht der nachzuweisenden Proteine wurden Trenngele mit unterschiedlichem prozentualen Gehalt an Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung verwendet (**Tab. 2.1**).

Tab. 2.1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE.

	Sammelgel	Trenngel (6 %)	Trenngel (10 %)
steriles H ₂ O _{dest}	3 ml	11 ml	8 ml
Sammelgelpuffer (4x)	1,5 ml	---	---
Trenngelpuffer (4x)	---	5 ml	5 ml
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung, 30 %	750 µl	4 ml	7 ml
TEMED	5 µl	10 µl	10 µl
10 % APS (v/v)	100 µl	100 µl	100 µl

Pro Geltasche wurden in der vorliegenden Arbeit 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Dazu wurden die Gesamtzellextrakte mit 2x Ladepuffer versetzt, dem vor Gebrauch 5 % 2-Mercaptoethanol zugefügt wurden. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Zudem wurde in einer Geltasche der Molekulargewicht-Marker Kaleidoscope mitgeführt. Die Elektrophorese wurde mit 1x SDS-Laufpuffer und unter Kühlung (4 °C) durchgeführt. Nach Anlegen eines elektrischen Gleichstromfelds (0,1 mA/cm² Gel) wanderten die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekularmasse von der Kathode zur Anode und bildeten voneinander abgegrenzte Proteinbanden.

2.2.8.4 Transfer der Proteine auf eine Membran

Die Proteine, die nach erfolgter SDS-PAGE in spezifischen Banden im Gel vorlagen, wurden nichtkovalent auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, um diese dann immunologisch zu detektieren. Der Proteintransfer wurde im Semi-Dry-Blot-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde die Anode vor dem Auflegen der 3 in Anodenpuffer getränkten Whatmanpapiere leicht mit H₂O_{dest} angefeuchtet. Auf den Whatmanpapierstapel wurden die in Anodenpuffer getränkte Nitrocellulosemembran und das Gel aufgelegt. Weitere 3 in Kathodenpuffer äquilibrierte Whatmanpapiere und die mit H₂O_{dest} befeuchtete Kathodenplatte schlossen den Aufbau ab. Wichtig war die richtige Orientierung der Nitrocellulosemembran bzw. des Gels zu den Polen. Außerdem war zu beachten, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen

Schichten befanden, da diese den Transfer gestört hätten. Der Proteintransfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 2 Stunden 45 Minuten.

2.2.8.5 Ponceau S-Färbung

Zur Überprüfung der Bloteffizienz wurde die Membran mit dem roten Farbstoff Ponceau S angefärbt. Hierfür wurde die Membran 1 Minute bei Raumtemperatur in Ponceau S-Lösung inkubiert und die überschüssige Farbe danach mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen. Der Farbstoff färbte die Proteine auf der Membran unspezifisch und reversibel an. Mit Hilfe der Banden des Molekulargewicht-Markers wurden die Bereiche der Membran, in denen sich die gewünschten Proteine befanden, ausgeschnitten.

2.2.8.6 Blocken

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 3 % BSA in TBST unter Schütteln inkubiert.

2.2.8.7 Immundetektion

Nach dem Blocken erfolgte die Proteindetektion mittels indirekter Antikörpermarkierung. Dazu wurde die Membran zunächst mit einem antigenspezifischen, unmarkierten Primärantikörper, der in 3 % BSA in TBST verdünnt war, über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert (**Kapitel 2.1.9.1**). Nichtgebundener Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST (je 10 Minuten, Raumtemperatur) unter Schütteln beseitigt. Nun wurde die Membran mit Sekundärantikörper, der in 3 % BSA in TBST verdünnt war, für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert (**Kapitel 2.1.9.2**). Sekundärantikörper, der nicht an den konstanten F_c -Teil des Primärantikörpers gebunden hatte, wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST (je 10 Minuten, Raumtemperatur) unter Schütteln beseitigt. Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, über die die spezifische Antikörper-Protein-Bindung visualisiert wurde. Hierfür wurde das ECL Western Blotting Detection Kit verwendet. Dieses Peroxidase-Substrat-System enthält u. a. Luminol, welches, katalysiert durch die Sekundärantikörper-gekoppelte HRP, oxidiert wird. Hierbei wird eine Chemilumineszenzreaktion ausgelöst, bei der Licht der Wellenlänge 425 nm emittiert wird. Dieses emittierte Licht wurde über einen Röntgenfilm gemessen. Die Signalstärke korreliert dabei positiv mit der Menge an Sekundärantikörper und somit mit der Proteinmenge.

2.2.8.8 Strippen von Western Blot Membranen

Sofern nötig, wurde spezifisch gebundener Primär- und Sekundärantikörper von der Membran entfernt (gestrippt). Dies erfolgte bei Raumtemperatur. Dazu wurde die Membran kurz mit

TBST gewaschen und schließlich zweimal für je 15 Minuten in Strippingpuffer unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten in TBST unter Schütteln gewaschen und erneut geblockt. Nun konnte mit der erneuten Antikörpermarkierung begonnen werden.

2.2.8.9 Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Quantifizierung der im Western Blot erhaltenen Proteinbanden erfolgte mit der bildanalysierenden Software ImageJ.

2.2.9 Statistik

Die deskriptive statistische Analyse erfolgte mit Excel oder SigmaPlot. In der Regel wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt, aus denen das arithmetische Mittel gebildet wurde. Dabei wurde jeder Einzelwert in gleicher Weise berücksichtigt. Zudem wurden zur weiteren Beschreibung der jeweiligen Datensets Streumaße (Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM)) angegeben, um eine Aussage über die Variabilität der Einzelwerte des jeweiligen Datensets zu machen.

Die Signifikanz der erhaltenen Daten wurde mittels zweiseitigem Student's *t*-Test mit Hilfe der Software SigmaPlot ermittelt. Dabei galten folgende Signifikanzgrenzen: Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant (*) anerkannt. Werte mit $p < 0,01$ galten als sehr signifikant (**) und Werte mit $p < 0,001$ wurden als höchst signifikant (***) definiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Strahlenbiologische Charakterisierung der verwendeten Tumorzellen

Für die nachfolgend aufgeführten Untersuchungen wurden, in unterschiedlichem Umfang, die Lungenkarzinomzelllinien A549, SK-MES-1, HTB-182, H460 und H661 sowie die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 verwendet. Diese Zelllinien sollten zunächst strahlenbiologisch charakterisiert werden. Dazu wurden Koloniebildungstests durchgeführt, bei denen das klonogene Überleben der Zellen nach ionisierender Strahlung untersucht wurde. Als klonogen bezeichnet man Zellen, die das Potenzial haben, auch nach Strahlenexposition noch mehrere Zellteilungen (mindestens 5 bis 6) zu durchlaufen und dabei Kolonien von mindestens 50 Tochterzellen zu bilden.

3.1.1 Intrinsische Strahlensensitivität und Koloniebildungseffizienz der Tumorzellen

Zur Untersuchung der genetisch determinierten Strahlensensitivität mittels Koloniebildungstest wurden A549, SK-MES-1, HTB-182, H460, H661 und MDA-MB-231 Zellen in Einzelzellsuspensionen ausgesät, die 24 Stunden später mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert wurden. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Für jede Zelllinie wurde die PE nach Bestrahlung mit definierten Energiedosen ermittelt und anhand dieser die SF bestimmt, welche dann in sogenannten Dosis-Wirkungskurven dargestellt wurden. Zur Einschätzung der intrinsischen Strahlensensitivität wurde der D_{37} -Wert (Strahlendosis, bei der die SF 37 % beträgt) angegeben.

Tab. 3.1: D_{37} -Werte und $PE_{0\text{Gy}}$ der verwendeten Tumorzellen. Angegeben sind die D_{37} -Werte sowie die mittleren $PE_{0\text{Gy}} \pm \text{SD}$ aus 36 Datenpunkten von 6 biologischen Replikaten in SK-MES-1 und HTB-182, 30 Datenpunkten von 5 biologischen Replikaten in H460, 21 Datenpunkten von 5 biologischen Replikaten in A549, 24 Datenpunkten von 4 biologischen Replikaten in MDA-MB-231 und 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten in H661.

	D_{37} (Gy)	$PE_{0\text{Gy}} \pm \text{SD}$ (%)
H661	3,25	16,19 \pm 2,46
SK-MES-1	3,25	33,11 \pm 8,61
A549	3,00	51,74 \pm 8,06
H460	2,75	89,60 \pm 12,77
HTB-182	2,40	39,30 \pm 14,69
MDA-MB-231	2,10	40,22 \pm 5,45

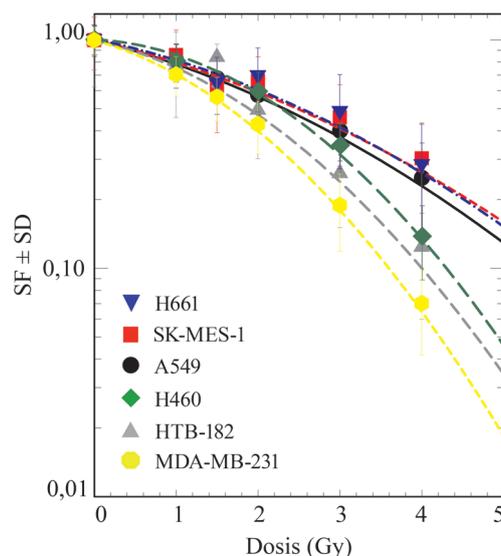


Abb. 3.1: Intrinsische Strahlensensitivität der Tumorzellen nach ionisierender Strahlung. Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren $SF \pm SD$ aus 36 Datenpunkten von 6 biologischen Replikaten in SK-MES-1 und HTB-182, 30 Datenpunkten von 5 biologischen Replikaten in H460, 21 Datenpunkten von 5 biologischen Replikaten in A549, 24 Datenpunkten von 4 biologischen Replikaten in MDA-MB-231 und 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten in H661.

Wie die Dosis-Wirkungskurven in **Abb. 3.1** erkennen lassen, weisen die verwendeten Zelllinien unterschiedliche intrinsische Strahlensensitivitäten auf. Die D_{37} -Werte in **Tab. 3.1** zeigen, dass H661 (D_{37} : 3,25 Gy), SK-MES-1 (D_{37} : 3,25 Gy) und A549 Zellen (D_{37} : 3,00 Gy) strahlenresistenter sind als H460 (D_{37} : 2,75 Gy), HTB-182 (D_{37} : 2,40 Gy) und MDA-MB-231 Zellen (D_{37} : 2,10 Gy). Zudem besitzen die verwendeten Zelllinien unterschiedliche PE (**Tab. 3.1**). Eine PE von 89,60 %, 51,74 % bzw. 40,22 % qualifizierte H460, A549 bzw. MDA-MB-231 Zellen für eine unkomplizierte Durchführung vieler Experimente. Die Durchführung einiger Experimente war lediglich mit Zellen, die eine gute PE aufweisen, möglich. Zellen mit einer schlechten PE disqualifizierten sich hierfür.

3.2 Molekulares Targeting einzelner Komponenten des PI3K/Akt-Signalwegs moduliert die Strahlenempfindlichkeit der Tumorzellen

Verschiedene Studien belegen, dass durch molekulare Targeting Strategien, die gegen Komponenten der EGFR-vermittelten PI3K/Akt-Signalkaskade gerichtet sind, die Radiotoxizität der Strahlentherapie in Tumorzellen verbessert werden konnte (Dittmann *et al.*, 2005a; Dittmann *et al.*, 2005b; Toulany *et al.*, 2006; Toulany *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010). Hierbei korrelierte der radiosensitivierende Effekt oftmals mit einer Unterdrückung der Kapazität dieser Tumorzellen für die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden, die hauptsächlich über das NHEJ erfolgt (Toulany *et al.*, 2010; Toulany, 2013). Dies hatte schließlich den reproduktiven Zelltod zur Folge (Forrester *et al.*, 1999). Im Kontext dieser Beobachtungen wurden Versuche durchgeführt, bei denen sowohl die PI3K als auch deren Effektor Akt gehemmt wurde.

3.2.1 Die Rolle der PI3K für die Strahlenantwort der Tumorzellen und die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden

Die vorliegende Arbeit widmet sich zunächst der Frage, welche Rolle die PI3K für die Strahlenantwort von Tumorzellen spielt und inwieweit die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB durch diese Kinase beeinflusst wird. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der selektive PI3K-Inhibitor LY294002 eingesetzt.

3.2.1.1 Einfluss einer PI3K-Hemmung durch LY294002 auf das klonogene Überleben

Um zu untersuchen, welche Rolle die PI3K für das klonogene Überleben von Tumorzellen spielt, wurden in den Lungenkarzinomzelllinien A549, HTB-182, SK-MES-1 und H460 sowie in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 Koloniebildungstests unter Gabe des PI3K-Inhibitors LY294002 durchgeführt. Hierzu wurden Einzelzellkulturen ausgesät, die 24 Stunden später mit 10 μ M LY294002 behandelt wurden. DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. 3 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung von LY294002 wurde der DMF angegeben.

Wie in **Abb. 3.2** gezeigt, wirken 10 μ M LY294002 auf die NSCLC-Zellen A549 (DMF: 1,71), HTB-182 (DMF: 1,84) und H460 (DMF: 1,15) sowie auf die Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 (DMF: 1,10) signifikant strahlensensitivierend, während LY294002 in dieser Konzentration auf die NSCLC-Zellen SK-MES-1 (DMF: 1,00) keinen strahlensensitivierenden Effekt hat.

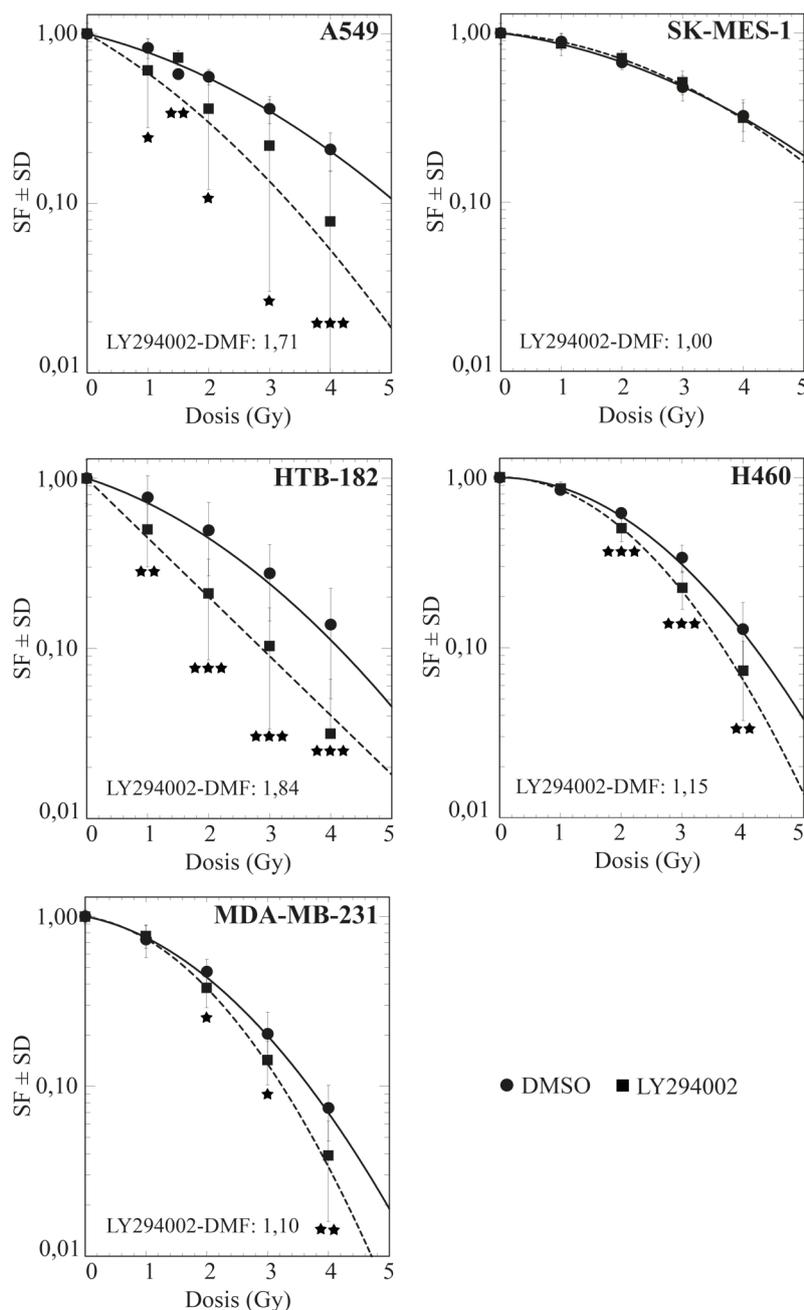


Abb. 3.2: Klonogenes Überleben der Tumorzellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit dem PI3K-Inhibitor LY294002. Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren SF ± SD aus 18 Datenpunkten von 3 biologischen Replikaten in HTB-182 und SK-MES-1 sowie 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten in A549, H460 und MDA-MB-231. Die Signifikanz des Effekts zwischen DMSO- und LY294002-behandelten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Möglicherweise wurde die LY294002-Konzentration in SK-MES-1-Zellen zu niedrig gewählt, um eine strahlensensitivierende Wirkung hervorzurufen. Um zu überprüfen, ob SK-MES-1 Zellen mit einer höheren LY294002-Konzentration gegenüber ionisierender Strahlung sensitiviert werden können, wurde ein Koloniebildungstest in abgewandelter Form durchgeführt. Hierzu wurden Einzelzellkulturen ausgesät, die 24 Stunden später mit unterschiedlichen LY294002-Konzentrationen von 0 μM bis 25 μM behandelt wurden. 3 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit 0 Gy bzw. 3 Gy bestrahlt und mehrere

Tage im Brutschrank inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt.

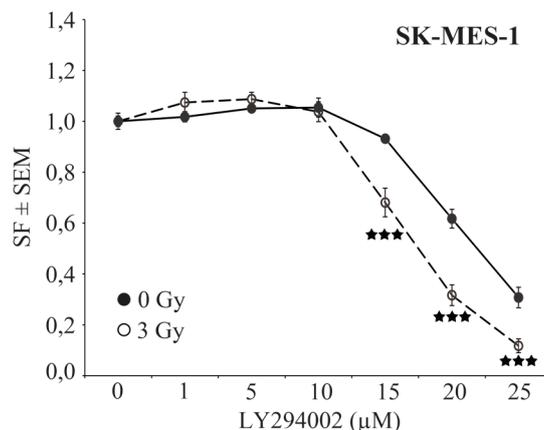


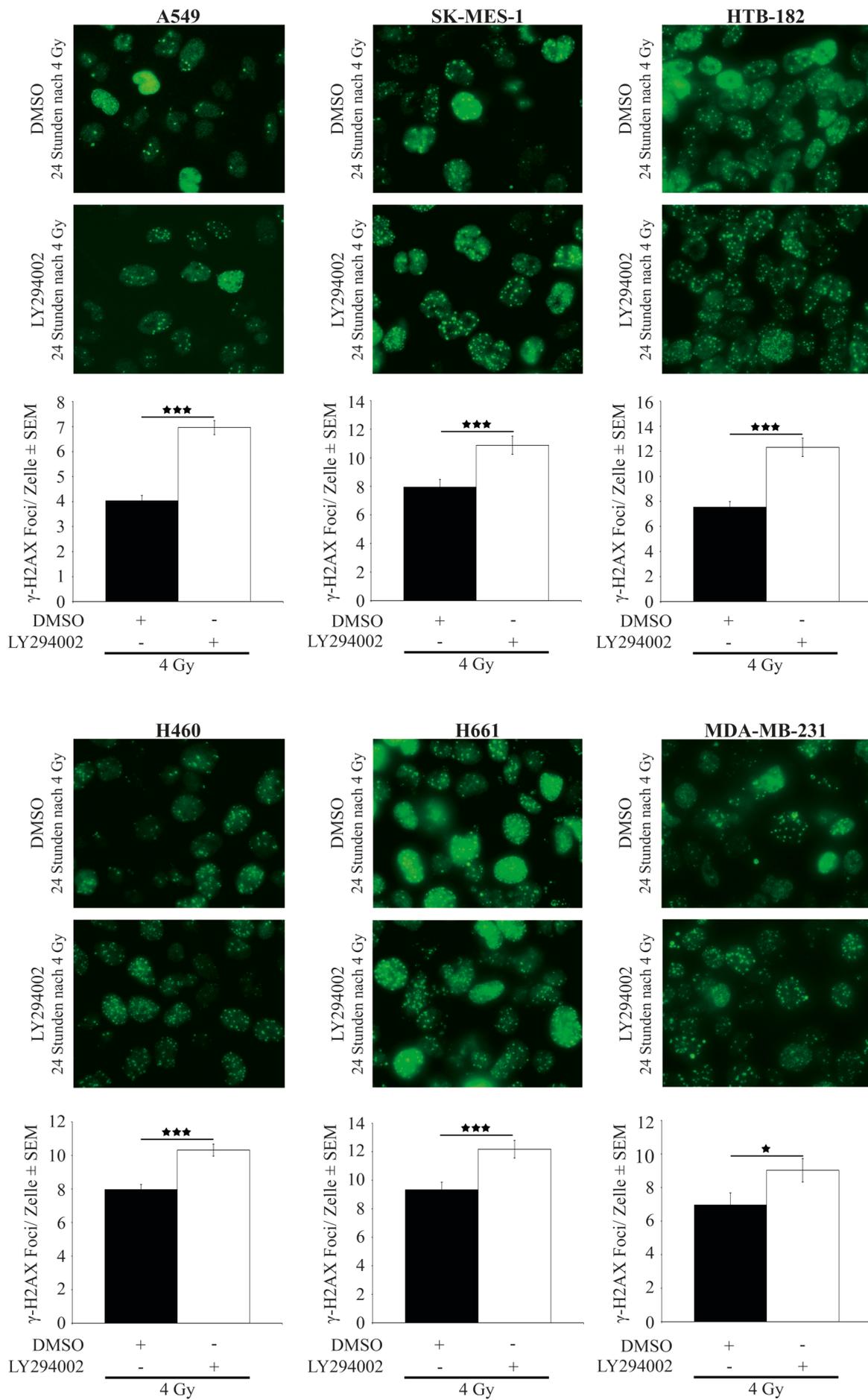
Abb. 3.3: Klonogenes Überleben der SK-MES-1 Zellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen des PI3K-Inhibitors LY294002. Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren SF ± SEM aus 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten. Die Signifikanz des Effekts zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (***, $P < 0,001$).

Es wird deutlich, dass 10 µM LY294002 in SK-MES-1 Zellen, im Gegensatz zu A549, HTB-182, H460 und MDA-MB-231 Zellen (**Abb. 3.2**), zwar keine strahlensensitivierende Wirkung haben, jedoch kann mit höheren LY294002-Konzentrationen (15 µM, 20 µM, 25 µM) sehr wohl die Radiotoxizität der Strahlentherapie verstärkt werden (**Abb. 3.3**).

3.2.1.2 Einfluss einer PI3K-Hemmung durch LY294002 auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

Um zu untersuchen, welche Rolle die PI3K für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB spielt, wurden in den NSCLC-Zelllinien A549, HTB-182, SK-MES-1, H460 und H661 sowie in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 γ -H2AX Focus Assays unter Gabe des PI3K-Inhibitors LY294002 durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in Culture Slides ausgesät. Konfluente Kulturen wurden mit 10 µM LY294002 behandelt, wobei DMSO-behandelte Zellen als Kontrolle dienten. 3 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

Abb. 3.4: Residuelle DNA-DSB in Tumorzellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit dem PI3K-Inhibitor LY294002. Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen und die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert ± SEM aus 450 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 3 biologischen Replikaten in A549, 210 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten in SK-MES-1, 190 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten in HTB-182, 600 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 4 biologischen Replikaten in H460, 280 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 3 biologischen Replikaten in H661 und 100 ausgezählten Zellkernen/Bedingung in MDA-MB-231 entspricht. Die Signifikanz des Effekts zwischen DMSO- und LY294002-behandelten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$).



Wie **Abb. 3.4** zeigt, verursacht LY294002 in allen getesteten Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung eine signifikante Erhöhung der residuellen DNA-DSB.

3.2.2 Die Rolle von Akt für die Strahlenantwort der Tumorzellen und die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden

Als nächstes wurde die Rolle und Bedeutung des PI3K-Effektors Akt für die Transduktion strahleninduzierter Signale und die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB untersucht. Dabei kam zum einen der allosterische panAkt-Inhibitor MK2206 zum Einsatz; MK2206 hemmt alle Akt-Isoformen (IC_{50} von Akt1/2/3: 8 nM/12 nM/65 nM) (www.selleckchem.com). Zum anderen wurden auch siRNA- und shRNA-Analysen durchgeführt, um so unspezifische Off-Target-Effekte des Inhibitors auszuschließen und zudem die Rolle der einzelnen Akt-Isoformen näher zu betrachten.

3.2.2.1 Einfluss einer Akt-Hemmung durch MK2206 auf das klonogene Überleben

Um zunächst zu untersuchen, welche Rolle Akt für das klonogene Überleben der Tumorzellen spielt, wurden in den Lungenkarzinomzelllinien A549 und H460 Koloniebildungstests unter Gabe des panAkt-Inhibitors MK2206 durchgeführt. Hierzu wurden Einzelzellkulturen ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurden A549 Zellen mit 5 μ M und H460 Zellen mit 2,5 μ M MK2206 behandelt. DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. 3 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung von MK2206 wurde der DMF angegeben.

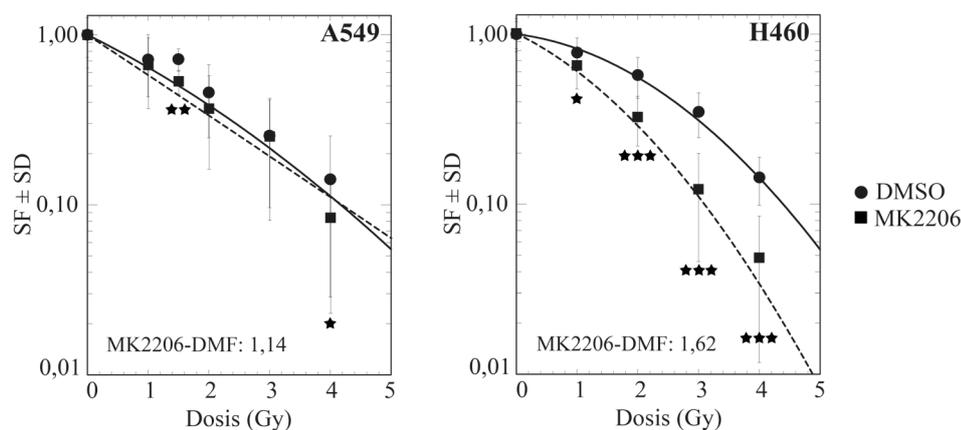


Abb. 3.5: Klonogenes Überleben der A549 und H460 Zellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit dem panAkt-Inhibitor MK2206. Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren SF \pm SD aus 24 Datenpunkten von 4 biologischen Replikaten in A549 und 18 Datenpunkten von 3 biologischen Replikaten in H460. Die Signifikanz des Effekts zwischen DMSO- und MK2206-behandelten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

In **Abb. 3.5** wird ersichtlich, dass MK2206 nach Bestrahlung mit 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy in H460 Zellen eine signifikante Strahlensensitivierung (DMF: 1,62) induziert, wohingegen MK2206 auf A549 Zellen lediglich nach Bestrahlung mit 1,5 Gy bzw. 4 Gy signifikant strahlensensitivierend wirkt (DMF: 1,14).

Um zu überprüfen, ob mit einer höheren MK2206-Konzentration die Radiotoxizität der Strahlentherapie in A549 Zellen erhöht werden kann, wurde ein Koloniebildungstest in abgewandelter Form durchgeführt. Hierzu wurden Einzelzellkulturen ausgesät, die 24 Stunden später mit unterschiedlichen MK2206-Konzentrationen von 0 μM bis 15 μM behandelt wurden. 3 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit 0 Gy bzw. 3 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt.

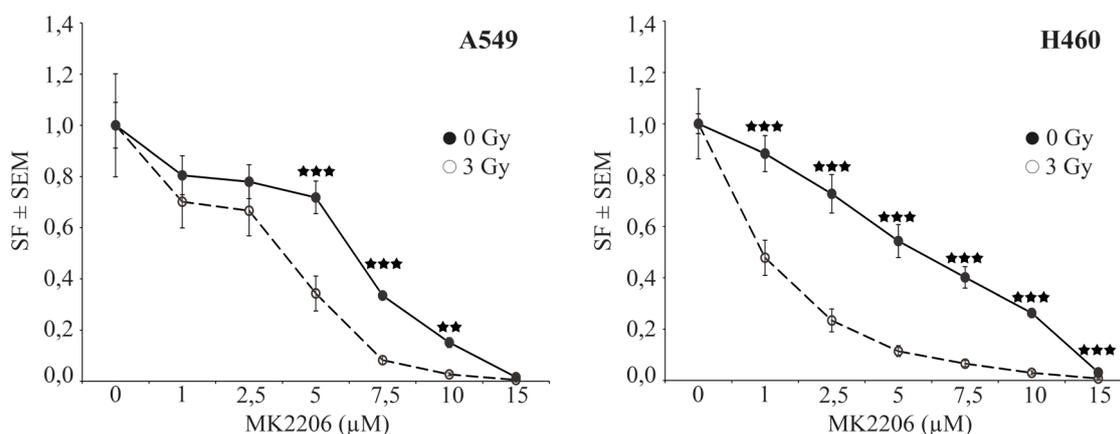


Abb. 3.6: Klonogenes Überleben der A549 und H460 Zellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen des panAkt-Inhibitors MK2206. Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren SF \pm SEM aus 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten. Die Signifikanz des Effekts zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

H460 Zellen lassen sich mit MK2206 besser gegenüber ionisierender Strahlung sensitivieren als A549 Zellen (**Abb. 3.6**). Bereits 1 μM MK2206 wirkt auf H460 Zellen signifikant strahlensensitivierend. Um einen signifikanten strahlensensitivierenden Effekt in A549 Zellen zu erzielen, sind deutlich höhere MK2206-Konzentrationen ab 5 μM nötig.

3.2.2.2 Einfluss einer Akt-Hemmung durch MK2206 auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

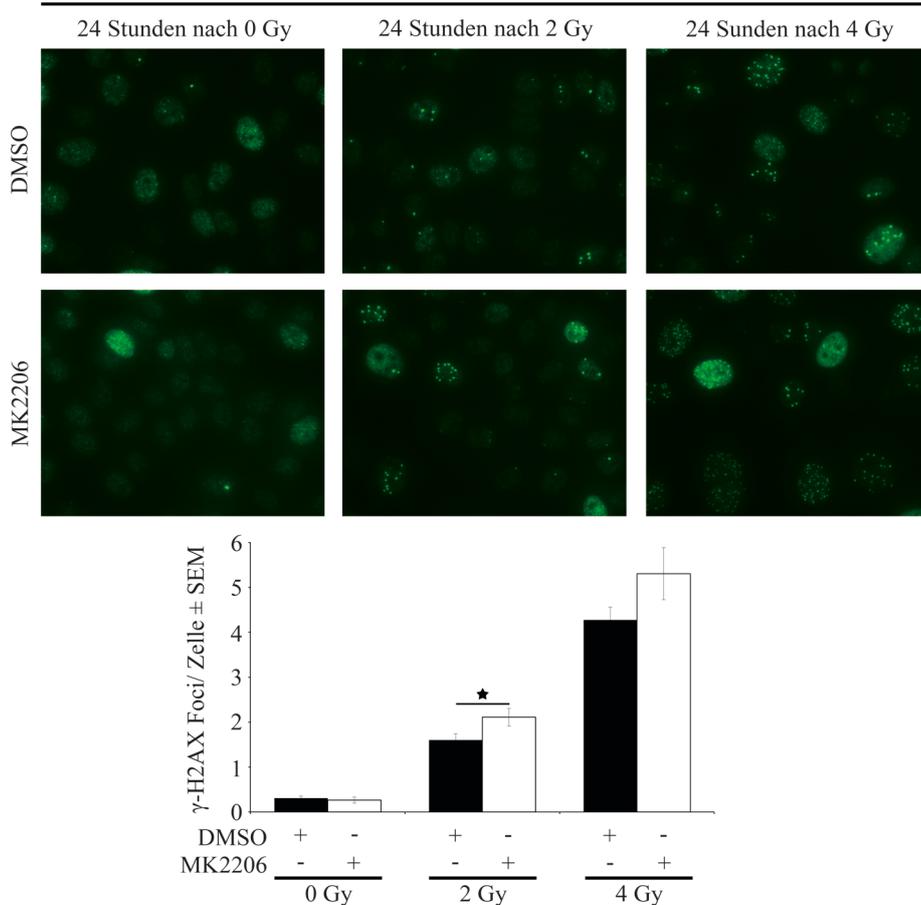
Um zu untersuchen, welche Rolle Akt für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB spielt, wurden in den Lungenkarzinomzelllinien A549 und H460 γ -H2AX Focus Assays unter Gabe des panAkt-Inhibitors MK2206 durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in Culture Slides ausgesät. Konfluente A549 Zellen wurden mit 5 μM und H460 Zellen wurden mit 2,5 μM

MK2206 behandelt. 3 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit 0 Gy, 2 Gy und 4 Gy bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

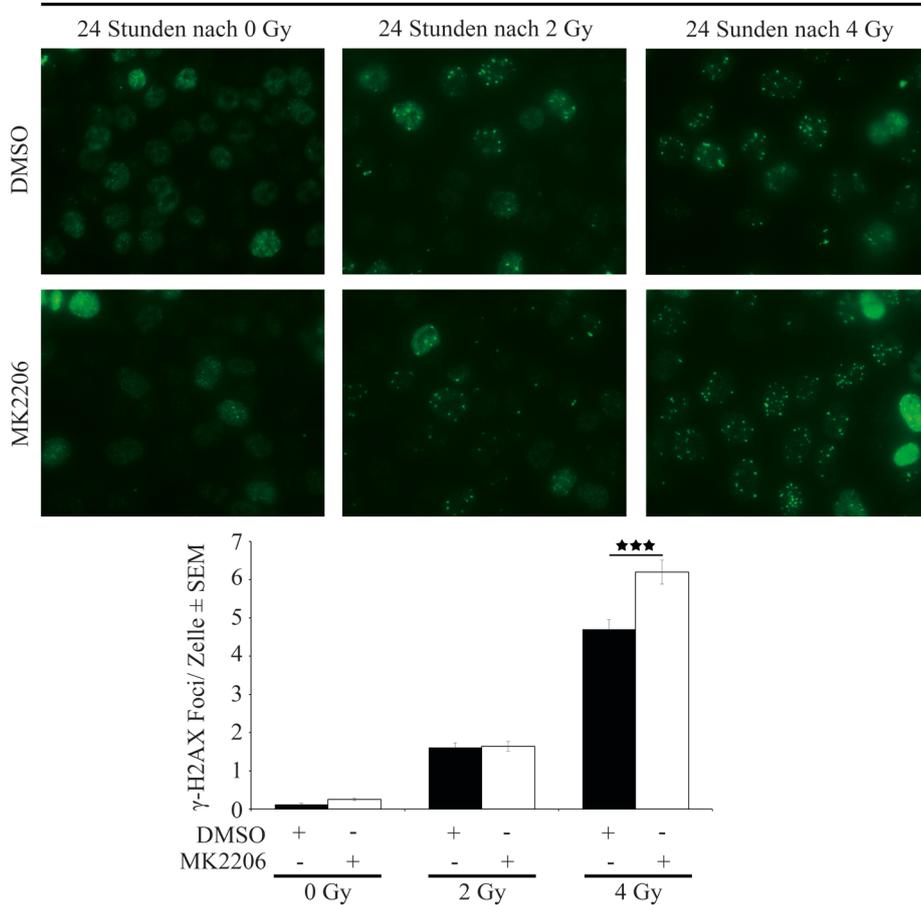
Wie in **Abb. 3.7** dargestellt, verursacht MK2206 in A549 Zellen eine signifikante Erhöhung der residuellen DNA-DSB 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy. 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy ist in MK2206-behandelten Zellen ebenfalls ein höherer DNA-Restschaden als in DMSO-behandelten A549 Zellen zu verzeichnen, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. H460 Zellen verhalten sich bezüglich der DNA-Schadensreparatur nach Strahlenexposition tendenziell ähnlich wie A549 Zellen. In MK2206-behandelten H460 Zellen sind 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy signifikant mehr unreparierte DSB zu verzeichnen als in Kontrollzellen. 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy ist zwischen DMSO- und MK2206-behandelten Zellen keine nennenswerte Veränderung in der Anzahl der residuellen DNA-DSB zu beobachten.

Abb. 3.7: Residuelle DNA-DSB in A549 und H460 Zellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit dem panAkt-Inhibitor MK2206. Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen und die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 300 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten entspricht. Die Signifikanz des Effekts zwischen DMSO- und MK2206-behandelten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$).

A549



H460



3.2.2.3 Einfluss einer Akt1-Herunterregulation auf das klonogene Überleben

3.2.2.3.1 Akt1-Herunterregulation durch siRNA

Als nächstes sollte zwischen den einzelnen Akt-Isoformen differenziert werden. Eine Methode, um die Rolle der Akt-Isoform Akt1 für das klonogene Überleben von A549 Zellen zu untersuchen, stellte die temporäre Hemmung der Akt1-Proteinexpression mittels siRNA-Transfektion und anschließendem Koloniebildungstest dar. Für die Transfektion wurden A549 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. 24 Stunden später, als die Zellen 80 % konfluent waren, wurden 50 nM siRNA gegen AKT1 sowie non-targeting siRNA zu Kontrollzwecken mit Hilfe von LipofectamineTM 2000 in die Zellen eingeschleust. Um die Knockdown-Effizienz zu überprüfen, wurden 2 Tage und 3 Tage nach der Transfektion Gesamtzellextrakte hergestellt, welche mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden. Parallel dazu wurden Koloniebildungstests durchgeführt, bei denen der Ablauf im Vergleich zu bisher durchgeführten Tests variierte. Für üblicherweise durchgeführte Koloniebildungstests („24 Std. vor Bestrahlung“) wurden die Zellen 2 Tage nach der Transfektion abtrypsinisiert, ausgesät, 24 Stunden später mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Alternativ dazu wurden Zellen 2 Tage nach der Transfektion zuerst mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy, 2 Gy und 4 Gy bestrahlt und schließlich 2 Stunden („2 Std. nach Bestrahlung“) oder 24 Stunden („24 Std. nach Bestrahlung“) später abtrypsinisiert, ausgesät und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung des temporären AKT1-Knockdowns wurde der DMF angegeben.

Die temporäre Hemmung der Akt1-Proteinexpression ist in **Abb. 3.8A** dargestellt. Eine Knockdown-Effizienz von 69 % 2 Tage nach Transfektion bzw. 58 % 3 Tage nach Transfektion gilt als äußerst erfolgreich. Ein AKT1-Knockdown führt in A549 Zellen zu einer signifikanten Strahlensensitivierung, wie an den DMF in **Abb. 3.8B** ersichtlich ist.

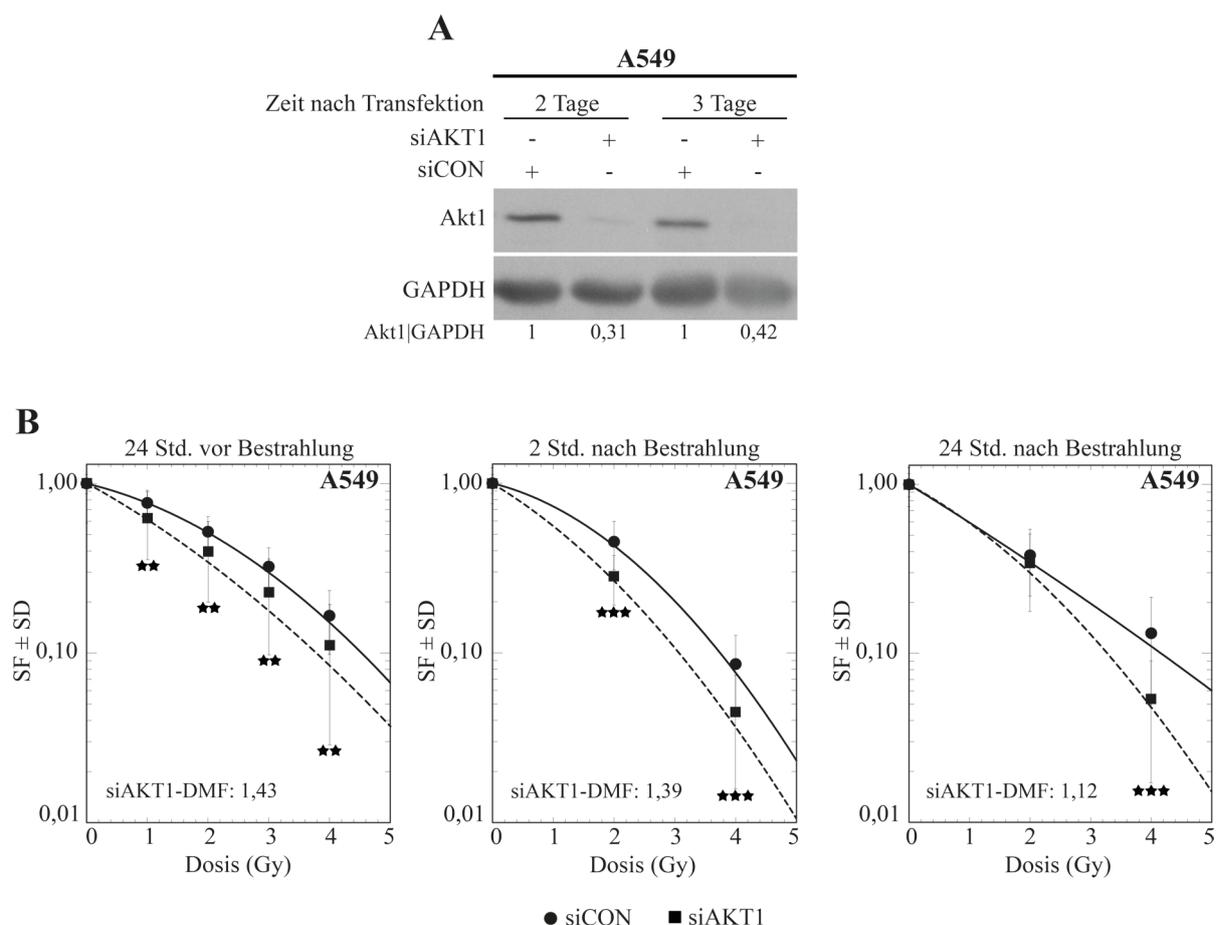


Abb. 3.8: Klonogenes Überleben der A549 Zellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einem temporären AKT1-Knockdown. (A) Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert des Quotienten aus Akt1 und GAPDH von 5 (2 Tage nach Transfektion) bzw. 2 (3 Tage nach Transfektion) biologischen Replikaten, normiert auf 1 in Kontrollzellen. (B) Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren SF \pm SD aus 33 Datenpunkten von 6 biologischen Replikaten („24 Std. vor Bestrahlung“) und 24 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten („2 Std. bzw. 24 Std. nach Bestrahlung“). Die Signifikanz des Effekts zwischen siCON- und siAKT1-transfizierten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

3.2.2.3.2 Akt1-Herunterregulation durch shRNA

Zusätzlich zu den Versuchen mit temporärer Hemmung der Akt1-Proteinexpression durch Transfektion mit siRNA wurden Versuche mit MDA-MB-231 Zellen durchgeführt, in denen die Akt1-Proteinexpression stabil unterdrückt ist. Diese Zelllinie wurde ursprünglich mit dem leeren lentiviralen pLKO-1 Vektor als Kontrolle (shSCR) bzw. mit dem pLKO-1 Vektor, der ein shRNA-Insert gegen AKT1 enthält (shAKT1), transfiziert. Letztgenannte Zellen besitzen daher eine stabil reduzierte Akt1-Proteinexpression. Die siRNA-Ergebnisse der Koloniebildungstests (**Abb. 3.8**) sollten auf diese Weise verifiziert werden. Hierzu wurden Einzelzellkulturen ausgesät, die 24 Stunden später mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert wurden. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der

Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung des stabilen AKT1-Knockdowns wurde der DMF angegeben. Um die Knockdown-Effizienz zu überprüfen, wurden zudem Gesamtzellextrakte hergestellt, welche mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden.

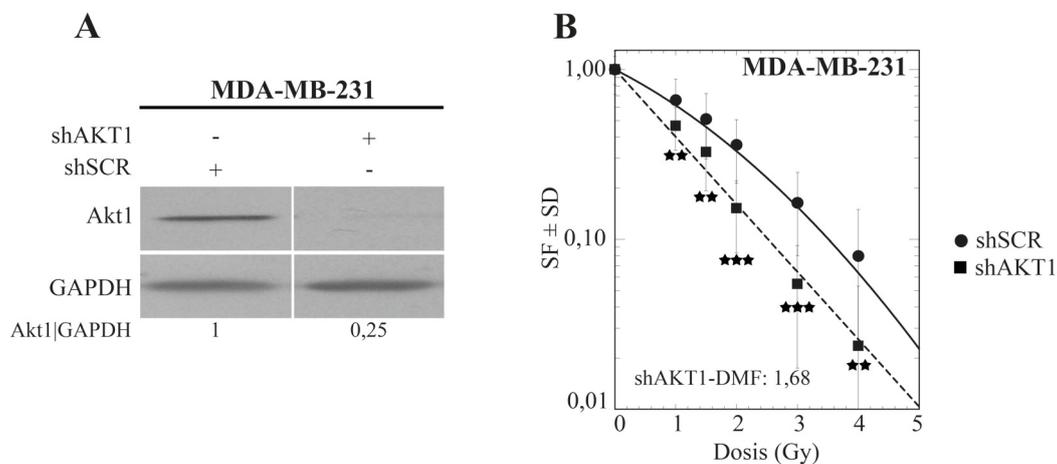


Abb. 3.9: Klonogenes Überleben der MDA-MB-231 Zellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einem stabilen AKT1-Knockdown. (A) Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert des Quotienten aus Akt1 und GAPDH von 2 biologischen Replikaten, normiert auf 1 in Kontrollzellen. (B) Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren SF ± SD aus 18 Datenpunkten von 3 biologischen Replikaten. Die Signifikanz des Effekts zwischen shSCR- und shAKT1-transfizierten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Wie **Abb. 3.9A** zeigt, wird die Akt1-Proteinexpression in stabil transfizierten MDA-MB-231 Zellen zu 75 % gehemmt. Ebenso wie in den zuvor gezeigten siRNA-Experimenten (**Abb. 3.8**) führt auch ein stabiler AKT1-Knockdown zu einer signifikanten Strahlensensitivierung (**Abb. 3.9B**). Der DMF liegt bei 1,68.

3.2.2.4 Einfluss einer Akt1-Herunterregulation auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

3.2.2.4.1 Akt1-Herunterregulation durch siRNA

Um zu untersuchen, welche Rolle die Akt-Isoform Akt1 für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB spielt, wurden in den Lungenkarzinomzelllinien A549 γ -H2AX Focus Assays unter temporärer Hemmung der Akt1-Proteinexpression durchgeführt. Hierzu wurden A549 Zellen in Culture Slides ausgesät und 24 Stunden später, als die Zellen 80 % konfluent waren, wurden sie mit 50 nM siRNA gegen AKT1 sowie mit non-targeting siRNA zu Kontrollzwecken transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0 Gy und 4 Gy bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

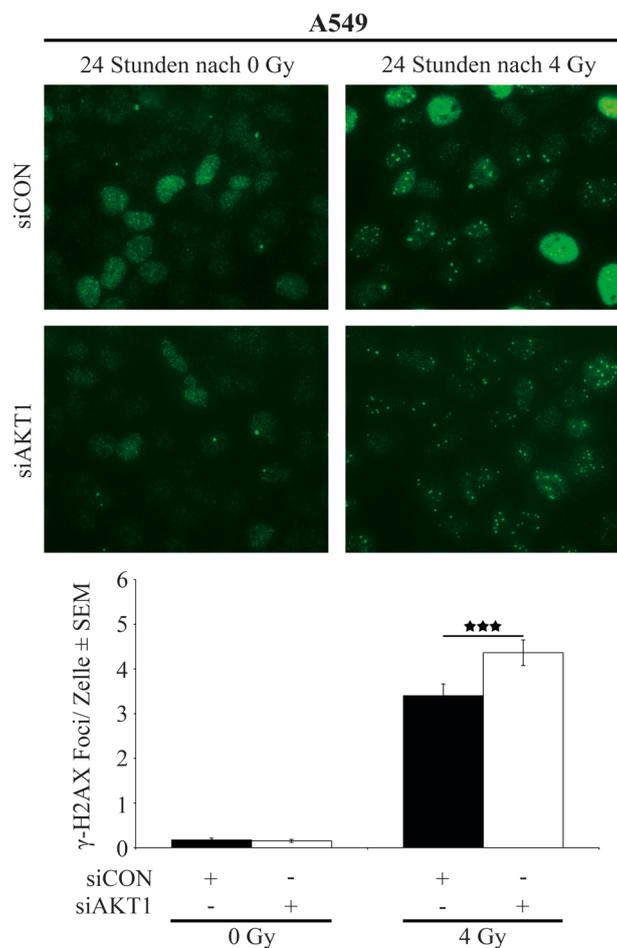


Abb. 3.10: Residuelle DNA-DSB in A549 Zellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einem temporären AKT1-Knockdown. Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen und die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 800 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 4 biologischen Replikaten entspricht. Die Signifikanz des Effekts zwischen siCON- und siAKT1-transfizierten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (***, $P < 0,001$).

Wie **Abb. 3.10** zeigt, ergibt sich nach temporärer Hemmung der Akt1-Proteinexpression 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy ein signifikant höherer DNA-Restschaden im Vergleich zu Kontrollzellen.

3.2.2.4.2 Akt1-Herunterregulation durch shRNA

Zur Verifizierung der siRNA-Ergebnisse des γ -H2AX Focus Assays (**Abb. 3.10**), in denen die Rolle von Akt1 für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB in A549 Zellen untersucht wurde, wurden nun Versuche mit stabil transfizierten MDA-MB-231 AKT1-Knockdown Zellen durchgeführt. Zellen mit shSCR dienten als Kontrolle. Hierzu wurden Knockdown-Zellen mit 0 Gy, 2 Gy und 4 Gy bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

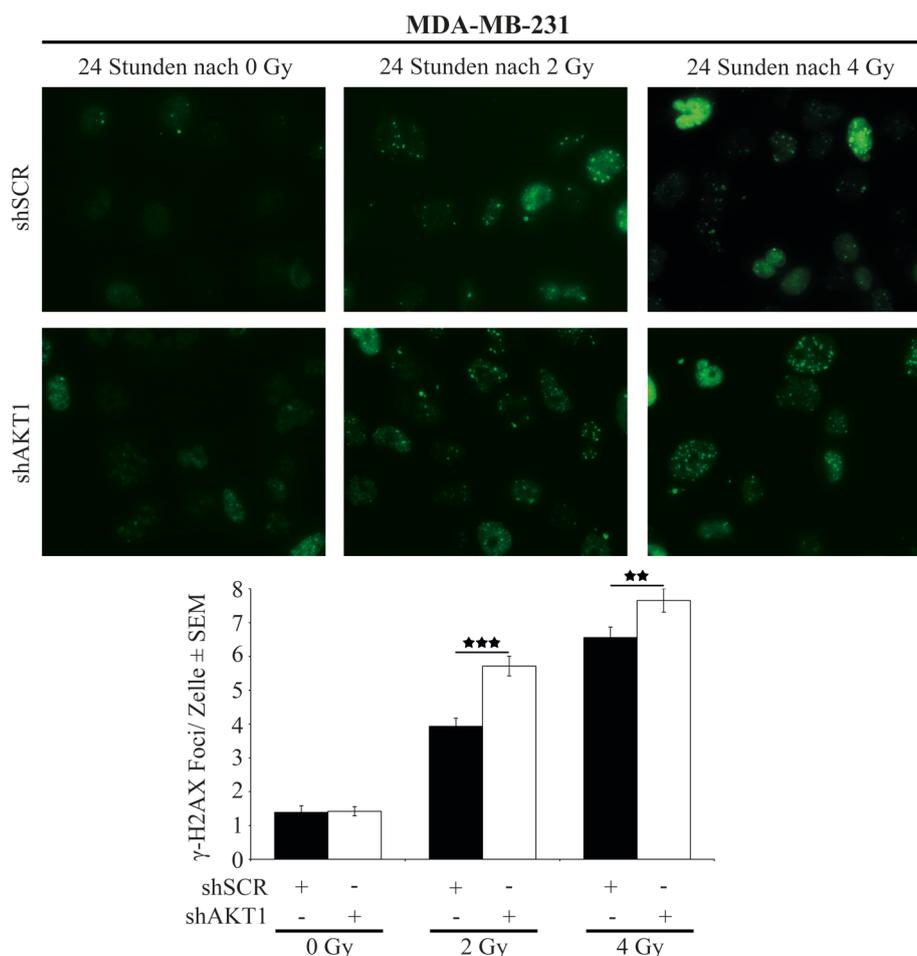


Abb. 3.11: Residuelle DNA-DSB in MDA-MB-231 Zellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einem stabilen AKT1-Knockdown. Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen und die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 333 bis 400 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 3 biologischen Replikaten entspricht. Die Signifikanz des Effekts zwischen shSCR- und shAKT1-transfizierten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

In Übereinstimmung mit den siRNA-Ergebnissen (Abb. 3.10) ergibt sich auch nach stabilem AKT1-Knockdown 24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy bzw. 4 Gy ein signifikant höherer DNA-Restschaden im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 3.11).

3.2.2.5 Einfluss einer Akt3-Herunterregulation durch siRNA auf das klonogene Überleben

Um zu untersuchen, welche Rolle die Akt-Isoform Akt3 für das klonogene Überleben von A549 Zellen spielt, wurden Koloniebildungstests unter temporärer Hemmung der Akt3-Proteinexpression durchgeführt. Hierzu wurden A549 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, die 24 Stunden später bei einer Dichte von 80 % mit 50 nM siRNA gegen AKT3 sowie non-targeting siRNA zu Kontrollzwecken transfiziert wurden. Um die Knockdown-Effizienz zu überprüfen, wurden 2 Tage und 3 Tage nach der Transfektion Gesamtzellextrakte hergestellt,

welche dann mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden. Parallel dazu wurden Koloniebildungstests („24 Std. vor Bestrahlung“, „2 Std. nach Bestrahlung“, „24 Std. nach Bestrahlung“) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 2 Tage nach der Transfektion abtrypsiniert, ausgesät und 24 Stunden später mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt bzw. zuerst mit 0 Gy, 2 Gy und 4 Gy bestrahlt und dann 2 Stunden bzw. 24 Stunden später ausgesät. Nach einer mehrtägigen Inkubation im Brutschrank wurden die gebildeten Kolonien gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung des temporären AKT3-Knockdowns wurde der DMF angegeben.

Im Western Blot (**Abb. 3.12A**) wird ersichtlich, dass nach Transfektion mit siAKT3 die Akt3-Proteinexpression um 28 % (2 Tage nach Transfektion) bzw. 36 % (3 Tage nach Transfektion) gehemmt wird. Außerdem wird deutlich, dass die siRNA gegen AKT3 sehr spezifisch ist; die Proteinexpression von Akt1 und Akt2 bleibt nach siAKT3-Transfektion unberührt. Die Dosis-Wirkungskurven sowie die angegebenen DMF (**Abb. 3.12B**) zeigen, dass die temporäre Hemmung der Akt3-Proteinexpression zu einer signifikanten Strahlensensitivierung von A549 Zellen führt.

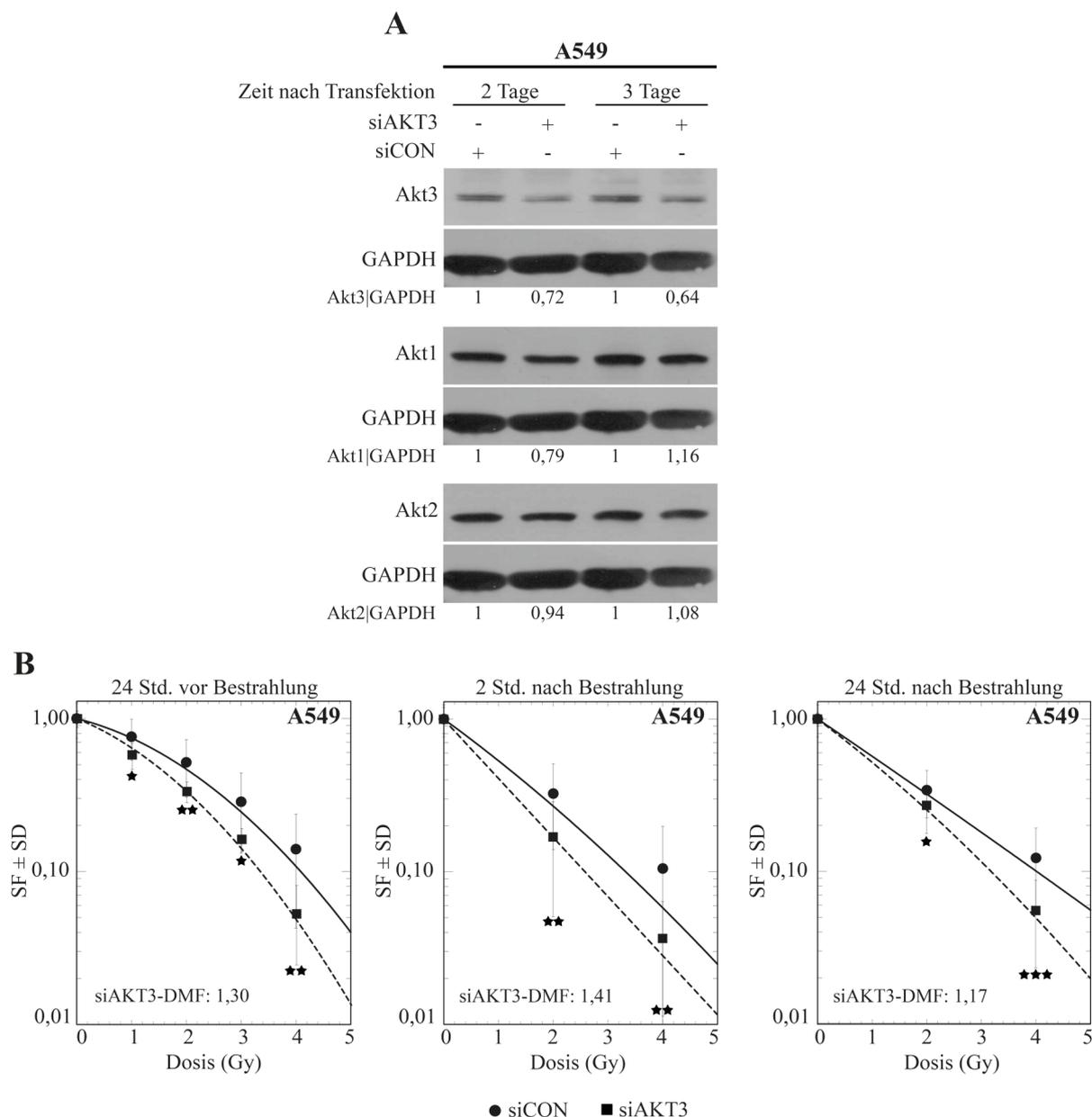


Abb. 3.12: Klonogenes Überleben der A549 Zellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einem temporären AKT3-Knockdown. (A) Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert des Quotienten aus den spezifischen Akt-Isoformen und GAPDH von 2 biologischen Replikaten, normiert auf 1 in Kontrollzellen. (B) Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren SF \pm SD aus 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten („24 Std. vor Bestrahlung“) und 24 Datenpunkten aus 2 biologischen Replikaten („2 Std. bzw. 24 Std. nach Bestrahlung“). Die Signifikanz des Effekts zwischen siCON- und siAKT3-transfizierten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

3.2.2.6 Einfluss einer Akt3-Herunterregulation durch siRNA auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

Um zu untersuchen, welche Rolle die Akt-Isoform Akt3 für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB spielt, wurden in der NSCLC-Zelllinie A549 γ -H2AX Focus Assays unter temporärer Hemmung der Akt3-Proteinexpression durchgeführt. Hierzu wurden A549 Zellen in Culture Slides ausgesät, die 24 Stunden später bei einer Konfluenz von 80 % mit 50 nM siAKT3 sowie mit non-targeting siRNA zu Kontrollzwecken transfiziert wurden. 72 Stunden

nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0 Gy und 4 Gy bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

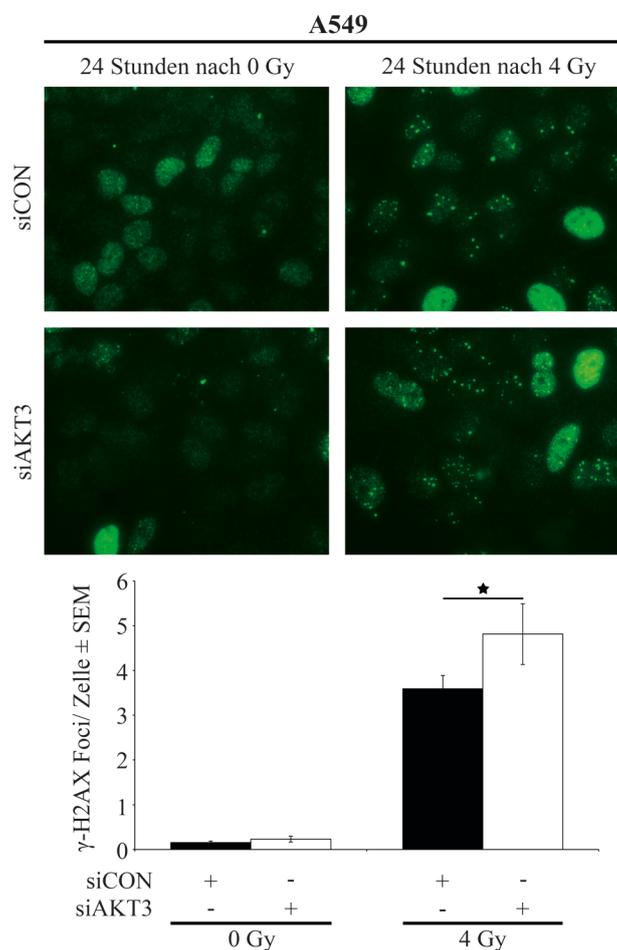


Abb. 3.13: Residuelle DNA-DSB in A549 Zellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einem temporären AKT3-Knockdown. Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen und die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 400 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten entspricht. Die Signifikanz des Effekts zwischen siCON- und siAKT3-transfizierten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$).

In **Abb. 3.13** wird ersichtlich, dass 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy in A549 Zellen, die mit siRNA gegen AKT3 transfiziert wurden, signifikant mehr residuelle DNA-DSB vorhanden sind als in Zellen, die mit siCON transfiziert wurden.

3.2.2.7 Einfluss einer Akt2-Herunterregulation durch siRNA auf das klonogene Überleben

Dass die Akt-Isoformen Akt1 und Akt3 für das klonogene Überleben von A549 Zellen eine wichtige Rolle spielen, wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt (**Abb. 3.8B**, **Abb. 3.12B**). Um zu untersuchen, welche Rolle die Akt-Isoform Akt2 für das klonogene

Überleben von A549 Zellen spielt, wurden Koloniebildungstests unter temporärer Hemmung der Akt2-Proteinexpression durchgeführt. Hierzu wurden A549 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, die 24 Stunden später bei einer Dichte von 80 % mit 50 nM siRNA gegen AKT2 sowie mit non-targeting siRNA zu Kontrollzwecken transfiziert wurden. Um die Knockdown-Effizienz zu überprüfen, wurden 2 Tage und 3 Tage nach der Transfektion Gesamtzellextrakte hergestellt, welche mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden. Parallel dazu wurden Koloniebildungstest („24 Std. vor Bestrahlung“, „2 Std. nach Bestrahlung“, „24 Std. nach Bestrahlung“) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 2 Tage nach der Transfektion abtrypsiniert, ausgesät und 24 Stunden später mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt bzw. zuerst mit 0 Gy, 2 Gy und 4 Gy bestrahlt und dann 2 Stunden bzw. 24 Stunden später ausgesät. Nach einer mehrtägigen Inkubation im Brutschrank wurden die gebildeten Kolonien gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung des temporären AKT2-Knockdowns wurde der DMF angegeben.

Die erfolgreiche Hemmung der Akt2-Proteinexpression ist in **Abb. 3.14A** dargestellt. Die Reduktion im Akt2-Proteinlevel beträgt 2 Tage nach Transfektion 86 % und 3 Tage nach Transfektion 82 %. Da im Western Blot nach Transfektion mit siRNA gegen AKT2 keine nennenswerte Veränderung im Proteinlevel von Akt1 und Akt3 festgestellt werden kann, kann von einer hohen Spezifität der siRNA gegen AKT2 ausgegangen werden. **Abb. 3.14B** zeigt, dass eine erfolgreiche Hemmung der Akt2-Proteinexpression keinen Effekt auf das klonogene Überleben von A549 Zellen (DMF: 0,87) hat, sofern die Zellen 24 Stunden vor der Bestrahlung ausgesät wurden. Ein signifikanter Effekt ist lediglich nach Bestrahlung mit 2 Gy im Koloniebildungstest zu beobachten, bei dem die Zellen 2 Stunden bzw. 24 Stunden nach Bestrahlung ausgesät wurden.

Im Gegensatz zum AKT1- und AKT3-Knockdown stellt die Hemmung der Akt2-Proteinexpression keine geeignete Methode dar, um die Strahlentoxizität in A549 Zellen zu verstärken. Dies lässt vermuten, dass Akt2 für das klonogene Überleben und die damit verbundene Strahlenresistenz von A549 Zellen eine vernachlässigbar geringe Rolle spielt.

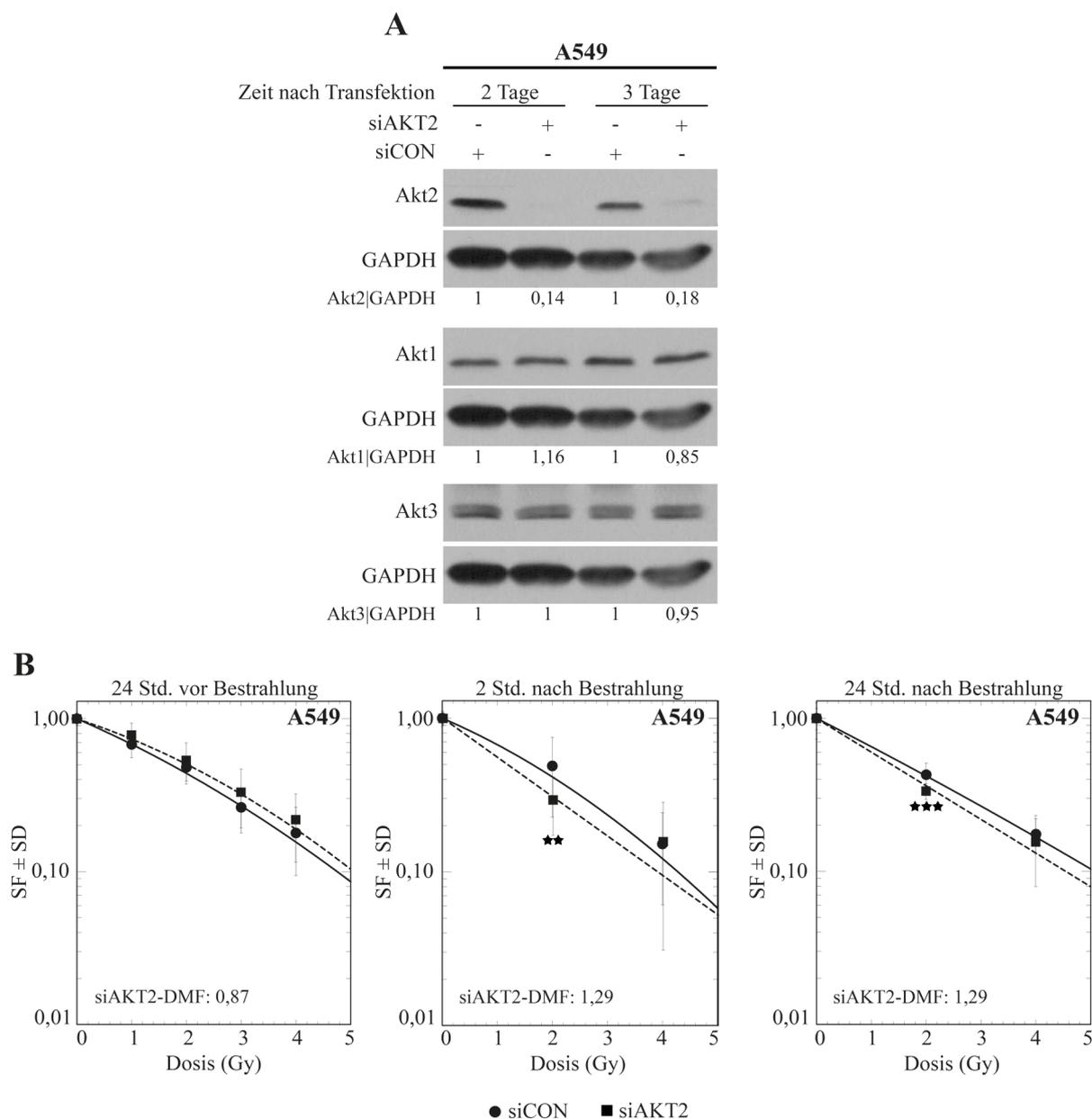


Abb. 3.14: Klonogenes Überleben der A549 Zellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einem temporären AKT2-Knockdown. (A) Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot. Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert des Quotienten aus den spezifischen Akt-Isoformen und GAPDH von 2 biologischen Replikaten, normiert auf 1 in Kontrollzellen. (B) Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren SF \pm SD aus 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten („24 Std. vor Bestrahlung“) und 24 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten („2 Std. bzw. 24 Std. nach Bestrahlung“). Die Signifikanz des Effekts zwischen siCON- und siAKT2-transfizierten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

3.2.2.8 Einfluss einer Akt2-Herunterregulation durch siRNA auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

Um zu untersuchen, welche Rolle die Akt-Isoform Akt2 für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB spielt, wurden in der Lungenkarzinomzelllinie A549 γ -H2AX Focus Assays unter temporärer Hemmung der Akt2-Proteinexpression durchgeführt. Hierzu wurden A549 Zellen in Culture Slides ausgesät, die 24 Stunden später bei einer Konfluenz von 80 % mit 50 nM siAKT2 sowie mit non-targeting siRNA zu Kontrollzwecken transfiziert wurden. 72 Stunden

nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0 Gy und 4 Gy bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

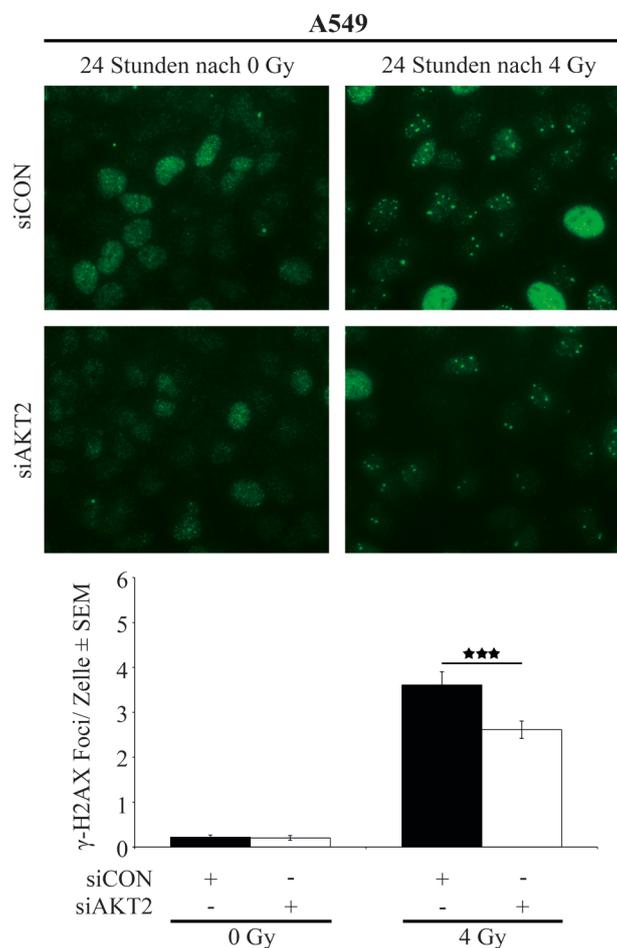


Abb. 3.15: Residuelle DNA-DSB in A549 Zellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einem temporären AKT2-Knockdown. Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen und die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 600 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 3 biologischen Replikaten entspricht. Die Signifikanz des Effekts zwischen siCON- und siAKT2-transfizierten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (***, $P < 0,001$).

Abb. 3.15 zeigt, dass strahleninduzierte DNA-DSB in A549 Zellen mit AKT2-Knockdown effizienter repariert werden als in Kontrollzellen. Dieses Ergebnis kann mit dem Ergebnis der Koloniebildungstests (**Abb. 3.14B**) nicht zur Deckung gebracht werden, da in den Koloniebildungstests nach AKT2-Knockdown kein protektiver Effekt gegenüber ionisierender Strahlung zu verzeichnen ist. Demnach besteht in diesem Fall keine Korrelation zwischen der Anzahl detektierbarer Foci und dem Ausmaß des zellulären Überlebens nach Strahlenexposition.

3.2.2.9 Einfluss einer kombinatorischen Akt-Isoformen-Herunterregulation durch siRNA auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

Da bereits gezeigt wurde, dass die Effizienz der Schadensreparatur nach Bestrahlung sowohl durch AKT1-Knockdown (**Abb. 3.10, Abb. 3.11**) als auch durch AKT3-Knockdown (**Abb. 3.13**) signifikant verringert bzw. die Reparatureffizienz nach AKT2-Knockdown (**Abb. 3.15**) verbessert wird, sollte als nächstes untersucht werden, wie sich kombinatorische Knockdowns auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB auswirken. Hierzu wurden in der Lungenkarzinomzelllinie A549 γ -H2AX Focus Assays durchgeführt, wobei die Proteinexpression spezifischer Akt-Isoformen mit kombinatorischen siRNAs gehemmt wurde. A549 Zellen wurden in Culture Slides ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % mit spezifischer siAKT transfiziert. Dabei wurde jede siRNA in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt. Kontrollzellen wurden mit der entsprechenden Gesamtmenge siCON transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

Abb. 3.16 zeigt, dass nach kombinatorischem AKT1/3-Knockdown signifikant mehr unreparierte DNA-DSB zu verzeichnen sind als in Kontrollzellen. Jedoch ist von keinem additiven Effekt der Isoformen Akt1 und Akt3 auszugehen (**Abb. 3.10, Abb. 3.13**). Weder ein kombinatorischer AKT1/2- noch ein kombinatorischer AKT2/3-Knockdown beeinflusst die Effizienz der DNA-Schadensreparatur nennenswert, was möglicherweise durch einen additiven Effekt der Isoformen Akt1 und Akt2 (**Abb. 3.10, Abb. 3.15**) bzw. Akt2 und Akt3 (**Abb. 3.15, Abb. 3.13**) erklärbar ist. Ein kombinatorischer Knockdown aller drei AKT-Isoformen führt zu keiner nennenswerter Änderung in der Anzahl residueller DNA-DSB nach Bestrahlung.

Da in A549 Zellen ein strahlensensitivierender Effekt aufgrund einer reduzierten Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB erzielt werden soll, scheint es sinnvoll zu sein, sich auf einen AKT1- bzw. AKT3-Knockdown, gegebenenfalls auf einen kombinatorischen AKT1/AKT3-Knockdown zu konzentrieren.

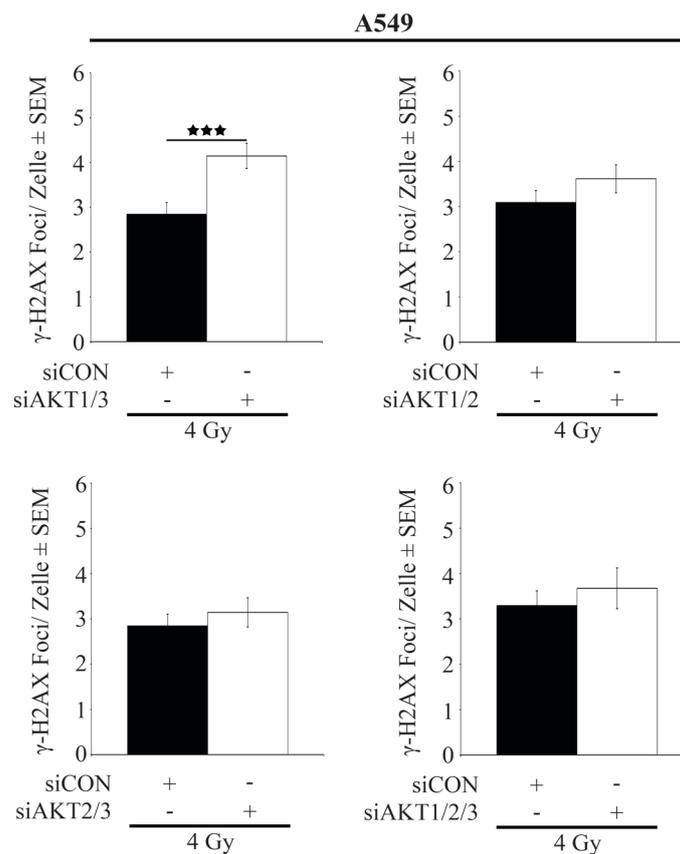


Abb. 3.16: Residuelle DNA-DSB in A549 Zellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit kombinatorischen AKT-Isoformen-Knockdowns. Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen und die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 400 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten (AKT1/2/3-Knockdown, AKT1/2-Knockdown) und 200 ausgezählten Zellkernen/Bedingung (AKT1/3-Knockdown, AKT2/3-Knockdown) entspricht. Die Signifikanz des Effekts zwischen siCON- und siAKT-transfizierten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (***, $P < 0,001$).

3.2.3 GSK3 α/β und PRAS40 als Substrate spezifischer Akt-Isoformen

Generell ist beschrieben, dass GSK3 α/β und PRAS40 Akt-Substrate sind (Cross *et al.*, 1995; Doble *et al.*, 2003; Kovacina *et al.*, 2003). Meist wird nicht zwischen den Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 unterschieden. Daher muss hier geklärt werden, ob GSK3 α/β und PRAS40 möglicherweise Substrate von lediglich einer bestimmten Akt-Isoform sind. Um dies zu untersuchen, wurden A549 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden später bei einer Konfluenz von 80 % mit 50 nM siRNA gegen AKT1, AKT2 und AKT3 transfiziert. Zur Kontrolle dienten 50 nM non-targeting siRNA. 2 Tage und 3 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in Lysispuffer aufgenommen und die Gesamtzellextrakte mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Potentielle Akt-Substrate wurden anhand des Phosphorylierungsgrads von GSK3 α/β und PRAS40 bestimmt.

In **Abb. 3.17** wird ersichtlich, dass der Knockdown der jeweiligen AKT-Isoform erfolgreich war und dass man GSK3 α/β und PRAS40 nicht als generelle Akt-Substrate bezeichnen kann.

Es ist nötig, zwischen den Isoformen von Akt zu unterscheiden. GSK3 α/β und PRAS40 sind Substrate der Akt-Isoform Akt1, jedoch nicht von Akt2. Akt3 hat lediglich PRAS40 als Substrat. Ebenso ist auch möglich, dass die einzelnen Akt-Isoformen unterschiedlich stark aktiviert werden.

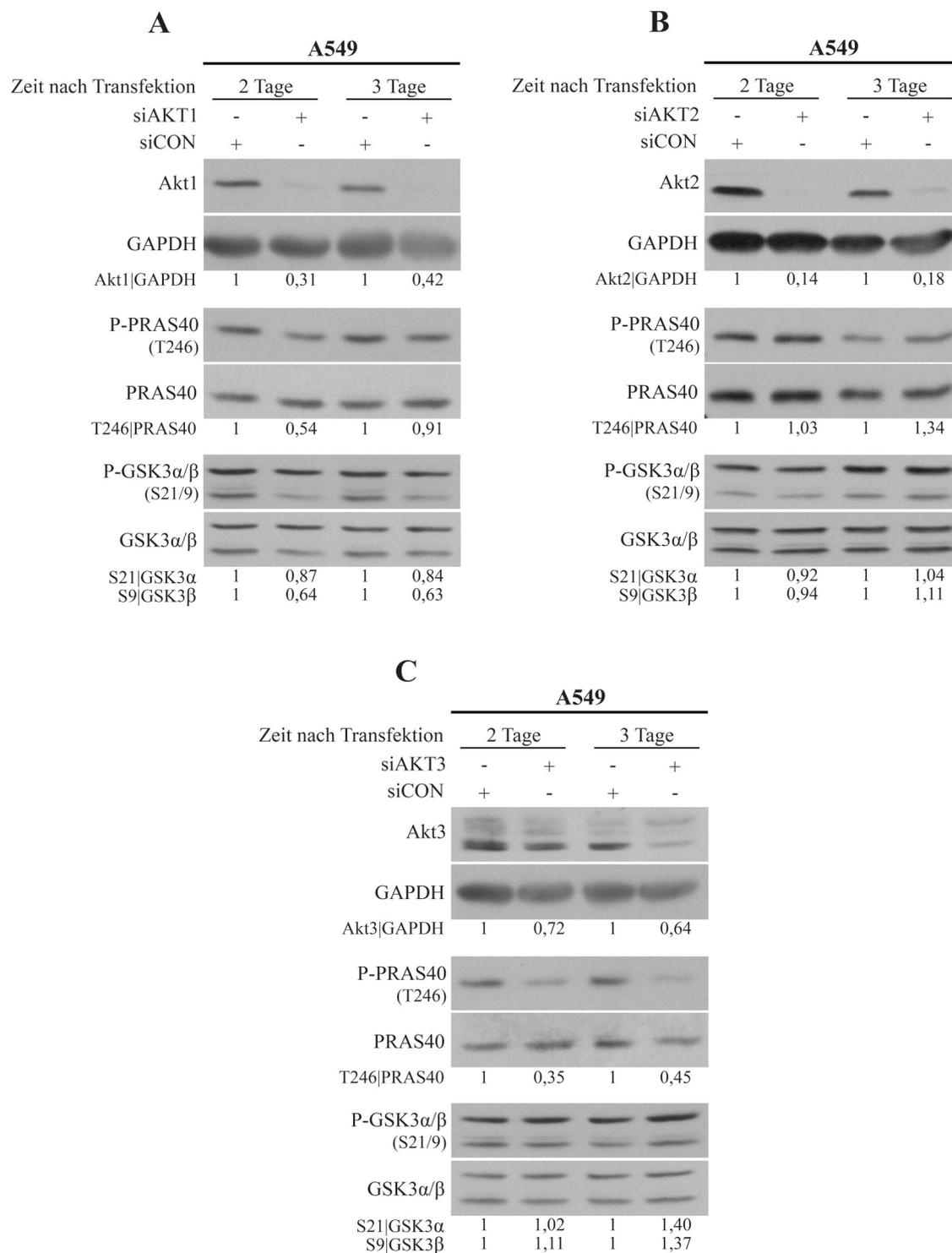


Abb. 3.17: Substrate spezifischer Akt-Isoformen in A549 Zellen. Gezeigt ist jeweils ein exemplarischer Western Blot mit siAKT1- (A), siAKT2- (B) und siAKT3-transfizierten Zellen (C). Die densitometrische Auswertung zeigt den Mittelwert des Quotienten aus Phospho- und Gesamt-Protein bzw. den Mittelwert des Quotienten aus den spezifischen Akt-Isoformen und GAPDH von mindestens 2 biologischen Replikaten, normiert auf 1 in Kontrollzellen.

3.3 Molekulares Targeting von mTOR mittels Rapamycin in Tumorzellen

Ein weiteres Schlüsselprotein im PI3K/Akt-Signalweg ist die Serin-/Threoninkinase mTOR, die durch Rapamycin gehemmt werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass gezeigt werden konnte, dass Rapamycin ein potenter negativer Regulator des Zellwachstums in Zellkulturmodellen ist (Eng *et al.*, 1984; Seufferlein *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2001; Noh *et al.*, 2004; Gulhati *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011), ist dieser Hemmstoff ins Blickfeld der Krebstherapie gerückt. Leider hat aber Rapamycin in Patienten nicht die erhoffte Wirkung gezeigt. In verhältnismäßig wenigen Tumorentitäten kam es zu einer Stagnation des Tumorwachstums (Hudes *et al.*, 2007; Motzer *et al.*, 2008; Amato *et al.*, 2009; Hess *et al.*, 2009), in vielen anderen Karzinomen war der Effekt nicht zufriedenstellend (Chan *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2005; LoPiccolo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wolpin *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012). Da die Ursachen für diese unbefriedigende antitumorale Wirkung von Rapamycin unklar sind, sind weitere Untersuchungen nötig. Im Folgenden wurde die Wirkung von Rapamycin in den Lungenkarzinomzellen A549, SK-MES-1, HTB-182, H460 und H661 sowie in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 untersucht.

3.3.1 Einfluss einer mTOR-Hemmung durch Rapamycin auf die Proliferation

Um zu untersuchen, wie sich Rapamycin auf die Proliferation von Lungenkarzinomzellen auswirkt, wurde das Zellwachstum von A549, SK-MES-1, HTB-182, H460 und H661 nach Behandlung mit Rapamycin gemessen. Dazu wurden die Zellen in definierter Zellzahl ausgesät. 24 Stunden nach der Aussaat wurden die Zellen mit unterschiedlichen Rapamycin-Konzentrationen (100, 200, 500 nM) behandelt. Kontrollzellen erhielten DMSO. 2 Tage, 3 Tage und 4 Tage nach der Behandlung wurde die Anzahl der lebenden Zellen lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und die Verdopplungszeit mathematisch berechnet. Als Indikator für das Ausmaß der zytostatischen Wirkung von Rapamycin wurde der Quotient aus Verdopplungszeit in Rapamycin-behandelten und DMSO-behandelten Zellen herangezogen.

Abb. 3.18 zeigt, dass Rapamycin die Proliferation aller hier getesteten Lungenkarzinomzelllinien hemmt. Das Ausmaß des zytostatischen Effekts scheint nahezu konzentrationsunabhängig, jedoch zelllinienabhängig zu sein. Wie in **Tab. 3.2A** ersichtlich ist, nimmt die Verdopplungszeit der H661 Zellen nach Behandlung mit 100 nM Rapamycin im Vergleich zu Kontrollzellen um 67 % zu, während die Zunahme in H460 Zellen lediglich 9 % beträgt. Die Rapamycin-bedingte Verlängerung der Verdopplungszeit beträgt 40 % in A549, 26 % in SK-MES-1 und 21 % in HTB-182 Zellen. Ein ähnliches Bild ergibt sich nach Behandlung mit 200 nM und 500 nM Rapamycin.

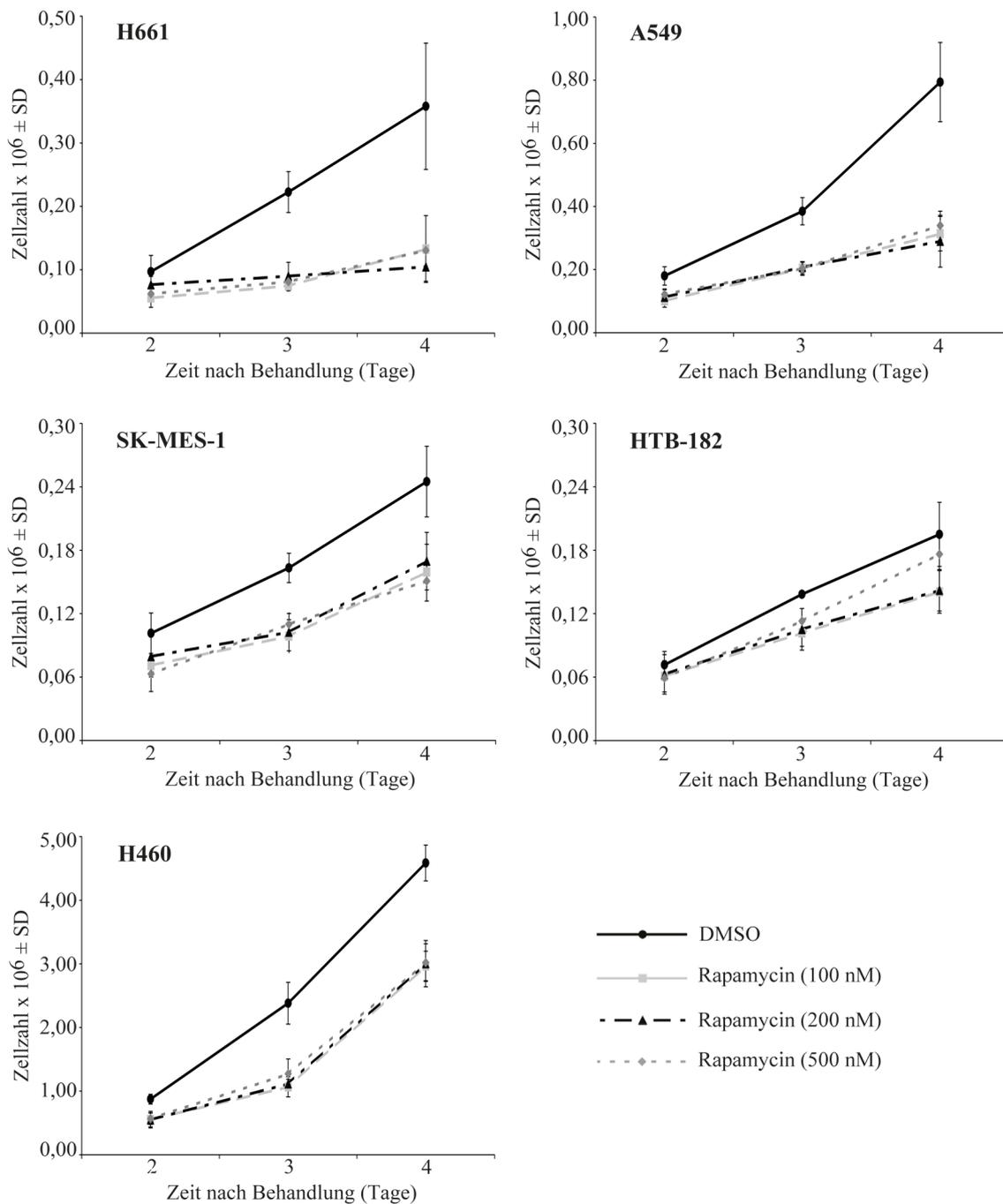


Abb. 3.18: Zytostatische Wirkung des mTOR-Inhibitors Rapamycin in Lungenkarzinomzellen. Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren Zellzahl ± SD aus 4 technischen Replikaten.

Tab. 3.2: Durch Rapamycin verlängerte Verdopplungszeit der Lungenkarzinomzellen. Mit Hilfe der mittleren Zellzahl 4 Tage nach Behandlung mit 100 nM (A), 200 nM (B) und 500 nM (C) Rapamycin bzw. DMSO wurde die Verdopplungszeit für die jeweilige Zelllinie berechnet.

A	DMSO [Std.]	100 nM Rapa [Std.]	<u>100 nM Rapa [Std.]</u>
	DMSO [Std.]		
H661	33,55	55,93	1,67
A549	25,39	35,45	1,40
SK-MES-1	39,61	49,81	1,26
HTB-182	44,44	53,86	1,21
H460	16,54	18,10	1,09

B	DMSO [Std.]	200 nM Rapa [Std.]	<u>200 nM Rapa [Std.]</u>
	DMSO [Std.]		
H661	33,55	66,59	1,98
A549	25,39	36,66	1,44
SK-MES-1	39,61	48,00	1,21
HTB-182	44,44	53,46	1,20
H460	16,54	18,06	1,09

C	DMSO [Std.]	500 nM Rapa [Std.]	<u>500 nM Rapa [Std.]</u>
	DMSO [Std.]		
H661	33,55	56,58	1,68
A549	25,39	34,28	1,35
SK-MES-1	39,61	51,48	1,30
HTB-182	44,44	46,96	1,06
H460	16,54	18,04	1,09

3.3.2 Einfluss einer mTOR-Hemmung durch Rapamycin auf das klonogene Überleben

Die Wirksamkeit von Rapamycin war als Monotherapie in klinischen Studien bisher noch nicht überzeugend (Chan *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2005; LoPiccolo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wolpin *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012). Daher wird man zukünftig auch über Kombinationstherapien nachdenken müssen, da sich eine Kombination aus Rapamycin und z. B. Strahlentherapie als erfolgreich erweisen könnte. Zur Untersuchung des klonogenen Überlebens der Lungenkarzinomzellen A549, SK-MES-1, HTB-182, H460 und H661 sowie der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 wurden Koloniebildungstests unter Rapamycin-Gabe durchgeführt. Hierzu wurden Einzelzellkulturen ausgesät. Diese wurden nach 24 Stunden mit 100 nM Rapamycin behandelt. Kontrollzellen erhielten DMSO. 2 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy

bis 4 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Die Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung von Rapamycin wurde der DMF angegeben.

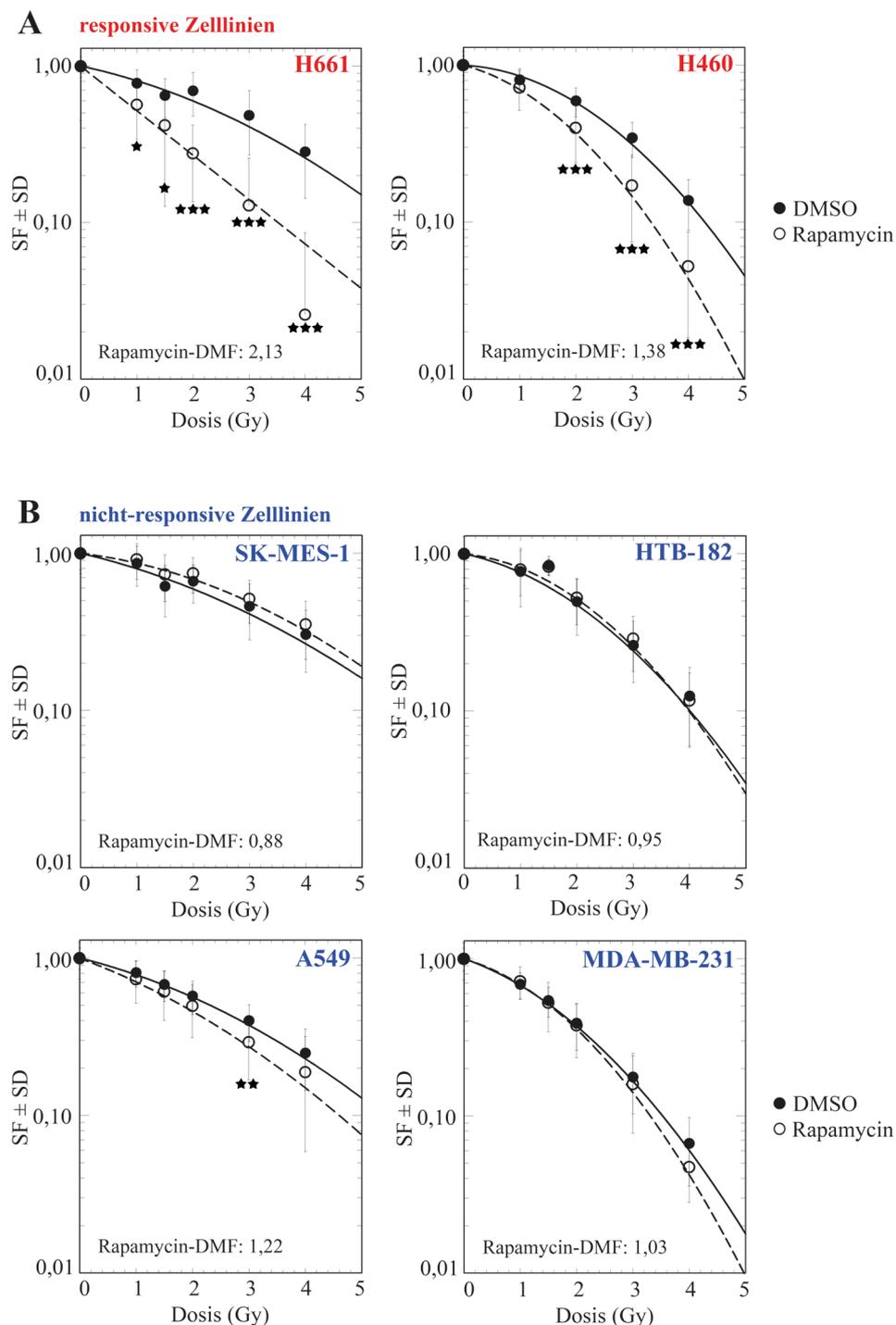


Abb. 3.19: Klonogenes Überleben der Tumorzellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin. (A) Responsive Zellen. (B) Nicht-responsive Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren $SF \pm SD$ aus 21 Datenpunkten von 5 biologischen Replikaten in A549, 30 Datenpunkten von 5 biologischen Replikaten in H460, 36 Datenpunkten von 6 biologischen Replikaten in SK-MES-1 und HTB-182 und 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten in H661 und MDA-MB-231. Die Signifikanz des Effekts zwischen DMSO- und Rapamycin-behandelten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Wie in **Abb. 3.19A** dargestellt, wirkt Rapamycin auf die Lungenkarzinomzelllinien H661 (DMF: 2,13) und H460 (DMF: 1,38) signifikant strahlensensitivierend, während Rapamycin auf die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (DMF: 1,03) und die Lungenkarzinomzelllinien SK-MES-1 (DMF: 0,88), HTB-182 (DMF: 0,95) und A549 (DMF: 1,22) keinen bzw. nur einen geringen Effekt hat (**Abb. 3.19B**).

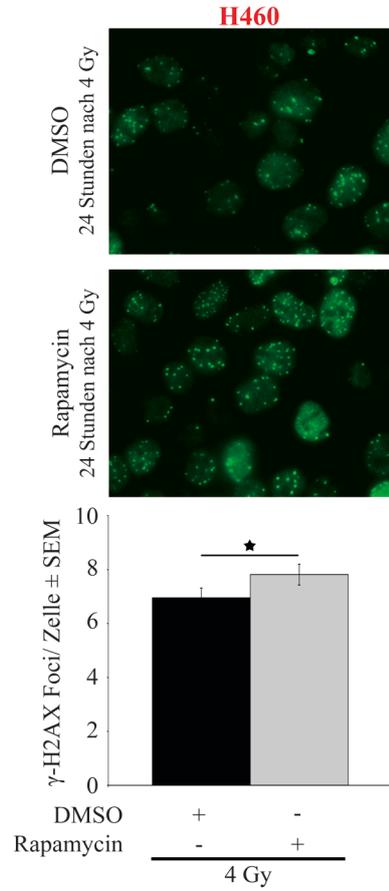
Dies bedeutet, dass sich Rapamycin auf das klonogene Überleben von Tumorzellen unterschiedlich auswirkt. H661 und H460 wurden bezüglich des Ansprechens auf eine kombinierte Rapamycin-/Strahlentherapie als „responsive Zelllinien“ bezeichnet, während SK-MES-1, HTB-182, A549 und MDA-MB-231 als „nicht-responsive Zelllinien“ definiert wurden.

3.3.3 Einfluss einer mTOR-Hemmung durch Rapamycin auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

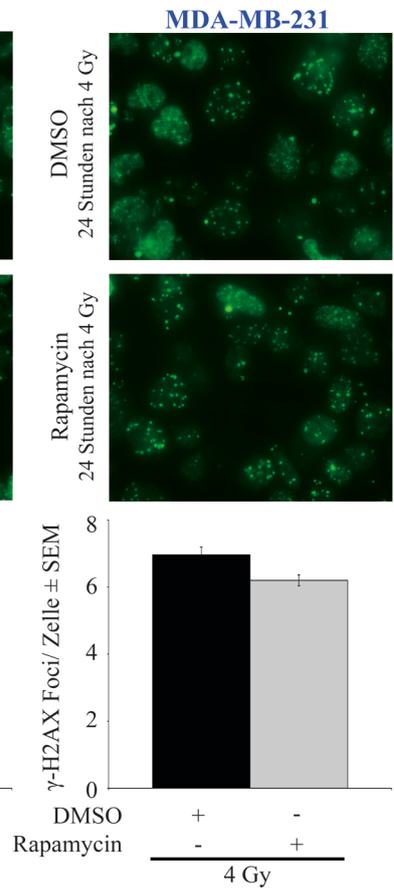
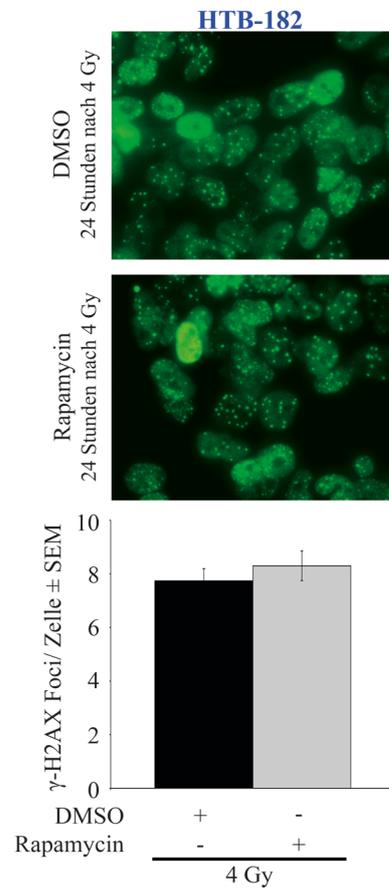
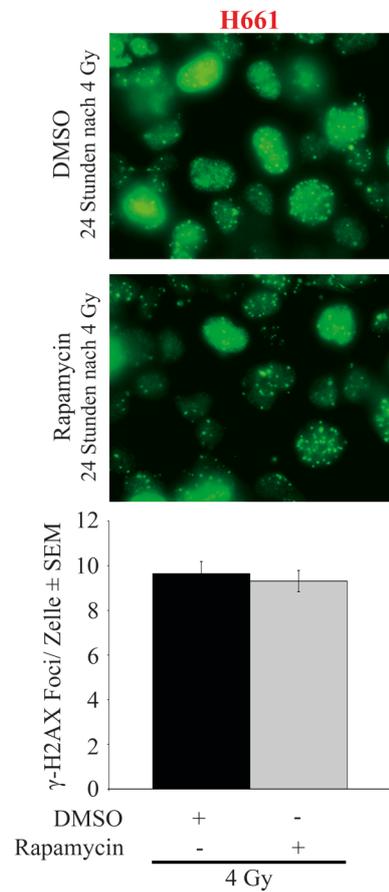
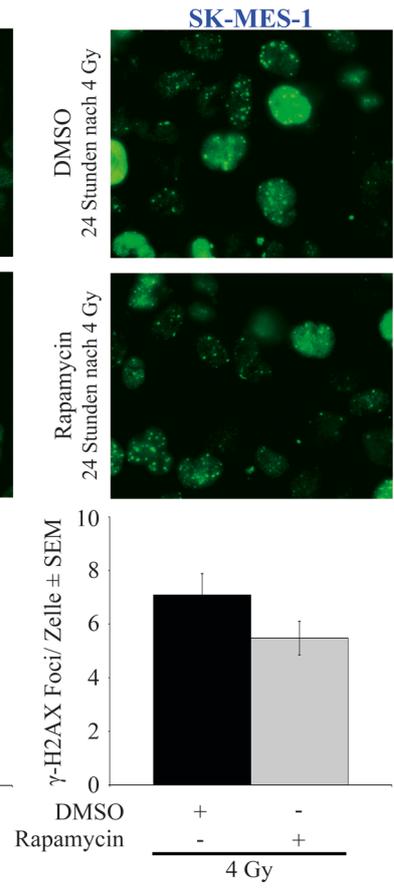
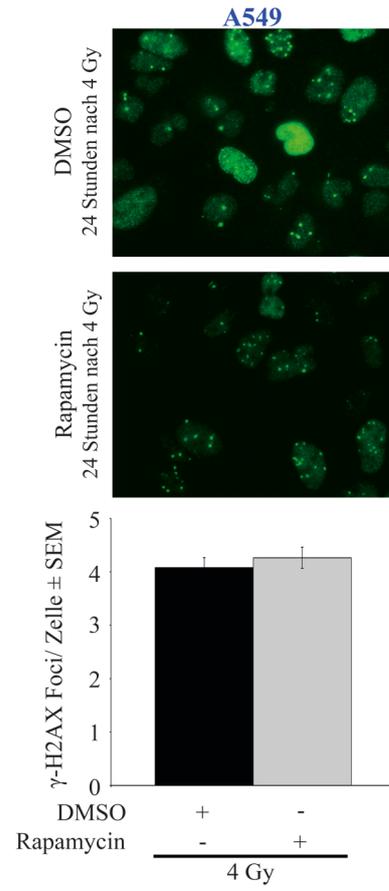
Um zu untersuchen, welche Rolle mTOR für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB spielt, wurden in den NSCLC-Zelllinien A549, HTB-182, SK-MES-1, H460 und H661 sowie in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 γ -H2AX Focus Assays unter Gabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in Culture Slides ausgesät. Konfluente Zellen wurden mit 100 nM Rapamycin behandelt, wobei DMSO-behandelte Zellen als Kontrolle dienten. 3 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

Abb. 3.20: Residuelle DNA-DSB in Tumorzellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin. (A) Responsive Zellen. (B) Nicht-responsive Zellen. Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen und die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 600 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 4 biologischen Replikaten in A549, 200 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten in H661, 750 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 5 biologischen Replikaten in H460 und 100 ausgezählten Zellkernen/Bedingung in SK-MES-1, HTB-182 und MDA-MB-231 entspricht. Die Signifikanz des Effekts zwischen DMSO- und Rapamycin-behandelten Zellen wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$).

A responsive Zelllinien



B nicht-responsive Zelllinien



In den nicht-responsiven Zelllinien A549, SK-MES-1, HTB-182 und MDA-MB-231 ist nach Behandlung mit Rapamycin keine nennenswerte Veränderung in der Anzahl der residuellen DNA-DSB zu verzeichnen (**Abb. 3.20B**). Dies gilt auch für die responsive Zelllinie H661 (**Abb. 3.20A**). Jedoch verursacht Rapamycin in responsiven H460 Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy eine signifikante Erhöhung der residuellen DNA-DSB. Vermutlich ist die strahlensensitivierende Wirkung von Rapamycin (**Abb. 3.19A**) in H460 Zellen zumindest teilweise durch eine reduzierte Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB erklärbar. Dies scheint aber nicht der einzige Mechanismus zu sein, über den Rapamycin das Überleben von Tumorzellen nach Strahlenexposition begünstigt. Gerade in H661 Zellen scheinen andere Mechanismen zu dominieren.

3.3.4 Einfluss einer mTOR-Hemmung durch Rapamycin auf den Akt1-Phosphorylierungs- und Aktivitätsstatus

Es ist bekannt, dass die Blockade von mTOR durch Rapamycin zur Induktion des PI3K/Akt-Signalwegs führen und dadurch zu einer Resistenzentwicklung solider Tumoren beitragen kann (Sun *et al.*, 2005; O'Reilly *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007; Roforth *et al.*, 2008; Tabernero *et al.*, 2008; Dufour *et al.*, 2011; He *et al.*, 2011). Da zudem bekannt ist, dass der PI3K/Akt-Signalweg in die Vermittlung einer Strahlenresistenz involviert ist (Tanno *et al.*, 2004; Toulany *et al.*, 2006; Kao *et al.*, 2007; Toulany *et al.*, 2008; Golding *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Toulany *et al.*, 2010; Toulany, 2013), sollte als nächstes untersucht werden, ob die fehlende strahlensensitivierende Wirkung von Rapamycin möglicherweise mit einer Rapamycin-induzierten PI3K/Akt-Aktivierung in Zusammenhang steht. Zur Beobachtung des zeitlichen Verlaufs einer Rapamycin-induzierten Akt1-Aktivierung wurden zeitkinetische Western Blot Analysen in nicht-responsiven A549 und responsiven H460 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden konfluente Zellen mit 100 nM Rapamycin bzw. DMSO behandelt. Nach angegebener Behandlungsdauer wurden die Zellen lysiert. Die Gesamtzellextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und verschiedene phosphorylierte Proteine sowie die jeweiligen Gesamtproteine mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

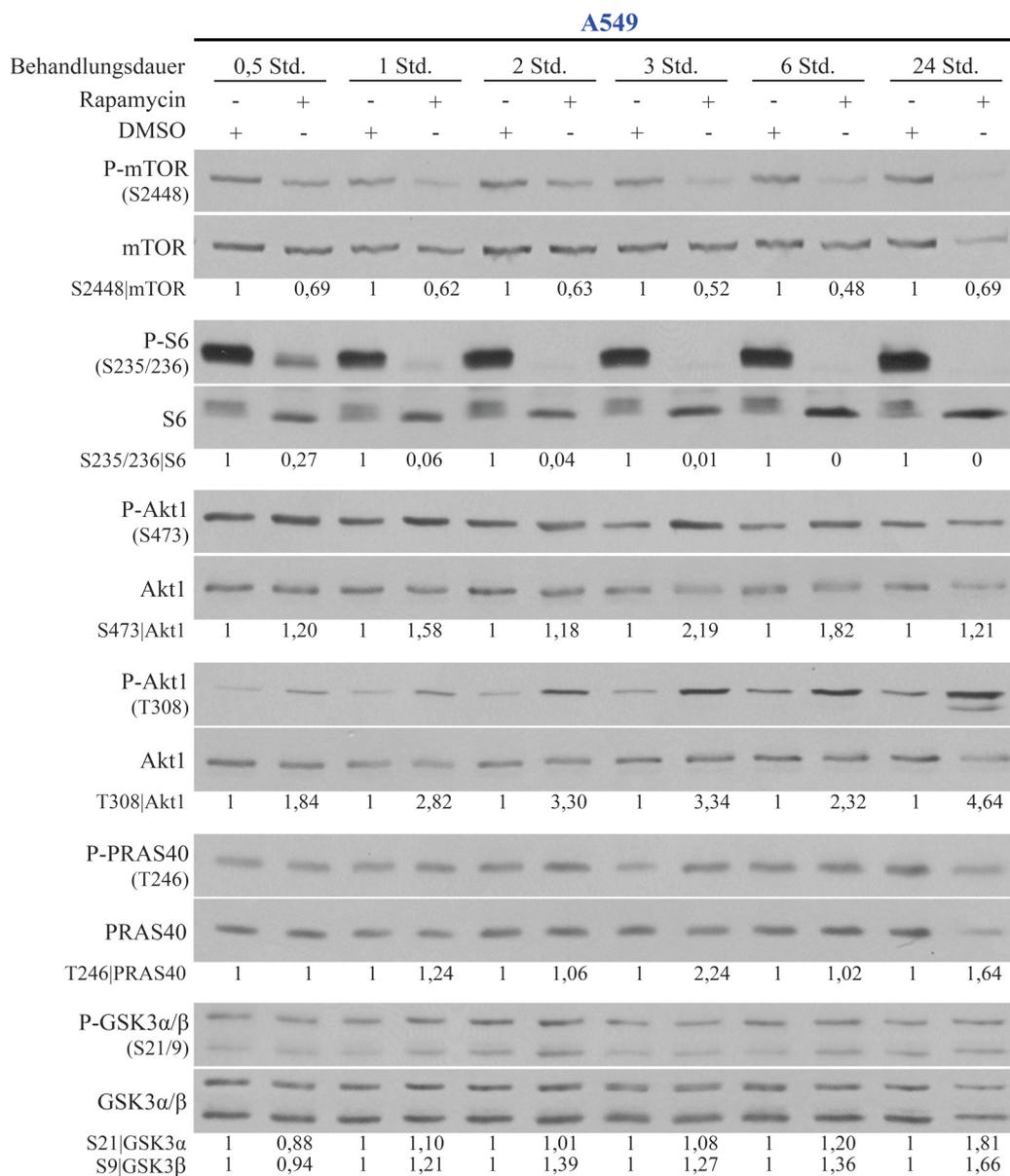


Abb. 3.21: Zeitkinetische Western Blot Analyse zur Untersuchung des Einflusses einer Rapamycin-Behandlung auf Komponenten des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in nicht-responsiven A549 Zellen. Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot. Die densitometrische Auswertung zeigt den Quotienten aus phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein, normiert auf 1 in Kontrollzellen.

Wie in **Abb. 3.21** zu sehen ist, schwächt Rapamycin den Phosphorylierungsgrad von mTOR und dessen Effektorprotein S6 in nicht-responsiven A549 Zellen zeitabhängig ab. In A549 Zellen ist bereits 30 Minuten nach Behandlung mit Rapamycin eine deutliche Hemmung der mTOR- und S6-Phosphorylierung zu verzeichnen. Diese Blockade wird über einen Zeitraum von 24 Stunden aufrechterhalten. Parallel zu einer erfolgreichen Hemmung des mTOR-Signalwegs induziert Rapamycin die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt1. Sowohl der Phosphorylierungsgrad von Akt1 S473 als auch von Akt1 T308 nimmt nach Behandlung mit Rapamycin in nicht-responsiven A549 Zellen zu. Dies geht einher mit einer Aktivierung der Akt1-Kinaseaktivität. Das Akt1-Effektorprotein PRAS40 wird nach Behandlung mit

Rapamycin an T246 verstärkt phosphoryliert. Gleiches gilt für die Akt1-Effektorproteine GSK3 α und GSK3 β .

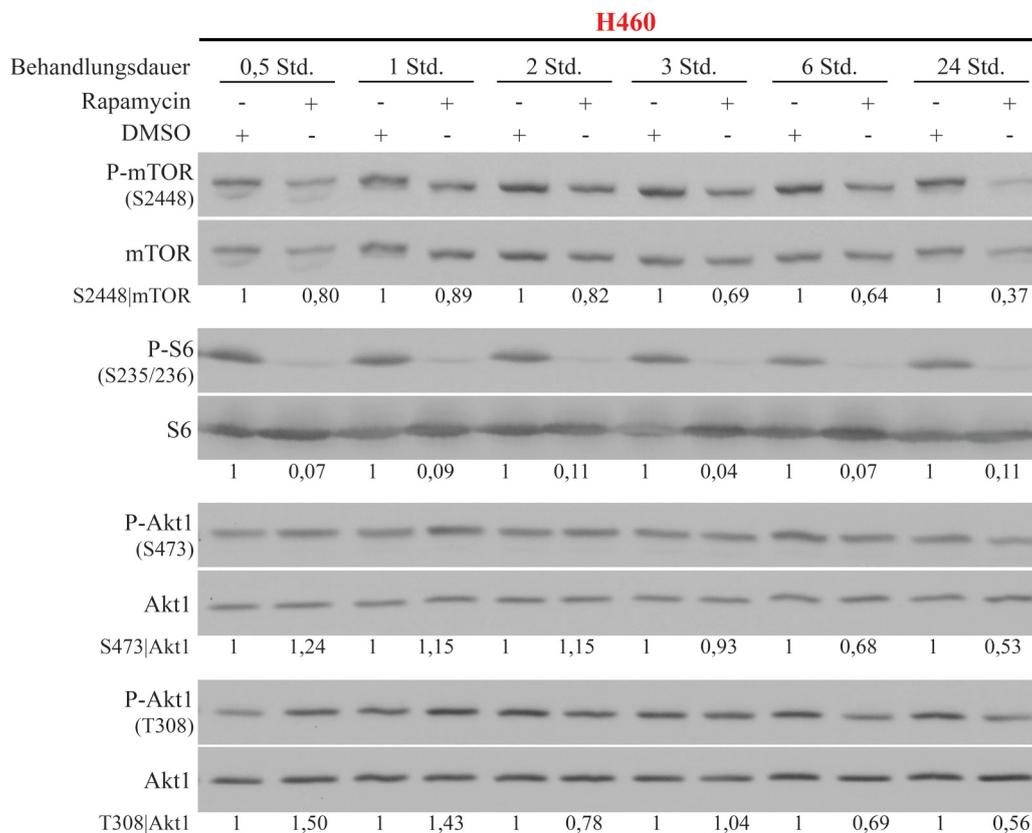


Abb. 3.22: Zeitkinetische Western Blot Analyse zur Untersuchung des Einflusses einer Rapamycin-Behandlung auf Komponenten des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in responsiven H460 Zellen. Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot. Die densitometrische Auswertung zeigt den Quotienten aus phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein, normiert auf 1 in Kontrollzellen.

Auch in responsiven H460 Zellen blockiert Rapamycin den mTOR-Signalweg effektiv; sowohl der Phosphorylierungsgrad von mTOR als auch der von S6 nimmt durch Rapamycin zeitabhängig ab (**Abb. 3.22**). Im Gegensatz zu nicht-responsiven A549 Zellen (**Abb. 3.21**) induziert Rapamycin in responsiven H460 Zellen lediglich in der ersten Stunde nach Behandlung eine leichte Akt1-Aktivierung. Im Laufe der Zeit erreicht das Phosphorylierungslevel von Akt1 dann einen Wert, der unter dem der Kontrollzellen liegt.

Als nächstes sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Rapamycin-Behandlung auf weitere responsive und nicht-responsive Zelllinien hat und ob sich gegebenenfalls der Zusammenhang zwischen fehlender Rapamycin-induzierter Strahlensensitivierung und bestehender Rapamycin-induzierter Akt1-Aktivierung auch in diesen Zelllinien bestätigen lässt. Hierfür wurden neben A549 und H460 Zellen auch nicht-responsive SK-MES-1, HTB-182 und MDA-MB-231 Zellen sowie responsive H661 Zellen für 6 Stunden mit 100 nM Rapamycin behandelt. Nach Lyse der Zellen wurden die Gesamtzellextrakte

gelelektrophoretisch aufgetrennt und verschiedene phosphorylierte Proteine des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs sowie die jeweiligen Gesamtproteine mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

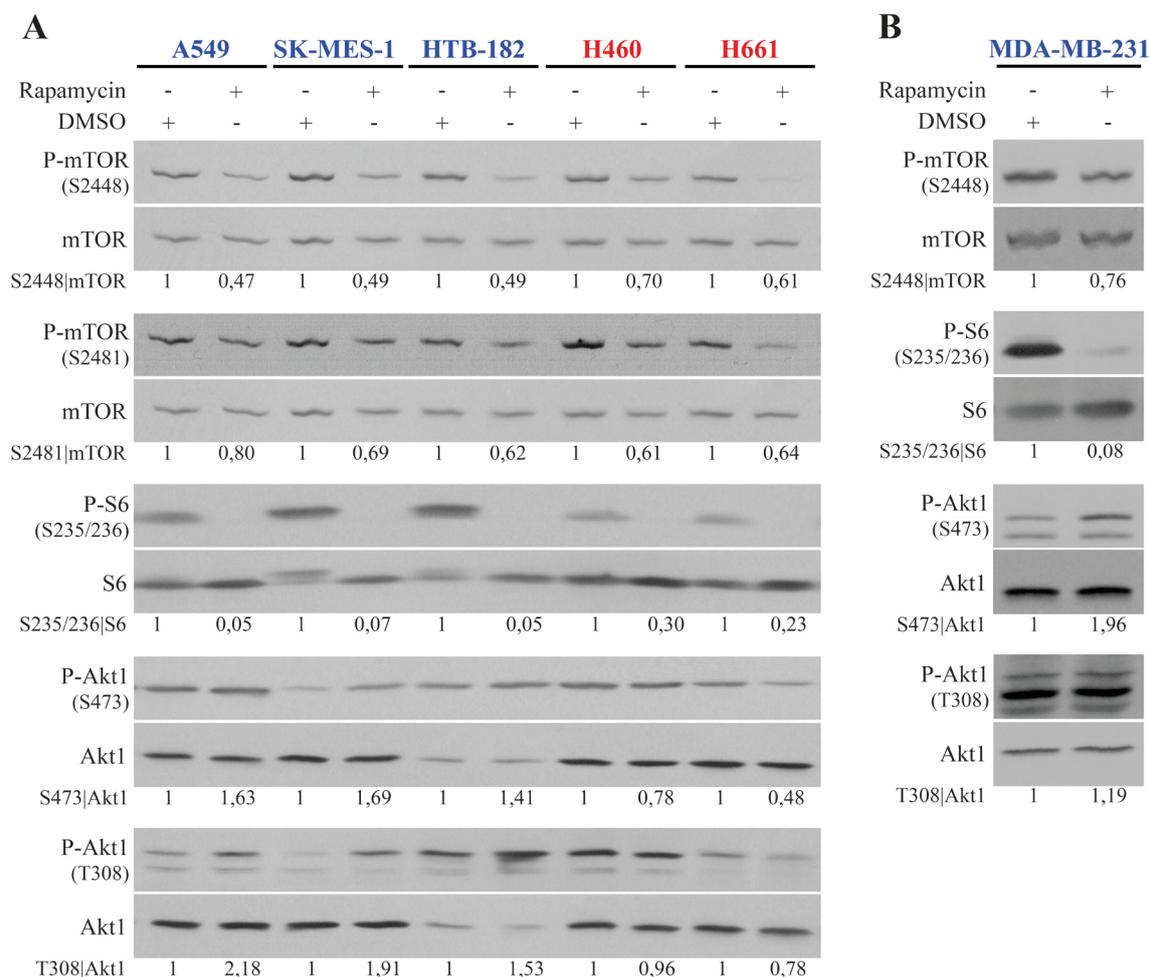


Abb. 3.23: Western Blot Analyse zur Untersuchung des Einflusses einer 6-stündigen Rapamycin-Behandlung auf Komponenten des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs in responsiven und nicht-responsiven Tumorzellen. (A) NSCLC-Zellen. Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot. Die densitometrische Auswertung zeigt den Quotienten aus phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein von 3 bis 5 biologischen Replikaten, normiert auf 1 in Kontrollzellen. **(B) Mammakarzinomzellen.** Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot, wobei die densitometrische Auswertung den Quotienten aus phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein, normiert auf 1 in Kontrollzellen, zeigt.

Abb. 3.23 zeigt, dass Rapamycin in allen responsiven und nicht-responsiven Zelllinien ein effektiver Inhibitor des mTOR-Signalwegs ist. Nach Rapamycin-Behandlung wird sowohl die Transphosphorylierung S2448 und Autophosphorylierung S2481 von mTOR als auch die Phosphorylierung von dessen Effektorprotein S6 gehemmt. In allen getesteten nicht-responsiven Zelllinien (A549, SK-MES-1, HTB-182, MDA-MB-231) verursacht Rapamycin eine Aktivierung von Akt1, wie an der Zunahme der Akt1-Phosphorylierungen zu erkennen ist. In responsiven H460 und H661 Zellen ist diese Zunahme im Phosphorylierungsgrad nicht zu beobachten, vielmehr kommt es sogar zu einer leichten Abschwächung.

Diese Western Blot-Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die Rapamycin-induzierte Akt1-Aktivierung mit einer fehlenden Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung in den getesteten Zelllinien korreliert.

3.4 Kombinationsstrategien zur Wiederherstellung der fehlenden Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung in Tumorzellen

Von großem Interesse ist nun, ob es Möglichkeiten gibt, durch Blockade der Rapamycin-induzierten Akt1-Aktivierung den fehlenden bzw. reduzierten strahlensensitivierenden Effekt von Rapamycin wiederherzustellen, um so das Ansprechen der Tumorzellen zu verbessern. Das Augenmerk lag dabei auf Kombinationsstrategien, bei denen neben dem mTOR-Inhibitor Rapamycin Hemmstoffe zur Unterdrückung der Rapamycin-induzierten Akt-Aktivität zum Einsatz kamen.

3.4.1 Kombination von Rapamycin mit dem PI3K-Inhibitor LY294002

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Rapamycin-induzierte Akt-Aktivierung in der Lungenkarzinomzelllinie H157 sowie in den Rhabdomyosarkomzelllinien Rh30 und RD PI3K-abhängig ist (Sun *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2007). Diese Beobachtung sollte für die Mamma- und Lungenkarzinomzelllinien verifiziert werden. Hierzu wurden Western Blot Analysen durchgeführt, bei denen konfluente Zellen entweder für 3 Stunden mit 10 μ M LY294002 bzw. DMSO, für 2 Stunden mit 100 nM Rapamycin bzw. DMSO oder für 1 Stunde mit 10 μ M LY294002 und dann für weitere 2 Stunden mit 100 nM Rapamycin behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen und die Gesamtzellextrakte mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Abb. 3.24: Western Blot Analyse zur Untersuchung der PI3K-Abhängigkeit der Rapamycin-induzierten Akt1-Phosphorylierung in Tumorzellen. (A) Nicht-responsive Zellen. (B) Responsive Zellen. Gezeigt ist jeweils ein exemplarischer Western Blot. Die densitometrische Auswertung zeigt den Quotienten aus phosphoryliertem Protein und Gesamtprotein, normiert auf 1 in Kontrollzellen.

A nicht-responsive Zelllinien

	A549				SK-MES-1				HTB-182				MDA-MB-231			
LY294002	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Rapamycin	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
DMSO	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
P-mTOR (S2448)																
mTOR																
S2448 mTOR	1	0,37	0,68	0,76	1	0,38	0,52	0,33	1	0,25	0,40	0,14	1	0,51	0,77	0,91
P-S6 (S235/236)																
S6																
S235/236 S6	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0,12	0,12	0,09
P-Akt1 (S473)																
Akt1																
S473 Akt1	1	0,90	4,47	1,13	1	0	2,73	0	1	0	1,56	0	1	0,11	1,50	0,10
P-Akt1 (T308)																
Akt1																
T308 Akt1	1	0,59	2,96	0,99	1	0,34	1,77	0,43	1	0,10	0,90	0,10	1	0,85	2,05	1

B responsive Zelllinien

	H460				H661			
LY294002	-	+	-	+	-	+	-	+
Rapamycin	-	-	+	+	-	-	+	+
DMSO	+	+	+	-	+	+	+	-
P-mTOR (S2448)								
mTOR								
S2448 mTOR	1	0,72	0,82	0,70	1	0,29	0,53	0,36
P-S6 (S235/236)								
S6								
S235/236 S6	1	0,21	0,28	0,18	1	0,20	0,21	0,27
P-Akt1 (S473)								
Akt1								
S473 Akt1	1	0,19	1,12	0,16	1	0,21	0,86	0,28
P-Akt1 (T308)								
Akt1								
T308 Akt1	1	0,21	0,81	0,19	1	0,38	1,16	0,28

Wie bereits in **Abb. 3.23** gezeigt, verursacht Rapamycin in allen nicht-responsiven Zelllinien eine Zunahme im Akt1-Phosphorylierungslevel (**Abb. 3.24A**). Diese Rapamycin-vermittelte Zunahme im Akt1-Phosphorylierungsgrad kann in allen nicht-responsiven Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 erfolgreich gehemmt werden. Nach einer kombinierten Rapamycin-/LY294002-Behandlung erreicht das Akt1-Phosphorylierungslevel einen Wert, der mit dem einer alleinigen LY294002-Behandlung vergleichbar ist. Die durch Rapamycin bedingte Akt1-Aktivierung wird also mit LY294002 erfolgreich gehemmt, was die PI3K-Abhängigkeit der Rapamycin-induzierten Akt1-Phosphorylierung bestätigt. In einem ähnlichen Experiment, das zu Kontrollzwecken in responsiven H460 und H661 Zellen durchgeführt wurde, blockiert LY294002 das basale Akt1-Phosphorylierungslevel (**Abb. 3.24B**).

3.4.1.1 Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/LY294002-Behandlung auf das klonogene Überleben

Um zu untersuchen, ob es tatsächlich möglich ist, die fehlende bzw. abgeschwächte Rapamycin-induzierte strahlensensitivierende Wirkung in nicht-responsiven Tumorzellen mittels kombinierter Rapamycin-/LY294002-Behandlung wiederherzustellen, wurden in den nicht-responsiven Lungenkarzinomzelllinien SK-MES-1 und HTB-182 sowie in der nicht-responsiven Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 Koloniebildungstests unter kombinierter Rapamycin-/LY294002-Gabe durchgeführt. Hierzu wurden Einzelzellkulturen ausgesät, die 24 Stunden später für 1 Stunde mit 10 μM LY294002 und dann für weitere 2 Stunden mit 100 nM Rapamycin behandelt wurden. DMSO-behandelte Zellen bzw. Zellen, die lediglich mit einem der Inhibitoren behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Nach der insgesamt 3-stündigen Behandlungszeit wurden die Zellen mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung der Therapie wurden die DMF angegeben. Zudem wurde dieses Experiment auch in der responsiven Lungenkarzinomzelllinie H460 durchgeführt.

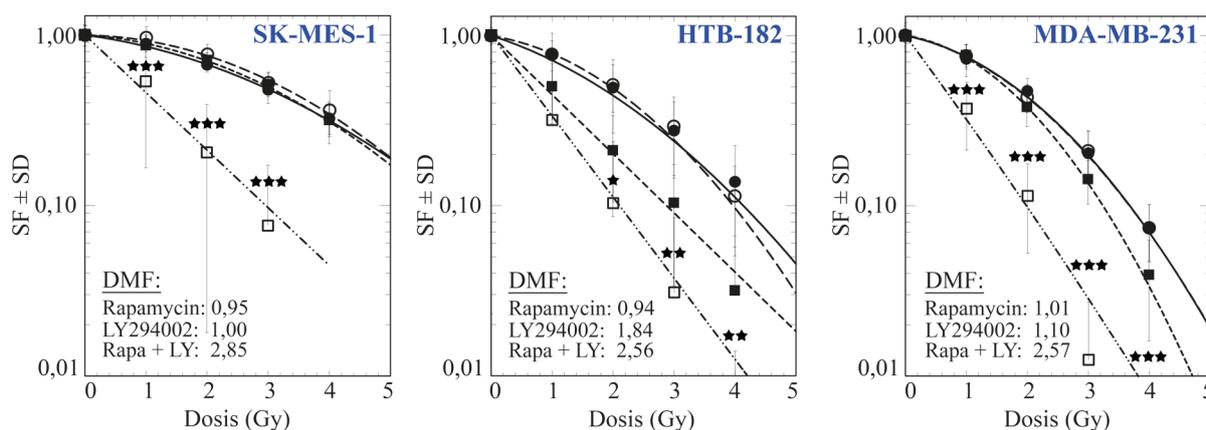
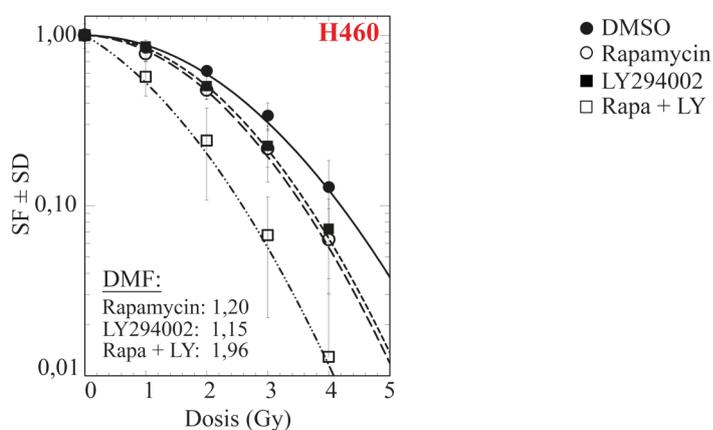
A nicht-responsive Zelllinien**B responsive Zelllinie**

Abb. 3.25: Kombinierte Rapamycin-/LY294002-Behandlung zur Wiederherstellung der fehlenden Rapamycin-induzierten strahlensensitivierenden Wirkung in Tumorzellen. (A) Nicht-responsive Zellen. (B) Responsive Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht der mittleren SF \pm SD aus 18 Datenpunkten von 3 biologischen Replikaten in SK-MES-1 und HTB-182 und 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten in MDA-MB-231 und H460. Die Signifikanz des Effekts zwischen einer Single-LY294002- und einer Kombinationsbehandlung in nicht-responsiven Zelllinien wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Wie bereits gezeigt (**Abb. 3.19B**), erhöht Rapamycin die Toxizität der Strahlentherapie in SK-MES-1 (DMF: 0,95), HTB-182 (DMF: 0,94) und MDA-MB-231 Zellen (DMF: 1,01) nicht (**Abb. 3.25A**). In Übereinstimmung mit bereits gezeigten Ergebnissen (**Abb. 3.2**) hat LY294002 in HTB-182 Zellen (DMF: 1,84) eine starke strahlensensitivierende Wirkung, in MDA-MB-231-Zellen einen schwachen (DMF: 1,10) und in SK-MES-1 Zellen (DMF: 1,00) keinen strahlensensitivierenden Effekt. Werden Rapamycin und LY294002 in nicht-responsiven Zellen kombiniert eingesetzt, ist die strahlensensitivierende Wirkung signifikant größer als die einer Single-LY294002-Behandlung (DMF in SK-MES-1: 2,85; DMF in HTB-182: 2,56; DMF in MDA-MB-231: 2,57). Es handelt sich um einen synergistischen Effekt. In responsiven H460 Zellen, in denen sowohl eine alleinige LY294002- (DMF: 1,15) als auch eine alleinige Rapamycin-Behandlung (DMF: 1,20) die Radiotoxizität erhöht, kommt es bei kombinierter Inhibitor-Behandlung zu einem additiven Effekt (DMF: 1,96) (**Abb. 3.25B**).

3.4.1.2 Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/LY294002-Behandlung auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

Dass die Reparatur von DNA-DSB für das Überleben bestrahlter Tumorzellen eine entscheidende Rolle spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit schon ausführlich gezeigt. Der erste Hinweis, dass die erhöhte Strahlensensitivierung nach kombinierter Rapamycin-/LY294002-Behandlung in nicht-responsiven Tumorzellen auf eine im Vergleich zur Singlebehandlung verminderte Kapazität für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB zurückzuführen ist, wurde in A549 Zellen gefunden. Mit diesen Zellen wurden γ -H2AX Focus Assays unter kombinierter Rapamycin-/LY294002-Gabe durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in Culture Slides ausgesät. Konfluente Zellen wurden für 1 Stunde mit 20 μ M LY294002 und dann für weitere 2 Stunden mit 500 nM Rapamycin behandelt. DMSO-behandelte Zellen bzw. Zellen, die lediglich mit einem der Inhibitoren behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Nach einer insgesamt 3-stündigen Behandlungszeit wurden die Zellen mit 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy bestrahlt und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

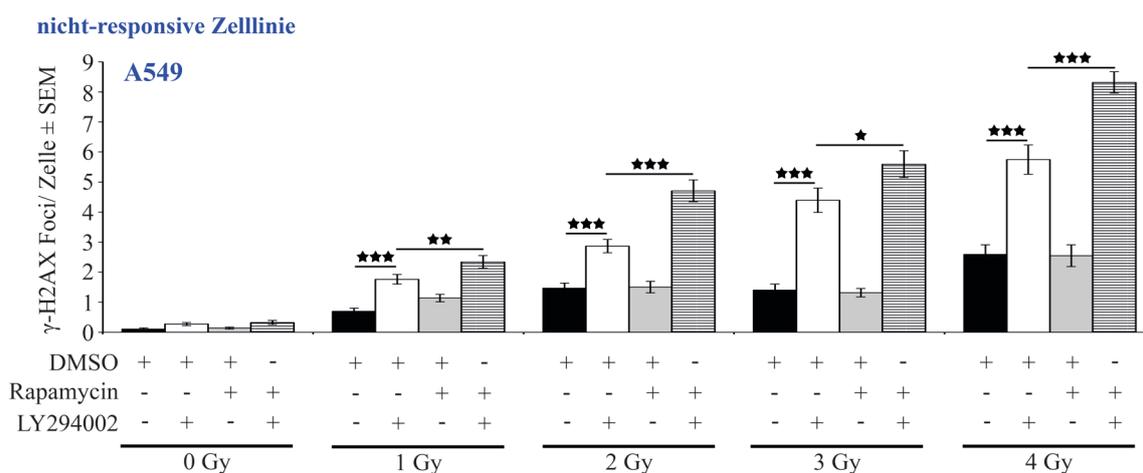


Abb. 3.26: Residuelle DNA-DSB in nicht-responsiven A549 Zellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einer Rapamycin-/LY294002-Kombinationsbehandlung. Gezeigt ist die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 150 ausgezählten Zellkernen/Bedingung entspricht. Die Signifikanz des Effekts einer Singlebehandlung bzw. zwischen einer Single-LY294002- und einer Kombinationsbehandlung wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

In Übereinstimmung mit bereits gezeigten Daten (**Abb. 3.4**, **Abb. 3.20B**) verursacht eine alleinige LY294002-Behandlung in A549 Zellen eine signifikante Erhöhung der residuellen DNA-DSB 24 Stunden nach Bestrahlung, wohingegen nach einer Single-Rapamycin-Behandlung keine Veränderung in der Anzahl der residuellen DNA-DSB zu verzeichnen ist (**Abb. 3.26**). Im Vergleich zu einer Single-LY294002-Behandlung resultiert eine kombinierte Rapamycin-/LY294002-Behandlung nach Bestrahlung mit 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy und 4 Gy in einem signifikant größeren DNA-Restschaden.

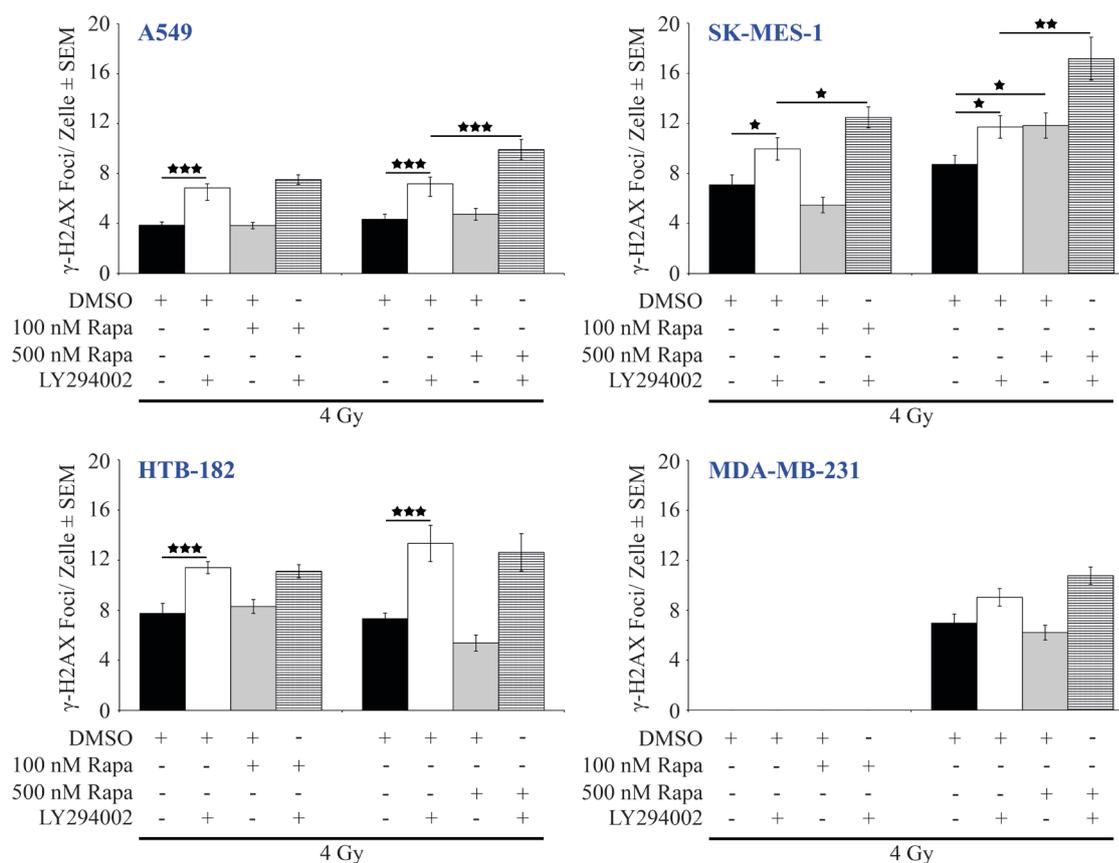
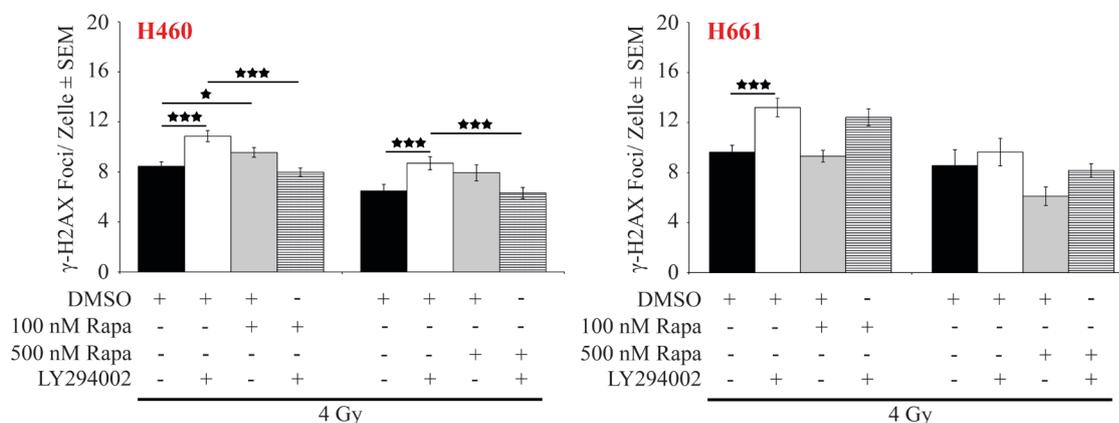
Wie sich eine Kombinationsbehandlung mit Rapamycin und LY294002 auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB auswirkt, wurde nicht nur in nicht-responsiven A549 Zellen, sondern auch in nicht-responsiven SK-MES-1, HTB-182 und MDA-MB-231 Zellen untersucht. Zudem wurde die Reparaturkapazität responsiver H460 und H661 Zellen analysiert. Bei diesen γ -H2AX Focus Assays kam LY294002 in einer Konzentration von 10 μ M und Rapamycin in einer Konzentration von 100 nM und 500 nM zum Einsatz.

Abb. 3.27A zeigt, dass in nicht-responsiven SK-MES-1 Zellen nach einer Kombinationsbehandlung mit 100 nM Rapamycin und 10 μ M LY294002 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy signifikant mehr residuelle DNA-DSB vorhanden sind als in bestrahlten SK-MES-1 Zellen, die lediglich mit LY294002 behandelt wurden. Auch in nicht-responsiven A549 Zellen ist, im Vergleich zu einer alleinigen LY294002-Behandlung, nach einer Rapamycin-/LY294002-Kombinationsbehandlung ein größerer DNA-Restschaden zu verzeichnen. Allerdings ist dieser Effekt in A549 Zellen nicht signifikant. Auffallend ist, dass der Effekt einer Kombinationsbehandlung sowohl in bestrahlten SK-MES-1 als auch in bestrahlten A549 Zellen ausgeprägter ist, wenn Rapamycin in einer höheren Konzentration (500 nM) eingesetzt wird. In diesem Fall ist der Effekt nicht nur in SK-MES-1 Zellen, sondern auch in A549 Zellen signifikant. In nicht-responsiven MDA-MB-231 Zellen sind nach kombinierter Behandlung mit 500 nM Rapamycin und 10 μ M LY294002 ebenfalls tendenziell mehr unreparierte DNA-DSB zu verzeichnen als in Zellen, die nur mit einem Inhibitor behandelt wurden. Diese verminderte Reparaturkapazität nach Kombinationsbehandlung kann mit den Koloniebildungstests, in denen eine synergistische Strahlensensitivierung nach Kombinationsbehandlung beobachtet werden konnte (**Abb. 3.25A**), in Einklang gebracht werden. In nicht-responsiven HTB-182 Zellen bleibt die Anzahl residueller DNA-DSB nach einer Kombinationsbehandlung gegenüber einer Single-LY294002-Behandlung unverändert. In responsiven H460 und H661 Zellen unterscheidet sich das Reparaturmuster merklich von dem in nicht-responsiven Zellen; nach einer kombinierten Rapamycin-/LY294002-Behandlung ist die Anzahl unreparierter DNA-DSB 24 Stunden nach Bestrahlung mit 4 Gy vergleichbar mit der in Kontrollzellen (**Abb. 3.27B**). Diese Beobachtung kann mit dem Koloniebildungstest, in dem nach kombinierter Rapamycin-/LY294002-Behandlung ein additiver Effekt beobachtet werden konnte (**Abb. 3.25B**), nicht zur Deckung gebracht werden.

Im Vergleich zu einer alleinigen LY294002-Behandlung kann nach kombinierter Rapamycin-/LY294002-Behandlung in nicht-responsiven Zellen entweder eine reduzierte oder eine unveränderte DNA-Schadensreparatur nach Strahlenexposition festgestellt werden, während die Reparaturkapazität responsiver Zellen nach einer Kombinationsbehandlung auf noch ungeklärte Weise zunimmt. Auch wenn die Ursachen hierfür noch unklar sind, so ist entscheidend, dass sich nicht-responsive und responsive Zellen bezüglich der Reparatur

strahleninduzierter DNA-DSB nach erfolgter Rapamycin-/LY294002-Behandlung erheblich unterscheiden.

Abb. 3.27: Residuelle DNA-DSB in Tumorzellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einer Rapamycin-/LY294002-Kombinationsbehandlung. (A) Nicht-responsive Zellen. (B) Responsive Zellen. Gezeigt ist die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule bei Experimenten mit 100 nM Rapamycin dem Mittelwert \pm SEM aus 300 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten in A549, 200 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten in H661, 450 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 3 biologischen Replikaten in H460 und 100 ausgezählten Zellkernen/Bedingung in SK-MES-1 und HTB-182 entspricht. Sofern Rapamycin in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt wurde, entspricht jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 150 ausgezählten Zellkernen/Bedingung in A549 und H460, 110 ausgezählten Zellkernen/Bedingung in SK-MES-1, 100 ausgezählten Zellkernen/Bedingung in MDA-MB-231, 90 ausgezählten Zellkernen/Bedingung in HTB-182 und 80 ausgezählten Zellkernen/Bedingung in H661. Die Signifikanz des Effekts einer Singlebehandlung bzw. zwischen einer Single-LY294002- und einer Kombinationsbehandlung wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

A nicht-responsive Zelllinien**B responsive Zelllinien****3.4.2 Kombination von Rapamycin mit dem Akt-Inhibitor MK2206**

Eine Rapamycin-/LY294002-Kombinationstherapie scheint bezüglich der Erhöhung der Radiotoxizität erfolgreich zu sein, da der PI3K-Inhibitor LY294002 aber aufgrund seiner Toxizität keine klinische Relevanz hat, sollten weitere Kombinationsstrategien mit potentieller klinischer Relevanz in Betracht gezogen werden. Der panAkt-Inhibitor MK2206, der sich bereits in klinischer Erprobung befindet, sollte die Rapamycin-bedingte Akt-Aktivität erfolgreich hemmen und so die fehlende Rapamycin-induzierte Strahlensensitivierung wiederherstellen. Wie sich eine Rapamycin-/MK2206-Kombinationstherapie tatsächlich auf

das klonogene Überleben von strahlenexponierten Tumorzellen auswirkt und welchen Einfluss diese Kombinationstherapie auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB hat, wurde im Folgenden getestet.

3.4.2.1 Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/MK2206-Behandlung auf das klonogene Überleben

Um zu untersuchen, wie sich eine Kombination aus Rapamycin und MK2206 auf das klonogene Überleben nicht-responsiver A549 Zellen und responsiver H460 Zellen auswirkt und ob die fehlende/reduzierte Strahlensensitivierung von Rapamycin auf diese Art in nicht-responsiven Zellen wiederhergestellt werden kann, wurden Koloniebildungstests unter kombinierter Rapamycin-/MK2206-Gabe durchgeführt. Hierzu wurden Einzelzellkulturen ausgesät. 24 Stunden später wurden A549 Zellen mit 5 μ M MK2206 und H460 Zellen mit 2,5 μ M MK2206 behandelt. Der MK2206-Behandlung folgte eine Behandlung mit 100 nM Rapamycin für weitere 2 Stunden. DMSO-behandelte Zellen bzw. Zellen, die lediglich mit einem der Inhibitoren behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Nach der insgesamt 3-stündigen Behandlungszeit wurden die Zellen mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung der Inhibitoren wurden die DMF angegeben. Zusätzlich wurden Western Blot Analysen durchgeführt, um die Wirkung der Inhibitoren auf Proteinebene aufzuzeigen.

Wie der Western Blot in **Abb. 3.28A** zeigt, ist es möglich, die Rapamycin-induzierte Zunahme im Akt1-Phosphorylierungslevel, wie sie in nicht-responsiven A549 Zellen zu beobachten ist, mit MK2206 zu inhibieren. In Hinblick auf das klonogene Überleben von A549 Zellen wirkt sich eine kombinierte Rapamycin-/MK2206-Behandlung gegenüber einer Singlebehandlung vorteilhaft aus. Eine Kombinationstherapie erhöht die Strahlentoxizität gegenüber einer Singlebehandlung signifikant. Der DMF liegt bei einer kombinierten Rapamycin-/MK2206-Behandlung in A549 Zellen bei 2,85, während dieser bei alleiniger Rapamycin-Behandlung bei 1,21 und bei alleiniger MK2206-Behandlung bei 1,03 liegt. In responsiven H460 Zellen wird mit einer Kombinationstherapie ein additiver Effekt erzielt (**Abb. 3.28B**). Hier beträgt der DMF bei Kombinationsbehandlung 2,39, bei Single-Rapamycin-Behandlung 1,44 und bei Single-MK2206-Behandlung 1,48.

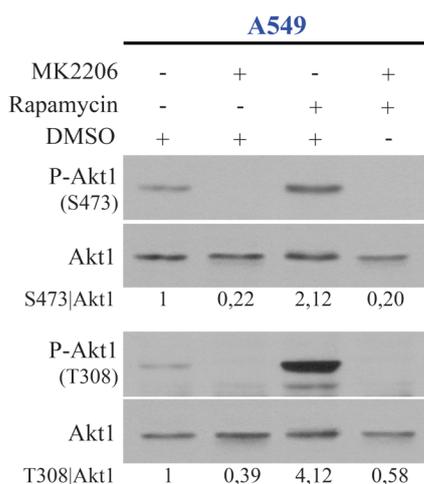
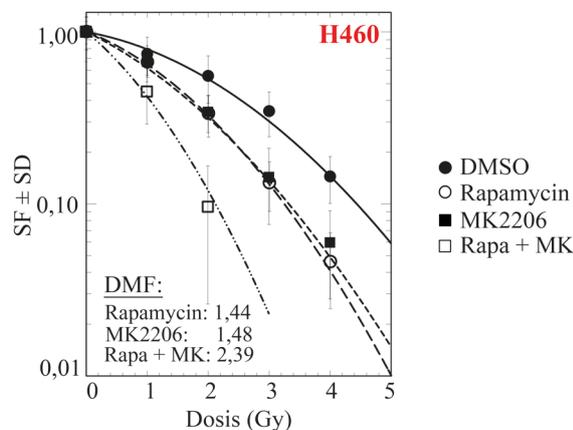
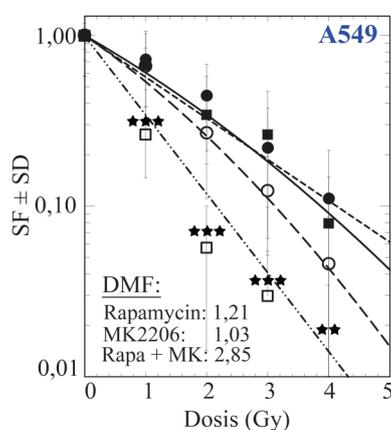
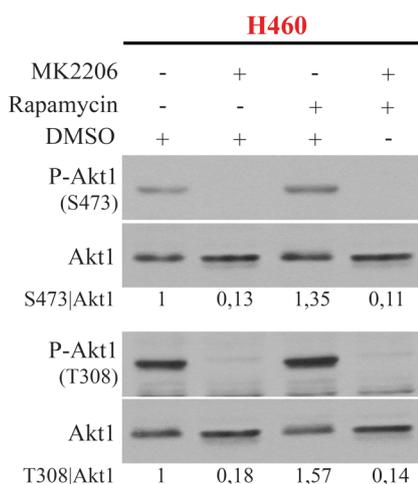
A nicht-responsive Zelllinie**B responsive Zelllinie**

Abb. 3.28: Kombinierte Rapamycin-/MK2206-Behandlung zur Wiederherstellung der fehlenden Rapamycin-induzierten strahlensensitivierenden Wirkung in Tumorzellen. (A) Nicht-responsive Zellen. (B) Responsive Zellen. Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot, wobei die densitometrische Auswertung dem Mittelwert des Quotienten aus P-Akt1 und Akt1 von 2 biologischen Replikaten, normiert auf 1 in Kontrollzellen, entspricht. Bei den Koloniebildungstests entspricht jeder Datenpunkt der mittleren SF ± SD aus 18 Datenpunkten von 3 biologischen Replikaten in A549 und 12 Datenpunkten von 2 biologischen Replikaten in H460. Die Signifikanz des Effekts zwischen einer Single- und einer Kombinationsbehandlung wurde in nicht-responsiven Zellen mittels Student's *t*-Test ermittelt (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

3.4.2.2 Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/MK2206-Behandlung auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

Ob die erhöhte Strahlensensitivierung nach kombinierter Rapamycin-/MK2206-Behandlung auf eine im Vergleich zur Single-Behandlung verminderte Kapazität der Tumorzellen für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB zurückzuführen ist, sollte anhand von γ -H2AX Focus Assays unter kombinierter Rapamycin-/MK2206-Gabe untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen in Culture Slides ausgesät. Konfluente A549 Zellen wurden zunächst für 1 Stunde mit 5 μ M MK2206 und H460 Zellen mit 2,5 μ M MK2206 behandelt, gefolgt von einer 2-stündigen Behandlung mit 100 nM Rapamycin. DMSO-behandelte Zellen bzw. Zellen, die lediglich mit einem der Inhibitoren behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Nach einer insgesamt 3-stündigen Behandlungszeit wurden die Zellen mit 0 Gy, 2 Gy und 4 Gy

bestrahlt und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

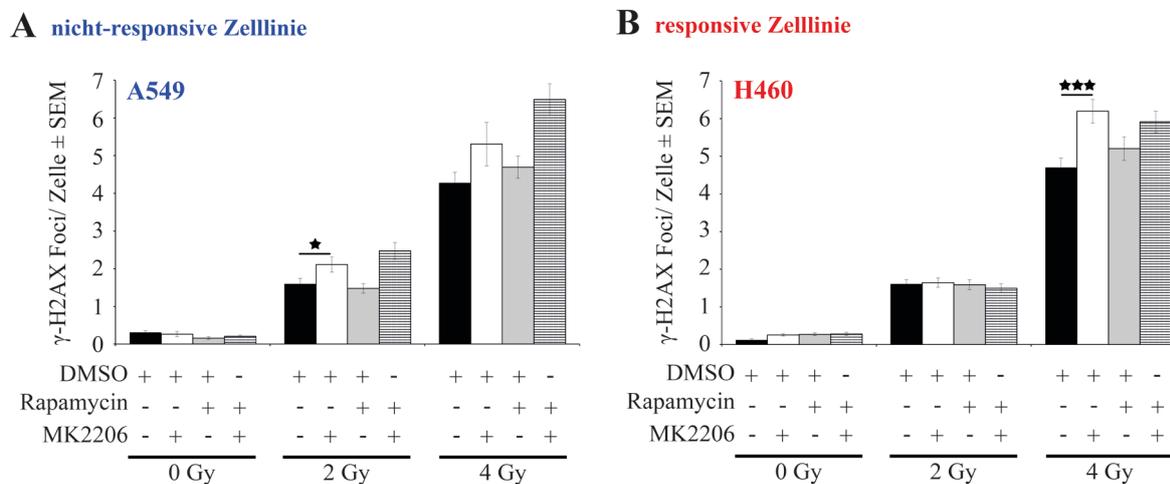


Abb. 3.29: Residuelle DNA-DSB in Tumorzellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einer Rapamycin-/MK2206-Kombinationsbehandlung. (A) Nicht-responsive Zellen. (B) Responsive Zellen. Gezeigt ist die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 300 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten entspricht. Die Signifikanz des Effekts einer Singlebehandlung bzw. zwischen einer Single-MK2206- und einer Kombinationsbehandlung wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$).

Wie bereits in **Abb. 3.7** dargestellt, verursacht MK2206 in A549 Zellen eine Erhöhung der residuellen DNA-DSB 24 Stunden nach Bestrahlung (**Abb. 3.29A**). Wie in **Abb. 3.20B** gezeigt, bewirkt eine alleinige Rapamycin-Behandlung in A549 Zellen keine Veränderung in der Anzahl residueller DNA-Schäden. Eine kombinierte Rapamycin-/MK2206-Behandlung tendiert dazu, die Reparaturkapazität von A549 Zellen im Vergleich zu einer Singlebehandlung herabzusetzen. Der Effekt ist allerdings nicht signifikant. In responsiven H460 Zellen ist die Anzahl unreparierter DNA-DSB nach einer kombinierten Rapamycin-/MK2206-Behandlung vergleichbar mit der in Kontrollzellen (**Abb. 3.29B**). Diese Beobachtung geht zwar nicht mit den Koloniebildungstest-Ergebnissen (**Abb. 3.28B**) konform, harmonisiert jedoch gut mit den γ -H2AX-Ergebnissen unter kombinierter Rapamycin-/LY294002-Gabe (**Abb. 3.27B**).

3.4.3 Kombination von Rapamycin mit einem AKT1-Knockdown

Die Ergebnisse einer kombinierten Rapamycin-/MK2206-Behandlung zur Wiederherstellung der fehlenden/abgeschwächten Rapamycin-induzierten strahlensensitivierenden Wirkung in nicht-responsiven Zellen sind zwar durchaus positiv, das Ausmaß des Effekts aber nicht zufriedenstellend. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, nehmen die Akt-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 unterschiedliche Rollen bezüglich der Strahlenantwort von Tumorzellen und der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden ein. Während Akt2 hierfür

weniger von Bedeutung ist, scheinen Akt1 und Akt3 das klonogene Überleben nach Strahlenexposition merklich zu verbessern und für eine erfolgreiche Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB unerlässlich zu sein. Bekanntlich hemmt der Akt-Inhibitor MK2206 alle drei Isoformen, was erklären kann, warum eine Kombination von Rapamycin mit MK2206 nicht die erhoffte Wirkung mit sich bringt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass Rapamycin eine Zunahme im Phosphorylierungssignal der Akt1-Isoform bewirkt. Dem Phosphorylierungszustand der beiden anderen Akt-Isoformen wurde in dieser Arbeit keine Beachtung geschenkt. Demnach sollte als nächstes untersucht werden, ob durch temporäre und stabile Hemmung der Akt1-Isoform der fehlende/minimierte strahlensensitivierende Effekt von Rapamycin in nicht-responsiven Zellen wiederhergestellt werden kann und, wenn dies der Fall ist, ob dieser Effekt durch eine Hemmung der Reparaturreffizienz strahleninduzierter DNA-Schäden bedingt ist.

3.4.3.1 Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/AKT1-Knockdown-Behandlung auf das klonogene Überleben

3.4.3.1.1 Akt1-Herunterregulation durch siRNA

Für die temporäre Hemmung der Akt1-Proteinexpression wurden nicht-responsive A549 und responsive H460 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden später, als die Zellen 80 % konfluent waren, wurden diese mit siRNA transfiziert. In A549 Zellen wurde die siRNA gegen AKT1 bzw. die non-targeting siRNA zu Kontrollzwecken in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt; in H460 Zellen wurden 150 nM transfiziert. Zur Überprüfung der Knockdown-Effizienz wurden nach 2 Tagen und 6 bzw. 7 Tagen Gesamtzellextrakte hergestellt, welche mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden. Ebenfalls 2 Tage nach der Transfektion wurden Koloniebildungstests durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen abtrypsiniert, in Einzelzellsuspensionen ausgesät und 24 Stunden später mit 100 nM Rapamycin behandelt. DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle. 2 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt und mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung der Behandlungen wurden die DMF angegeben.

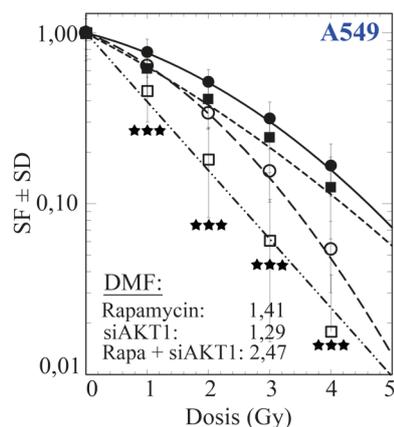
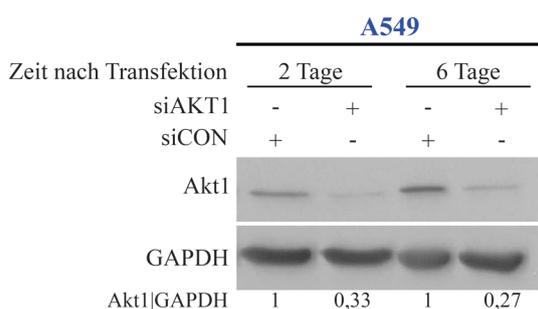
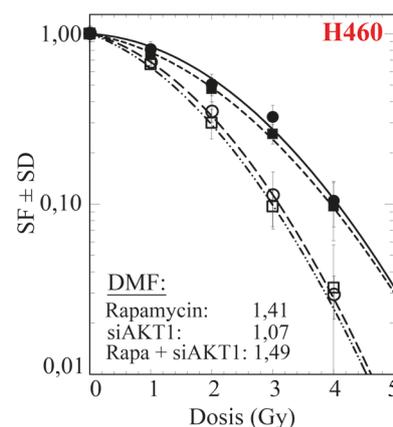
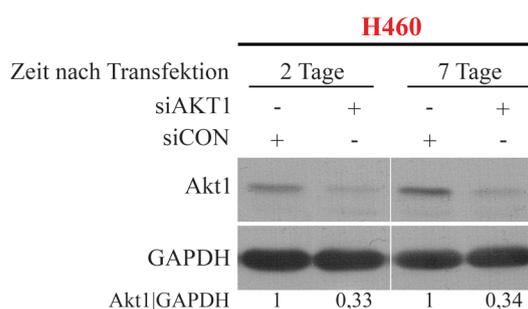
A nicht-responsive Zelllinie**B responsive Zelllinie**

Abb. 3.30: Kombinierte Rapamycin-/siAKT1-Knockdown-Behandlung zur Wiederherstellung der fehlenden Rapamycin-induzierten strahlensensitivierenden Wirkung in Tumorzellen. (A) Nicht-responsive Zellen. (B) Responsive Zellen. Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot, wobei die densitometrische Auswertung dem Mittelwert des Quotienten aus Akt1 und GAPDH von 3 biologischen Replikaten, normiert auf 1 in Kontrollzellen, entspricht. Bei den Koloniebildungstests entspricht jeder Datenpunkt der mittleren SF \pm SD aus 21 Datenpunkten von 4 biologischen Replikaten in A549 und 6 technischen Replikaten in H460. Die Signifikanz des Effekts zwischen einer Single- und einer Kombinationsbehandlung wurde in nicht-responsiven Zellen mittels Student's *t*-Test ermittelt (***, $P < 0,001$).

Die temporäre Hemmung der Akt1-Proteinexpression in A549 Zellen ist in **Abb. 3.30A** dargestellt. Eine Knockdown-Effizienz von 67 % 2 Tage nach Transfektion bzw. 73 % 6 Tage nach Transfektion gilt in A549 Zellen als äußerst erfolgreich. Eine Rapamycin-Behandlung kombiniert mit einem AKT1-Knockdown führt in A549 Zellen zu einer signifikant erhöhten Strahlensensitivierung im Vergleich zu Zellen, in denen lediglich die Akt1-Expression bzw. mTOR gehemmt wird. In H460 Zellen kann mit 50 nM siRNA nicht die gewünschte Knockdown-Effizienz erreicht werden (Daten nicht gezeigt), allerdings kommt es bei Einsatz der siRNA in einer Konzentration von 150 nM zu einer Knockdown-Effizienz von 67 % 2 Tage nach Transfektion bzw. 66 % 7 Tage nach Transfektion (**Abb. 3.30B**). Eine kombinierte Rapamycin-/siAKT1-Knockdown-Behandlung resultiert in einem additiven Effekt in Bezug auf das klonogene Überleben strahlenexponierter H460 Zellen. Der DMF einer alleinigen Rapamycin-Behandlung liegt bei 1,41, der einer alleinigen siAKT1-Behandlung bei 1,07. Bei einer kombinierten mTOR-/AKT1-Hemmung beträgt der DMF 1,49.

3.4.3.1.2 Akt1-Herunterregulation durch shRNA

Die siRNA-Ergebnisse aus Kapitel 3.4.3.1.1 sollten in nicht-responsiven MDA-MB-231 Zellen, in denen die Akt1-Expression mittels shRNA stabil gehemmt ist, verifiziert werden. Hierzu wurden Einzelzellkulturen ausgesät, die 24 Stunden später mit 100 nM Rapamycin bzw. DMSO behandelt, 2 Stunden später mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 Gy bis 4 Gy bestrahlt und schließlich mehrere Tage im Brutschrank inkubiert wurden. Die gebildeten Kolonien wurden gefärbt und ausgezählt. Die Überlebensrate wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt und zur Einschätzung der Wirkung der verschiedenen Behandlungen wurden die DMF angegeben. Um die Qualität des stabilen Knockdowns zu überprüfen, wurden zudem Gesamtzellextrakte hergestellt, welche mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert wurden.

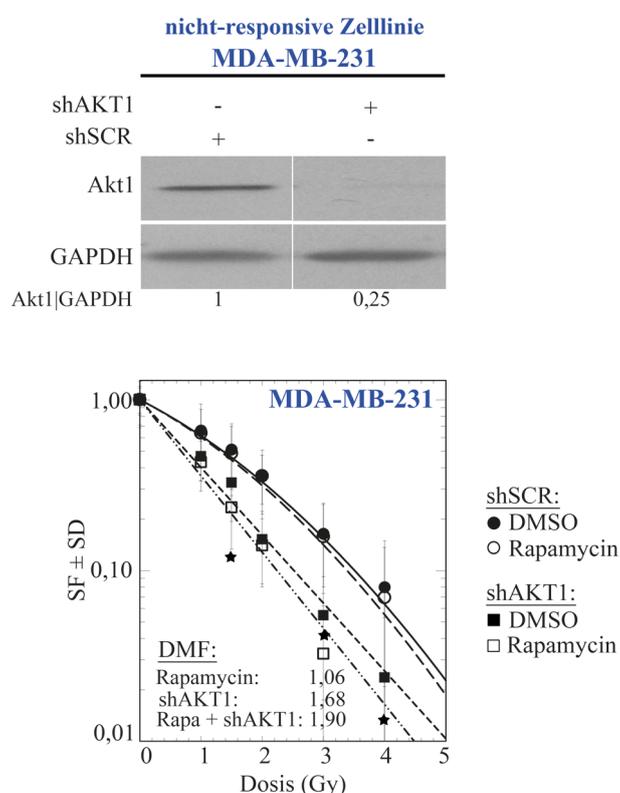


Abb. 3.31: Kombinierte Rapamycin/shAKT1-Knockdown-Behandlung zur Wiederherstellung der fehlenden Rapamycin-induzierten strahlensensitivierenden Wirkung in nicht-responsiven MDA-MB-231 Zellen. Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot, wobei die densitometrische Auswertung dem Mittelwert des Quotienten aus Akt1 und GAPDH von 2 biologischen Replikaten, normiert auf 1 in Kontrollzellen, entspricht. Beim Koloniebildungstest entspricht jeder Datenpunkt der mittleren SF ± SD aus 18 Datenpunkten von 3 biologischen Replikaten. Die Signifikanz des Effekts zwischen einer Single-shAKT1- und einer Kombinationsbehandlung wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$).

Abb. 3.31 zeigt, dass die Akt1-Proteinexpression in stabil transfizierten MDA-MB-231 Zellen zu 75 % gehemmt wird. Ebenso wie in den zuvor gezeigten Rapamycin-/siAKT1-Koloniebildungstests (**Abb. 3.30A**) führt auch die Kombination von Rapamycin mit einem stabilen AKT1-Knockdown zu einer signifikant erhöhten Strahlensensitivierung im Vergleich

zu einfach behandelten Zellen. Der DMF bei kombinierter mTOR- und stabiler Akt1-Hemmung liegt bei 1,90, der einer alleinigen Rapamycin-Behandlung liegt bei 1,06 und ein stabiler AKT1-Knockdown resultiert in einem DMF von 1,68.

3.4.3.2 Einfluss einer kombinierten Rapamycin-/AKT1-Knockdown-Behandlung auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

3.4.3.2.1 Akt1-Herunterregulation durch siRNA

Ob die erhöhte Strahlensensitivierung nach kombinierter Rapamycin-/siAKT1-Knockdown-Behandlung auf eine im Vergleich zur Singlebehandlung verminderte Kapazität der Tumorzellen für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB zurückzuführen ist, sollte anhand von γ -H2AX Focus Assays unter kombinierter Rapamycin-/siAKT1-Gabe untersucht werden. Hierzu wurden A549 und H460 Zellen in Culture Slides ausgesät. 24 Stunden später und bei einer Konfluenz von 80 % wurden A549 Zellen mit 50 nM siRNA gegen AKT1 sowie mit non-silencing siRNA zu Kontrollzwecken transfiziert. H460 Zellen erhielten 150 nM siRNA. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 nM Rapamycin bzw. DMSO behandelt und 2 Stunden später mit 0 Gy und 4 Gy bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

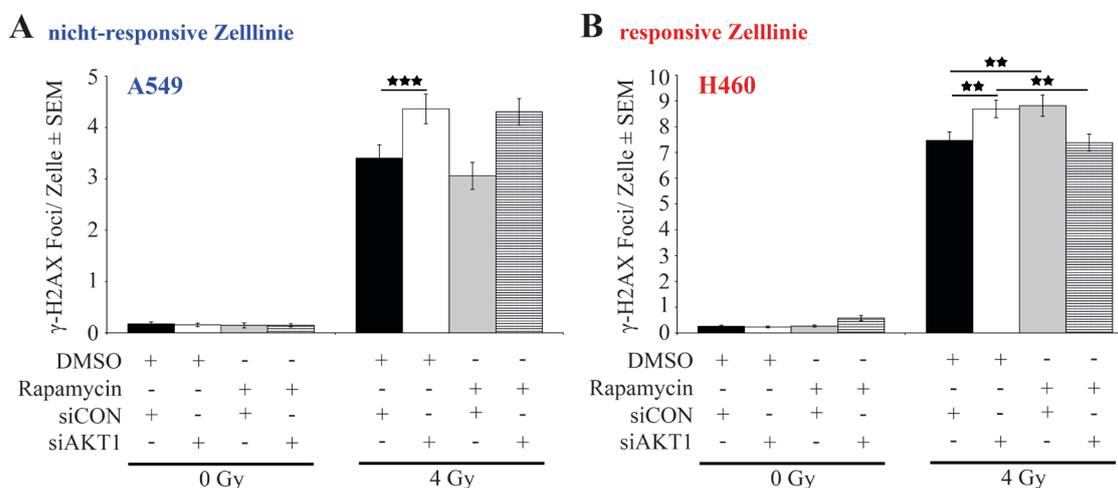


Abb. 3.32: Residuelle DNA-DSB in Tumorzellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einer Rapamycin-/siAKT1-Kombinationsbehandlung. (A) Nicht-responsive Zellen. (B) Responsive Zellen. Gezeigt ist die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 800 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 4 biologischen Replikaten in A549 und 300 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 2 biologischen Replikaten in H460 entspricht. Die Signifikanz des Effekts einer Singlebehandlung bzw. zwischen einer Single-siAKT1- und einer Kombinationsbehandlung wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Wie bereits gezeigt (**Abb. 3.10**), sind nach temporärer Akt1-Hemmung und 24 Stunden nach Bestrahlung in A549 Zellen signifikant mehr DSB zu verzeichnen als dies in Kontrollzellen der Fall ist (**Abb. 3.32A**). In Übereinstimmung mit den bereits gezeigten Ergebnissen (**Abb. 3.20B**) hat eine alleinige Rapamycin-Behandlung auf die Anzahl residueller DSB keine Auswirkungen. Anders als bei einer kombinierten Rapamycin-/LY294002- und Rapamycin-/MK2206-Behandlung (**Abb. 3.26, Abb. 3.27A, Abb. 3.29A**) ist die Anzahl unreparierter DNA-Schäden nach kombinierter Rapamycin-/siAKT1-Behandlung nicht erhöht. In responsiven H460 Zellen stimmt das Reparaturmuster nach einer erfolgten Rapamycin-/siAKT1-Kombinationsbehandlung mit dem einer Rapamycin-/LY294002 und Rapamycin-/MK2206-Kombinationsbehandlung (**Abb. 3.27B, Abb. 3.29B**) überein; nach Kombinationsbehandlung ist die Anzahl residueller DSB mit der in Kontrollzellen vergleichbar (**Abb. 3.32B**).

3.4.3.2.2 Akt1-Herunterregulation durch shRNA

Zur Verifizierung der siRNA-Ergebnisse des γ -H2AX Focus Assays (**Abb. 3.32A**) wurden Versuche mit stabil transfizierten MDA-MB-231 AKT1-Knockdown Zellen durchgeführt. Zellen mit shSCR dienten als Kontrolle. Hierzu wurden die Zellen in Culture Slides ausgesät. Konfluente Zellen wurden mit 100 nM Rapamycin bzw. DMSO behandelt und 2 Stunden später mit 0 Gy, 2 Gy und 4 Gy bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden residuelle DNA-DSB mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert, fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und quantifiziert.

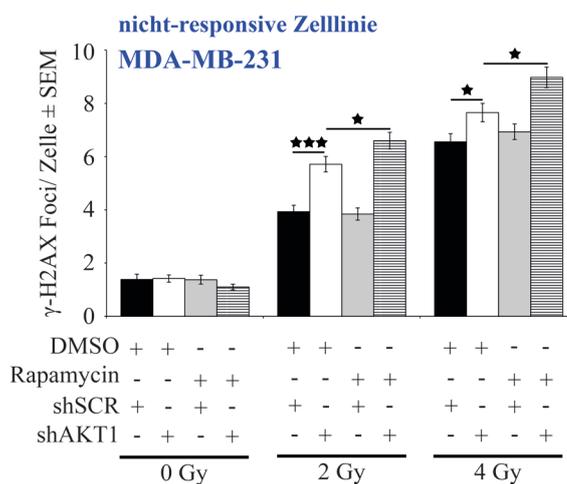


Abb. 3.33: Residuelle DNA-DSB in nicht-responsiven MDA-MB-231 Zellen 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in Kombination mit einer Rapamycin-/shAKT1-Kombinationsbehandlung. Gezeigt ist die grafische Darstellung der γ -H2AX Foci, wobei jede Säule dem Mittelwert \pm SEM aus 328 bis 400 ausgezählten Zellkernen/Bedingung von 3 biologischen Replikaten entspricht. Die Signifikanz des Effekts einer Singlebehandlung bzw. zwischen einer Single-shAKT1- und einer Kombinationsbehandlung wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (*, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$).

In Übereinstimmung mit bereits gezeigten Ergebnissen (**Abb. 3.11, Abb. 3.20B**) ist die Anzahl residueller DNA-DSB nach alleinigem AKT1-Knockdown 24 Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant erhöht, während sich eine alleinige Rapamycin-Behandlung auf den DNA-Restschaden in MDA-MB-231 Zellen nicht auswirkt. Nach einer kombinierten Rapamycin-/shAKT1-Behandlung sind signifikant mehr residuelle DNA-DSB zu beobachten als in Zellen, die lediglich mit shAKT1 behandelt wurden (**Abb. 3.33**). Dies geht mit den Ergebnissen des Koloniebildungstests (**Abb. 3.31**) konform.

4 DISKUSSION

Die Strahlentherapie ist eine wesentliche Strategie zur Behandlung von malignen Tumorerkrankungen, deren Erfolgsrate u. a. durch die strahleninduzierte EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade geschmälert wird. Dieser Signalweg spielt bei der Vermittlung einer Strahlenresistenz in Tumorzellen eine entscheidende Rolle. Um der immensen Anzahl an Tumorpatienten weiter gerecht zu werden, ist man gewillt, die Radiotoxizität der Strahlentherapie durch molekular zielgerichtete Therapeutika, die gegen einzelne Komponenten der Signalkaskade gerichtet sind, zu verstärken. Tatsächlich zeigte die Anwendung solcher Targeting Strategien gegen Komponenten der EGFR-vermittelten PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade bereits in präklinischen Studien und im klinischen Einsatz vielversprechende Erfolge.

4.1 Molekulares Targeting von PI3K/Akt

In dieser Arbeit lag das Augenmerk zunächst auf den Knotenpunkten PI3K sowie panAkt, Akt1, Akt2 und Akt3, die mittels geeigneten molekularen Targeting Strategien (pharmakologische Inhibitoren, siRNA und/oder shRNA) bezüglich ihrer Bedeutung für das klonogene Überleben nach Bestrahlung sowie für die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB analysiert wurden (**Abb. 4.1**).

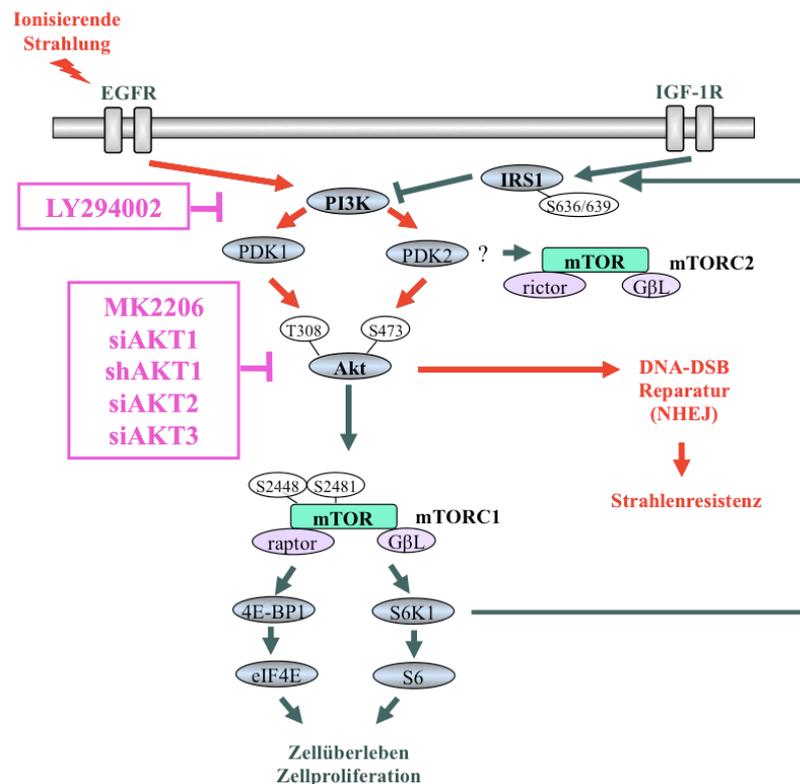


Abb. 4.1: Molekulares Targeting von PI3K und Akt. PI3K wurde mit dem pharmakologischen Inhibitor LY294002 und panAkt mit dem pharmakologischen Inhibitor MK2206 gehemmt. Die einzelnen Akt-Isoformen wurden genetisch moduliert: AKT1 mittels siRNA und shRNA, AKT2 und AKT3 mittels siRNA. Mit Hilfe dieses gezielten Targetings wurde untersucht, ob PI3K und Akt für das klonogene Überleben nach Bestrahlung eine Rolle spielen und möglicherweise auch in die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB involviert sind.

4.1.1 Die durch PI3K-Targeting bedingte Strahlensensitivierung ist durch die Hemmung der DNA-DSB-Reparatur bedingt

Viele Studien belegen, dass der PI3K/Akt-Signalweg nicht nur eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellproliferation und des Zellüberlebens spielt, sondern auch ganz entscheidend mit der Strahlenresistenz verschiedener Tumorzelllinien assoziiert ist. In der Literatur wurde ganz anschaulich gezeigt, dass die Hemmung der PI3K durch den pharmakologischen Hemmstoff LY294002 eine effektive Methode darstellt, um Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung zu sensitivieren. Eine derartige LY294002-induzierte Strahlensensitivierung wurde nicht nur *in vitro* in Glioblastom- (Kao *et al.*, 2007), Kopf-Hals-Tumor- (Gupta *et al.*, 2002), Blasenkarzinom- und Kolonkarzinom- (Gupta *et al.*, 2001), Mammakarzinom- (No *et al.*, 2009) und Zervixkarzinomzellen (Lee *et al.*, 2006) beobachtet. Auch in T24-Xenograft-Modellen konnte die Effizienz der Strahlentherapie durch den PI3K-Inhibitor verstärkt werden (Gupta *et al.*, 2003). Des Weiteren zeigten Choi und Kollegen in den NSCLC-Zelllinien A549 und H460, dass das Akt-Phosphorylierungslevel durch eine LY294002-Behandlung signifikant reduziert wird, was schließlich das zelluläre Überleben nach Strahlenexposition erschwert (Choi *et al.*, 2010). In Anlehnung an diese Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit mit verschiedenen Tumorzellen Koloniebildungstests unter

LY294002-Gabe durchgeführt und es konnte ebenfalls eine signifikant strahlensensitivierende Wirkung von 10 μM LY294002 in den Lungenkarzinomzelllinien A549 und H460 nachgewiesen werden (**Abb. 3.2**). Hinzu kam eine LY294002-induzierte Erhöhung der Strahlentoxizität in der NSCLC-Zelllinie HTB-182 und der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. Lediglich in der Lungenkarzinomzelllinie SK-MES-1 zeigten 10 μM LY294002 keine strahlensensitivierende Wirkung; mit höheren LY294002-Konzentrationen konnte jedoch sehr wohl die Radiotoxizität der Strahlentherapie verstärkt werden.

Von großem Interesse war, wie der PI3K-Inhibitor LY294002 diese zelluläre Strahlensensitivierung bewirkt. Eine Möglichkeit besteht darin, dass sich bestrahlte Zellen nach verabreichter LY294002-Behandlung in strahlensensitivere Phasen des Zellzyklus umverteilen. Grundlage hierfür ist die Tatsache, dass die Strahlenempfindlichkeit sehr stark zellzyklusabhängig ist (Sinclair *et al.*, 1969). Für A549 und SKBR3 Zellen wurde gezeigt, dass diese i. d. R. nach Bestrahlung in der G₂/M-Phase arretieren, um die Zelltodrate möglichst klein zu halten. Bei Behandlung dieser Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 konnte diese G₂/M-Arretierung aufgehoben werden, was zur Folge hatte, dass sich die Zellen sehr viel früher in strahlenempfindlichere Zellzyklusphasen begaben (No *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010). In anderen Studien konnte allerdings keine signifikante Auswirkung des Inhibitors auf den Zellzyklus beobachtet werden (Lee *et al.*, 2006).

Zelllinienabhängig wurde weiterhin beobachtet, dass die Kombination aus LY294002 und ionisierender Strahlung die Apoptose begünstigt und schließlich zum Zelltod führt (Edwards *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006). Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass der strahleninduzierte Zelltod, zumindest in soliden Tumoren, nicht immer mit der Apoptoserate korreliert (Brown *et al.*, 1999; Sheridan *et al.*, 2001), sondern dass die mitotische Katastrophe eine sehr viel wichtigere Rolle spielt.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Beeinträchtigung der DNA-Schadensreparatur via NHEJ als möglicher Mechanismus für die LY294002-vermittelte Strahlensensitivierung beleuchtet. H2AX ist ein Histon, das infolge der Bildung strahleninduzierter DNA-DSB von ATM und DNA-PK an S139 phosphoryliert wird (Rogakou *et al.*, 1998; Burma *et al.*, 2001; Redon *et al.*, 2002; Stiff *et al.*, 2004). Diese Phosphorylierungsreaktion ereignet sich innerhalb kürzester Zeit. So stellt die Messung der so genannten γ -H2AX Foci eine sensitive und spezifische Methode dar, um unreparierte DNA-DSB zu messen. Im Normalfall ist die Reparatur spätestens 24 Stunden nach Bestrahlung abgeschlossen. Wie in γ -H2AX Focus Assays gezeigt, konnte im Rahmen dieser Arbeit die Kapazität aller untersuchter Zelllinien (A549, SK-MES-1, HTB-182, H460, H661, MDA-MB-231) für die DNA-DSB-Reparatur durch LY294002-Gabe signifikant unterdrückt werden (**Abb. 3.4**). Während 24 Stunden nach Bestrahlung in Kontrollzellen nahezu alle Foci repariert waren, war die Anzahl unreparierter DNA-DSB zur gleichen Zeit in LY294002-behandelten Zellen signifikant höher. Bereits veröffentlichte Daten in A549, SKBR3 und U251 Zellen unterstreichen diese Beobachtung (Toulany *et al.*, 2006; Kao *et al.*, 2007; No *et*

al., 2009; Choi *et al.*, 2010). Ob LY294002 bereits in die Induktion der Focibildung eingreift oder lediglich dafür sorgt, dass die Foci in LY294002-behandelten Zellen über einen längeren Zeitraum bestehen bleiben, ist noch nicht eindeutig geklärt; die Meinungen dazu sind widersprüchlich. Während ein Western Blot aus Arbeiten von Toulany und Kollegen zeigt, dass eine LY294002-Behandlung in KRAS-mutierten A549 und MDA-MB-231 Zellen mit einer Reduktion im γ -H2AX-Phosphorylierungslevel einhergeht (Toulany *et al.*, 2006), zeigt eine andere Studie bezüglich der Induktion der Foci in Kontroll- und LY294002-behandelten Zellen keine Unterschiede (Kao *et al.*, 2007). Die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden könnte in LY294002-behandelten Zellen über zwei Wege beeinflusst werden: zum einen könnte der NHEJ-Prozess durch die LY294002-bedingte Hemmung der γ -H2AX-Phosphorylierung S139 beeinträchtigt und dadurch die Bereitstellung von NHEJ-Proteinen am Strangbruch unterbunden werden; zum anderen könnte LY294002 aber auch die DNA-PKcs-Phosphorylierung T2609 hemmen und dadurch deren enzymatische Aktivität blockieren (Toulany *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2010). DNA-PKcs ist das Schlüsselenzym bei der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB via NHEJ.

4.1.2 Hemmung von panAkt, Akt1, Akt2 und Akt3 führt zu isoformspezifischen Unterschieden bezüglich des zellulären Überlebens nach Bestrahlung und scheint mit der Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB zu korrelieren

Es wurde gezeigt, dass Akt – als downstream Effektor der PI3K – in der Vermittlung der zellulären Strahlenresistenz eine entscheidende Rolle spielt. Akt ist eine Serin/Threoninkinase, die in den drei Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 vorkommt (Dummler *et al.*, 2007) und entscheidend an der Tumorentstehung, Progression und Malignität beteiligt ist (Bellacosa *et al.*, 2004; Altomare *et al.*, 2005). Hyperaktivierte Akt korreliert mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern, wobei in diesem Zusammenhang die Akt1-Isoform besonders gut untersucht ist. So konnte in immunhistochemischen Analysen gezeigt werden, dass aktivierte Akt1 in Kopf-Hals-Tumor-Patienten (Gupta *et al.*, 2002) und in Patienten mit fortgeschrittenem Zervixkarzinom (Kim *et al.*, 2006) eine Strahlenresistenz prognostiziert und auch in anderen Tumorentitäten als Prädiktor für eine schlechte Prognose dient (Ringel *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005; Robertson, 2005; Dobashi *et al.*, 2012). Bestätigt werden diese Ergebnisse durch eine Studie, in der konstitutiv aktive Akt in Lungenkarzinom- oder Gallengangkrebszellen überexprimiert wurde (Brognard *et al.*, 2001; Tanno *et al.*, 2004). Außerdem konnten viele Tumorzellen (u. a. A549, H460, SKBR3, MCF-7, DU145, HT1080) durch pharmakologische Inhibition der Proteinkinase strahlensensitiviert werden (Toulany *et al.*, 2008; No *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Toulany *et al.*, 2012). Akt-Inhibitoren wie API, SH-5 und Akt inhibitor VIII erwiesen sich dabei als erfolgreich. In der vorliegenden Arbeit wurde der Akt-Inhibitor MK2206 bezüglich seiner strahlensensitivierenden Wirkung untersucht (**Abb. 3.5**). Dazu wurden in A549 und H460 Zellen Koloniebildungstests unter MK2206-Gabe durchgeführt. MK2206 ist ein panAkt-

Inhibitor, d. h. er hemmt alle drei Akt-Isoformen (IC_{50} von Akt1/2/3: 8/12/65 nM). Es zeigte sich, dass MK2206 sowohl in A549 als auch in H460 Zellen die Radiotoxizität erhöht. In A549 Zellen waren dazu jedoch deutlich höhere Inhibitorkonzentrationen nötig.

Es ist bisher nicht geklärt, ob die verschiedenen Akt-Isoformen bezüglich des zellulären Überlebens nach Bestrahlung konform oder gar konträr agieren und isoformspezifische Einzeleffekte möglicherweise durch einen panAkt-Inhibitor maskiert werden. Demnach schienen Studien, bei denen jede einzelne Akt-Isoform gezielt gehemmt wird, sinnvoll. Für Akt1 gibt es in diesem Zusammenhang weiterführende Literatur. Mehrere Studien belegen, dass durch genetische Modulation der Akt1-Isoform eine Strahlensensitivierung erreicht wurde (Fraser *et al.*, 2011; Cerniglia *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels shRNA-Analyse in MDA-MB-231 Zellen (**Abb. 3.9B**) und mittels siRNA-Analyse in A549 (**Abb. 3.8B**), nicht jedoch in H460 Zellen (**Abb. 3.30B**), bestätigt werden. Welche Rolle die beiden Isoformen Akt3 und Akt2 spielen, wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb diese beiden Isoformen genetisch moduliert. Ähnlich wie ein AKT1-Knockdown erhöht ein temporärer AKT3-Knockdown die Toxizität der Strahlentherapie in A549 Zellen (**Abb. 3.12**). Im Gegensatz dazu hatte eine erfolgreiche Hemmung der Akt2-Proteinexpression keinen nennenswerten Effekt auf das klonogene Überleben bestrahlter A549 Zellen (**Abb. 3.14**).

Die Durchführung der siAKT1-, siAKT2 und siAKT3-Koloniebildungstests erfolgte auf drei unterschiedliche Arten: die Aussaat der Zellen erfolgte entweder 24 Stunden vor Bestrahlung oder aber 2 Stunden bzw. 24 Stunden nach Bestrahlung. Die Tatsache, dass es bei variiertem Durchführen der Koloniebildungstests zu leicht differierenden Ergebnissen kam, wurde in der Literatur schon beschrieben (Franken *et al.*, 2006). Überzeugend – und deshalb auch im Rahmen dieser Arbeit die dominierende – ist die Methode, bei der die Zellen 24 Stunden vor Bestrahlung ausgesät wurden. In diesem Fall verblieb der Inhibitor/die siRNA während der mehrtägigen Inkubation im Medium, so dass diese Methode dem physiologischen Zustand eines behandelten Tumorpatienten näher kommt als die beiden anderen Methoden, bei denen die Aussaat nach der Bestrahlung und somit unter Inhibitor-/siRNA-Entfernung erfolgte.

Dass Akt für das zelluläre Überleben nach Bestrahlung eine entscheidende Rolle spielt, wurde gezeigt. Unverstanden bleibt jedoch, über welche spezifischen Mechanismen Akt die Klonogenität der Zellen beeinflusst. Es wird vermutet, dass die Autophagie eine Rolle spielen könnte. Dementsprechend wurde gezeigt, dass die Hemmung von Akt in malignen Gliomzellen eine Autophagie-bedingte strahlensensitivierende Wirkung mit sich bringt (Fujiwara *et al.*, 2007). Zu unterscheiden ist diese zytotoxische Wirkung der Akt-induzierten Autophagie von der zytoprotektiven Wirkung der strahleninduzierten Autophagie (Toulany, 2013).

Außerdem ging man lange Zeit davon aus, dass bei der Akt-Inhibition – ebenso bei der PI3K-Inhibition – das zelluläre Sterben nach Bestrahlung durch apoptotische Prozesse begünstigt wird, d. h. pro-apoptotische Proteine werden infolge einer PI3K-/Akt-Hemmung aktiviert,

ebenso werden anti-apoptotische Proteine herunterreguliert. Dieser Mechanismus scheint hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen wie beispielsweise Leukämiezellen aufzutreten, nicht jedoch in soliden Tumoren (Martelli *et al.*, 2003; Lo Nigro *et al.*, 2007).

Wie von Toulany und Kollegen gezeigt wurde, resultiert eine Hemmung der Proteinkinase Akt weder in apoptosesensitiven noch in apoptoseresistenten NSCLC-Zellen in einer erhöhten strahleninduzierten Apoptoserate (Toulany *et al.*, 2008). Vielmehr führt die Akt-Hemmung zu einer Beeinträchtigung im Reparaturprozess strahleninduzierter DNA-DSB und erhöht dadurch die zelluläre Strahlenempfindlichkeit (Toulany *et al.*, 2012). Mittels γ -H2AX Focus Assays zeigten Toulany und Kollegen, dass sowohl der Akt-Inhibitor API als auch AKT1-siRNA die DNA-DSB-Reparatur in EGFR-aktivierten Lungenkarzinomzelllinien hemmt (Toulany *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte in SH5-behandelten Gliomzellen 10 Stunden nach Bestrahlung eine 25 %ige Reduktion im NHEJ-Level verzeichnet werden (Golding *et al.*, 2009). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Akt, genauer genommen die Isoformen Akt1 und Akt3, eine Rolle in der NHEJ-Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB spielen. In A549 Zellen, die entweder mit siRNA gegen AKT1 oder mit siRNA gegen AKT3 transfiziert wurden, waren 24 Stunden nach Bestrahlung signifikant mehr residuelle DNA-DSB detektierbar als in A549 Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden (**Abb. 3.10**, **Abb. 3.13**). Verifiziert wurden die AKT1-siRNA-Ergebnisse mittels AKT1-shRNA-Analysen in MDA-MB-231 Zellen (**Abb. 3.11**). Inwieweit es in A549 Zellen, in denen AKT2 mittels siRNA gehemmt wurde, einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an residuellen DNA-Schäden und dem Ausmaß des zellulären Überlebens nach Strahlenexposition gibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht; es war allerdings keine direkte Korrelation festzustellen (**Abb. 3.14**, **Abb. 3.15**).

Sofern in A549 Zellen ein strahlensensitivierender Effekt aufgrund einer reduzierten Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB erzielt werden soll, scheint es demnach sinnvoll zu sein, keinen panAkt-Inhibitor (wie MK2206) zu verwenden, sondern auf einen AKT1- bzw. AKT3-Knockdown zurückzugreifen. Ein kombinatorischer AKT1-/AKT3-Knockdown scheint ebenfalls vorteilhaft zu sein, wenngleich mit dieser Kombination kein additiver Effekt erzielt werden konnte (**Abb. 3.16**).

Der Einfluss der Akt1-Isoform auf die DNA-DSB-Reparatur ist mechanistisch bereits sehr gut erforscht. Es wurde gezeigt, dass Akt1 nach Strahlenexposition mit DNA-PKcs, dem Schlüsselenzym des NHEJ-Signalwegs, interagiert und einen Komplex bildet (Bozulic *et al.*, 2008; Toulany *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Toulany *et al.*, 2012). Akt1 begünstigt zum einen, dass DNA-PKcs am DNA-Schaden akkumuliert und stimuliert zum anderen deren Kinaseaktivität, welche für den Fortgang des NHEJ-Prozesses unabdingbar ist (Toulany *et al.*, 2012). Die Akt1-abhängige DNA-PKcs-Kinaseaktivität bedingt daraufhin die DNA-PKcs-Autophosphorylierung S2056, die sowohl für eine effiziente Reparatur (Chen *et al.*, 2007a) als auch für die DNA-PKcs-Freisetzung von DNA-Schadstellen essentiell ist (Toulany *et al.*, 2012). Durch den Akt-Inhibitor API sowie durch siRNA gegen AKT1 kann diese DNA-PKcs-

Autophosphorylierung S2056, ebenso wie die DNA-PKcs-Phosphorylierung T2609, in A549 und H460 Zellen gehemmt werden (Toulany *et al.*, 2008).

Im Moment ist noch unklar, auf welche Weise Akt3 und Akt2 mechanistisch in den NHEJ-Prozess involviert sind. Diese Fragestellung ist Teil eines aktuellen Forschungsprojekts und wird im Labor der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen, derzeit untersucht.

4.2 Molekulares Targeting von mTOR

Nachdem der Fokus zunächst auf den Knotenpunkten PI3K und Akt lag, sollte nun die Rolle von mTOR in der Karzinogenese beleuchtet werden. Als molekular zielgerichtete Substanz gegen mTOR kam Rapamycin zum Einsatz. Rapamycin fand sowohl in Form einer Monotherapie als auch in Form von Kombinationstherapien, mittels deren synergistische Effekte erzielt werden sollten, Anwendung.

4.2.1 Rapamycin in Form einer Monotherapie

Die klinischen Ergebnisse, die Rapamycin und Rapamycin-Derivate (Rapaloge) bisher als Monopräparate zur Behandlung von malignen Tumorerkrankungen lieferten, waren nicht besonders zufriedenstellend. Zwar hat das Rapalog Temsirolimus bereits im Jahre 2007 die FDA-Zulassung zur Behandlung des fortgeschrittenen, metastasierten Nierenzellkarzinoms in den USA erhalten. Basis hierfür waren die positiven Ergebnisse einer großen, multizentrischen Phase III-Studie, in der Temsirolimus als First-line Therapie einen Überlebensvorteil gegenüber einer Monotherapie mit dem bisherigen Standard Interferon α gezeigt hatte (Hudes *et al.*, 2007). Ebenso zeigte das bereits zugelassene Rapalog Everolimus bei der Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms nach Versagen der Therapien mit Sunitinib oder Sorafenib große Erfolge. Demnach hat Everolimus in einer Phase III-Studie gegenüber Placebo den Zeitraum ohne weiteres Tumorwachstum mit 4,9 Monaten gegenüber 1,9 Monaten mehr als verdoppelt. Des Weiteren hat Everolimus das Risiko eines Fortschreitens der Erkrankung sowie eines Todesfalls um 67 % gesenkt (Motzer *et al.*, 2008; Motzer *et al.*, 2010). Allerdings ist es nicht zu leugnen, dass, trotz großer Erfolge bei der Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms mittels Rapalog-Monotherapie, die Ansprechraten und der klinische Nutzen in anderen Tumorentitäten eher gering sind. Gerade in Mammakarzinom- (Chan *et al.*, 2005), Pankreaskarzinom- (Wolpin *et al.*, 2009), Glioblastom- (Chang *et al.*, 2005) oder Hautkrebs-Patienten (Margolin *et al.*, 2005) zeigten Rapamycin/Rapaloge nur bescheidene Wirkung.

Es wird derzeit nach Mechanismen gesucht, mittels derer diese Misserfolge bezüglich einer mTOR-Inhibitor-Monotherapie zu erklären sind. Sabatini und Kollegen sehen den Grund für die im Tumorpatienten nicht ausreichende Rapamycin/Rapalog-bedingte Proliferationshemmung darin, dass der Komplex mTORC2 – im Gegensatz zu mTORC1 –

nicht durch Rapamycin/Rapaloge gehemmt wird und es infolge dessen Aktivität zur Aktivierung der Proteinkinase Akt kommt (Sabatini, 2006). Eine duale mTORC1-/mTORC2-Inhibition könnte diese Problematik lösen; tatsächlich zeigten Roulin und Kollegen in einer *In-vitro*-Studie, dass eine kombinierte mTORC1-/mTORC2-Inhibition ebenso wie ein alleiniger mTORC2-siRNA-Knockdown einen effektiveren zytostatischen Effekt als eine alleinige mTORC1-Hemmung hat (Roulin *et al.*, 2010). Allerdings schien der duale mTORC1-/mTORC2-Inhibitor seiner erhofften Wirkung nicht dadurch gerecht zu werden, dass auch mTORC2 gehemmt wurde, sondern vielmehr dadurch, dass dieser duale Inhibitor auch Rapamycin-resistente mTORC1-Komplexe vollständig hemmte (Thoreen *et al.*, 2009). Am bisher anschaulichsten ist die Rapamycin-Resistenz sicherlich dadurch begründet, dass eine Rapamycin/Rapalog-Behandlung eine Rückkopplung im EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg induziert, was mit einer PI3K-abhängigen Akt-Aktivierung verbunden ist und schließlich die Induktion zahlreicher Zellüberlebensmechanismen zur Folge hat (**Abb. 1.1B**). Eine Rapamycin/Rapalog-induzierte PI3K/Akt-Aktivierung konnte bereits *in vitro* in Zelllinien unterschiedlicher Entitäten nachgewiesen werden. Dazu zählen u. a. die Prostatakarzinomzelllinie DU145 (Sun *et al.*, 2005; O'Reilly *et al.*, 2006), die Rhabdomyosarkomzelllinien Rh30 und RD (O'Reilly *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007), die Zervixkarzinomzelllinie HeLa (Sun *et al.*, 2005), die Kolonkarzinomzelllinie SW480 (Sun *et al.*, 2005), die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-468, MCF-7, SKBR3 und BT474 (O'Reilly *et al.*, 2006; Roforth *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011) sowie die Lungenkarzinomzelllinien A549, H157, H358 und H460 (Sun *et al.*, 2005). Auch in Xenograft-Modellen und im Patienten führte eine Rapamycin-Behandlung zu einem Anstieg im Akt-Phosphorylierungslevel und wirkte dort sogar dem therapeutischen Potenzial dieser Inhibitoren entgegen und ging mit einer schlechten Prognose einher (O'Reilly *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007; Cloughesy *et al.*, 2008; Tabernero *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Lungenkarzinomzelllinien A549, SK-MES-1, HTB-182, H661 und H460 sowie die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 bezüglich einer möglichen Rapamycin-induzierten PI3K/Akt-Aktivierung untersucht. Dazu wurden Western Blot Analysen durchgeführt und gezeigt, dass Rapamycin zu einer zelllinienabhängigen PI3K-abhängigen Akt1-Aktivierung führt. Während die Akt1-Aktivität in den Lungenkarzinomzelllinien H460 und H661 nach Rapamycin-Behandlung unverändert blieb (**Abb. 3.22, Abb. 3.23**), war in den Lungenkarzinomzelllinien A549, SK-MES-1 und HTB-182 sowie in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 sehr wohl eine Rapamycin-bedingte, sehr deutliche Zunahme im Akt1-Phosphorylierungsgrad zu beobachten (**Abb. 3.21, Abb. 3.23**). Wie bereits auch von Sun und Kollegen gezeigt (Sun *et al.*, 2005), war der Rapamycin-bedingte Anstieg im Akt1-Phosphorylierungslevel (S473/T308), parallel zur erfolgreichen Hemmung des mTOR-Signalwegs, in A549 Zellen zeitabhängig. Ein Anstieg im Akt1-Phosphorylierungsgrad war dabei bereits 30 Minuten nach Behandlung mit Rapamycin zu verzeichnen; dieser Anstieg wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden aufrechterhalten. Der Anstieg im Akt1-

Phosphorylierungsgrad hatte zudem auch die Aktivierung der Akt1-Substrate PRAS40, GSK3 α und GSK3 β zur Folge. Allerdings stehen die Daten, die im Rahmen dieser Arbeit in H460 Zellen generiert wurden, im Widerspruch mit denen von Sun und Kollegen (Sun *et al.*, 2005), die nach 24-stündiger Rapamycin-Behandlung eine Zunahme im Akt1-Phosphorylierungszustand beobachten konnten. In den hier gezeigten Versuchen induzierte Rapamycin zwar in der ersten Stunde nach Rapamycin-Behandlung eine leichte Akt1-Aktivierung. Im Laufe der Zeit und über einen Zeitraum von 24 Stunden erreichte das Phosphorylierungslevel von Akt1 dann einen Wert, der unter dem der Kontrollzellen lag. Die Ursachen, warum es in manchen Zelllinien zu einer Rapamycin-induzierten Akt1-Aktivierung kam und in anderen nicht, sind derzeit noch nicht bekannt.

Auch wenn in vielen bereits veröffentlichten Publikationen gemutmaßt wird, dass eine Rapamycin-Resistenz mit einer Rapamycin-induzierten PI3K/Akt-Aktivierung in Zusammenhang steht (Gera *et al.*, 2004; Noh *et al.*, 2004), so konnte weder in der Arbeit von Rivera und Kollegen (Rivera *et al.*, 2011) noch im Rahmen dieser Arbeit eine Korrelation zwischen der Rapamycin-induzierten Akt1-Aktivierung und dem zytostatischen Potenzial dieses Inhibitors nachgewiesen werden. Unabhängig davon, ob nach Rapamycin-Exposition eine Erhöhung im Akt1-Phosphorylierungszustand beobachtet werden konnte oder nicht, zeigte der mTOR-Inhibitor Rapamycin in allen getesteten Zelllinien eine deutliche antiproliferative Wirkung (**Abb. 3.18**). Dieser mTOR-Inhibitor-bedingte antiproliferative Effekt ist ein generelles Phänomen und bereits mehrfach beobachtet worden, beispielsweise in NSCLC-Zellen und anderen Tumor- sowie Normalzellen, aber auch in Xenograft-Modellen (Seufferlein *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2001; Gorshtein *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2011).

Da PTEN ein negativer Regulator des mTOR-Signalwegs ist, wurden PTEN-Mutationen oftmals mit der Empfindlichkeit gegenüber mTOR-Inhibitoren in Zusammenhang gebracht (Neshat *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit 2011 veröffentlichten Daten (Rivera *et al.*, 2011) kann im Rahmen dieser Arbeit allerdings kein Zusammenhang zwischen dem zellulären PTEN-Status und der Rapamycin-Empfindlichkeit hergestellt werden.

Demnach scheint weder die Rapamycin-induzierte Akt1-Aktivierung noch der alleinige Verlust der PTEN-Expression ein aussagekräftiger Prädiktor der Rapamycin-Empfindlichkeit zu sein.

4.2.2 Rapamycin in Form einer Kombinationstherapie mit Bestrahlung

Trotz des in *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien auftretenden zytostatischen Effekts von Rapamycin/Rapalogen sind die Ergebnisse, die mit Rapamycin/Rapalogen in Form einer Monotherapie in der Klinik erzielt wurden, unbefriedigend. Daher wird immer häufiger die Behandlung einer Tumorerkrankung mit mehreren Therapieprinzipien in Erwägung gezogen, von der man sich die Nutzung von Synergieeffekten erhofft (Abraham *et al.*, 2007). Es gibt derzeit einige Studien, in denen Rapamycin/Rapaloge mit anderen Substanzen kombiniert eingesetzt werden. Denkbar dabei sind Substanzen, die zusätzlich noch in andere

Knotenpunkte der EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade oder auch in andere Signalwege (z. B. in den Ras-Signalweg) eingreifen. So wurde in präklinischen Studien gezeigt, dass sich Rapamycin/Rapaloge und der PI3K-Inhibitor LY294002 in Zellen des Lungenkarzinoms und der T-Zell-Leukämie (Ikezoe *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008) sowie Rapamycin/Rapaloge und der Akt-Inhibitor MK2206 (Ewald *et al.*, 2013) in Zellen und Xenograft-Modellen des Cholangiokarzinoms in ihrer antitumoralen Wirkung synergistisch verstärken. Gleiches galt für Zellen des kolorektalen Karzinoms, sofern Rapamycin in Kombination mit dem RAF-MEK-ERK-Inhibitor Sorafenib eingesetzt wurde (Gulhati *et al.*, 2012). Auch klinische Studien unterstreichen den positiven Effekt einer Kombinationstherapie. In der BOLERO2-Studie wurde demnach beim fortgeschrittenen Hormonrezeptor-positiven, HER2/c-neu-negativen Mammakarzinom durch die Kombination von Rapamycin/Rapalogen mit dem Aromataseinhibitor Exemestan ein verlängertes progressionsfreies Überleben erzielt (Dumont *et al.*, 2012; Beck *et al.*, 2014).

Im Moment gibt es noch keine klinische Studien, in denen den Tumorpatienten Rapamycin/Rapaloge in Kombination mit ionisierender Strahlung verabreicht werden. Es gibt sehr wohl aber schon einige präklinische Studien, die die Vorteile einer Rapamycin-Kombination mit Bestrahlung in Form einer Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung zeigen. In diesen präklinischen *In-vitro*-Studien wird deutlich, dass die Rapamycin-induzierte Erhöhung der Radiotoxizität sehr stark zelllinienabhängig erfolgt. In mehreren Studien, die u. a. in Prostatakarzinom- (Cao *et al.*, 2006; Schiewer *et al.*, 2012) und Blasenkarzinomzellen (Nassim *et al.*, 2013) durchgeführt wurden, konnte ein Rapamycin-bedingter strahlensensitivierender Effekt beobachtet werden. Etwas kontrovers sind die Ergebnisse in Glioblastomzellen; in einer Zelllinie bewirkte Rapamycin eine Strahlensensitivierung, in einer anderen jedoch erzielte der mTOR-Inhibitor keinerlei strahlensensitivierende Effekte (Shinohara *et al.*, 2005). Gleiches gilt für Mammakarzinomzelllinien (Albert *et al.*, 2006; No *et al.*, 2009; Hayman *et al.*, 2013). In Zellen von Kopf-Hals-Tumoren konnte Rapamycin keine Erhöhung der Strahlentoxizität bedingen (Ekshyyan *et al.*, 2009). Die Rapamycin-bedingte Strahlensensitivierung scheint also zelllinienabhängig, aber unabhängig von der Tumorentität zu sein, was im Rahmen dieser Arbeit in Mammakarzinom- sowie Lungenkarzinomzellen bestätigt werden konnte (**Abb. 3.19**). In der vorliegenden Arbeit wird zwischen responsiven und nicht-responsiven Zelllinien unterschieden, sprich zwischen Zellen, die durch Rapamycin strahlensensitiviert wurden (H460, H661) und solchen, deren Strahlenantwort durch Rapamycin unberührt blieb (MDA-MB-231, SK-MES-1, HTB-183) bzw. nur minimal begünstigt wurde (A549). Bereits veröffentlichte Daten von Kim und Kollegen (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009) sowie Choi und Kollegen (Choi *et al.*, 2010) konnten bestätigt werden; demnach führte eine Rapamycin-Behandlung in H460 Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Radiotoxizität. Im Gegensatz zu H460 Zellen konnte in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 sowie in den Lungenkarzinomzelllinien SK-MES-1, HTB-182 und A549 Zellen kein bzw. nur ein geringer Effekt beobachtet werden. Die

fehlende Rapamycin-bedingte Strahlensensitivierung in A549 Zellen widerspricht den publizierten Daten von Choi und Kollegen (Choi *et al.*, 2010), die in dieser Zelllinie sehr wohl eine strahlensensitivierende Wirkung des mTOR-Inhibitors fanden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise durch unterschiedliche Versuchsdurchführungen/Inhibitor-Behandlungszeiten erklärbar – in eben dieser Veröffentlichung sind keine genauen Angaben zur Versuchsdurchführung und den Inhibitor-Behandlungszeiten zu finden. In Bezug auf die Wirkung von Rapamycin auf die Strahlenantwort von MDA-MB-231 Zellen sind die hier gezeigten Ergebnisse mit denen von Hayman und Kollegen in Einklang (Hayman *et al.*, 2013). Allerdings wird in einer anderen Publikation sehr wohl von einer Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung in MDA-MB-231 Zellen gesprochen (Albert *et al.*, 2006). Auch diese Unterschiede sind möglicherweise auf unterschiedliche experimentelle Durchführungen zurückzuführen.

Der Literatur nach zu urteilen ist derzeit noch nicht geklärt, welche Gegebenheiten für die zelllinienabhängige Rapamycin-induzierte Beeinflussung der Radiotoxizität verantwortlich sind. Angesichts der Tatsache, dass Rapamycin in den beiden p53wt A549 und H460 Zelllinien lediglich in H460 eine strahlensensitivierende Wirkung hatte, ist davon auszugehen, dass der strahlensensitivierende Effekt von Rapamycin p53-unabhängig erfolgte. In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten zeigten auch Nagata und Kollegen in einem isogenen NSCLC-Zellsystem (H1299/wtp53 und H1299/mp53), dass die strahlensensitivierende Wirkung von Rapamycin unabhängig vom p53-Status ist (Nagata *et al.*, 2010).

Es wäre äußerst wünschenswert, das Ansprechen eines bestimmten Zelltyps auf eine kombinierte Rapamycin-/Strahlentherapie voraussagen zu können. So wäre es dann möglich, für jeden einzelnen Krebspatienten die wirksamste und sicherste Krebstherapie zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals ein möglicher Prädiktor identifiziert werden. Die vorliegende Arbeit ist die bisher erste, in der eine Korrelation zwischen einer Rapamycin-induzierten Akt1-Aktivierung und einer fehlenden bzw. minimierten Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung gezeigt werden konnte. Das bedeutet, dass in H460 und H661 Zellen (responsive Zellen), in denen eine Rapamycin-Behandlung keinen Einfluss auf den Akt1-Phosphorylierungszustand hatte (**Abb. 3.22, Abb. 3.23A**), sehr wohl die Radiotoxizität durch den mTOR-Inhibitor erhöht wurde (**Abb. 3.19A**), während in den Zelllinien MDA-MB-231, SK-MES-1, HTB-182 und A549 (nicht responsive Zellen), in denen Rapamycin zu einer PI3K-abhängigen Akt1-Aktivierung führte (**Abb. 3.21, Abb. 3.23**), keine bzw. nur eine minimierte Strahlensensitivierung beobachtet werden konnte (**Abb. 3.19B**). Demnach trägt die Rapamycin-induzierte PI3K/Akt1-Aktivierung zur Strahlenresistenzentwicklung solider Tumoren bei und scheint ein geeigneter Parameter zu sein, mit dem das Scheitern einer kombinierten Rapamycin-/Strahlentherapie vorausgesagt werden kann. Diese vielversprechenden präklinischen Daten rechtfertigen translationale Untersuchungen

dahingehend, dass die Rapamycin-induzierte Akt1-Aktivierung als möglicher Prädiktor für das Therapieansprechen zu dienen vermag.

Von Interesse ist, welche möglichen Mechanismen eine mTOR-Inhibitor-induzierte Strahlensensitivierung bedingen. Zwei veröffentlichte Studien brachten die strahlensensitivierende Wirkung von mTOR-Inhibitoren mit einer verminderten Kapazität zur Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB in Verbindung (Choi *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Demnach schien die Strahlensensitivierung in Rapamycin-behandelten Zellen durch Hemmung des Homologen Rekombination (HR)- und NHEJ-Signalwegs bedingt zu sein. Dies zeigte sich zum einen an einer beeinträchtigten Rekrutierung von Reparaturenzymen (z. B. BRAC1, Rad51) zu DNA-Schadstellen sowie in einer ausgeprägten Verlängerung der γ -H2AX Focibildung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als mögliche Ursache der Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung ebenfalls eine reduzierte DNA-DSB-Reparatur in Erwägung gezogen. Wie in γ -H2AX Focus Assays gezeigt werden konnte (**Abb. 3.20B**), war in den nicht-responsiven Zelllinien A549, SK-MES-1, HTB-182 und MDA-MB-231 24 Stunden nach Bestrahlung keine nennenswerte Veränderung in der Anzahl der residuellen DNA-DSB zu beobachten. Dies war nicht anders zu erwarten, denn schließlich konnte in diesen Zelllinien keine strahlensensitivierende Wirkung von Rapamycin nachgewiesen werden (**Abb. 3.19B**). In diesen Zelllinien bewirkte Rapamycin die Aktivierung von Akt1 (**Abb. 3.21**, **Abb. 3.23**) und da Akt1 bekanntlich eine zentrale Rolle in der Reparatur von DNA-DSB spielt, konnte Rapamycin seine eigentlich strahlensensitivierende Wirkung nicht entfalten. Vielmehr wurden strahleninduzierte DNA-Schäden trotz Rapamycin-Behandlung sehr gut repariert (**Abb. 4.2**). In responsiven H460 Zellen war dies anders; Rapamycin bewirkte in H460 Zellen keine Akt1-Aktivierung (**Abb. 3.22**, **Abb. 3.23A**), so dass der eigentlich strahlensensitivierende Effekt zum Vorschein kam (**Abb. 3.19B**). Es ist davon auszugehen, dass die strahlensensitivierende Wirkung von Rapamycin in H460 Zellen durch eine reduzierte Reparatur strahleninduzierter DSB erklärbar ist (**Abb. 3.20A**). Dies scheint aber nicht der einzige Mechanismus zu sein, über den Rapamycin das Überleben von Tumorzellen nach Strahlenexposition begünstigte. In responsiven H661 Zellen beispielsweise hatte eine Rapamycin-Behandlung auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden keine Auswirkungen (**Abb. 3.20A**). Dass neben einer reduzierten DNA-DSB-Reparatur andere Mechanismen beteiligt sein müssen, scheint daher selbstverständlich zu sein. Um welche Mechanismen es sich hierbei handeln könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Es gibt aber aus der Literatur Hinweise dafür, dass mTOR-Inhibitoren über die Induktion der Autophagie (Takeuchi *et al.*, 2005; Albert *et al.*, 2006; Zhuang *et al.*, 2011; Anbalagan *et al.*, 2012), des Zellzyklusarrests (Choi *et al.*, 2010) oder der Apoptose (Hosoi *et al.*, 1999; Anandharaj *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012) sowie über die Hemmung der Vaskularisierung der Tumore (Guba *et al.*, 2002; Shinohara *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2009) die Radiotoxizität erhöhen könnten.

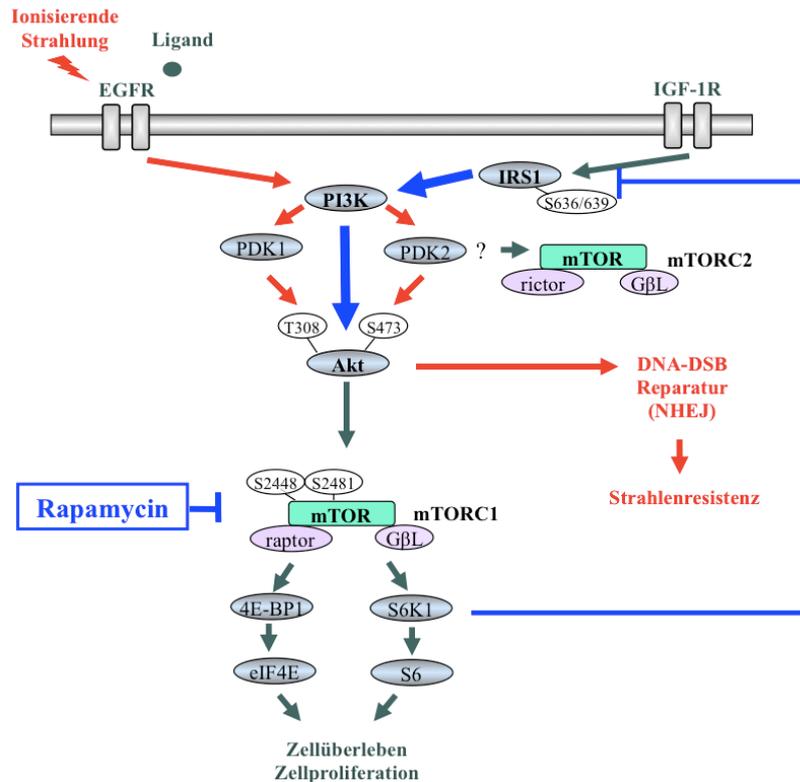


Abb. 4.2: EGFR/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, Bestrahlung und Rapamycin. In nicht-responsiven Zellen führte eine Rapamycin-Behandlung zur PI3K-abhängigen Akt1-Aktivität. Da Akt1 in die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB involviert ist, konnte Rapamycin seine eigentlich strahlensensitivierende Wirkung in nicht-responsiven Zellen nicht entfalten. Vielmehr wurden strahleninduzierte DNA-Schäden auch nach Rapamycin-Behandlung sehr gut repariert.

4.2.3 Co-Targeting Strategien zur Wiederherstellung der fehlenden/minimierten Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung in nicht-responsiven Tumorzellen

Wider Erwarten wurde gezeigt, dass die klinischen mTOR-Inhibitor-Ergebnisse bei der Behandlung von Tumoren bestenfalls bescheiden waren und im schlechtesten Fall zum Fortschreiten der Erkrankung und schließlich zum Tod führten. Es wird versucht, mit verschiedenen Mechanismen diese nicht zufriedenstellende Wirkung der mTOR-Inhibitoren zu erklären. Die Entdeckung, dass Rapamycin den physiologischen negativen Rückkopplungsmechanismus aufhebt und dadurch eine Akt1-Aktivierung induziert, hat Anlass zu zahlreichen Studien gegeben und kann – wie im Rahmen dieser Arbeit bereits diskutiert wurde – eine fehlende mTOR-Inhibitor-bedingte Strahlensensitivierung von Tumorzellen erklären. Demnach könnten Co-Targeting Strategien, bei denen mTOR-Inhibitoren zusammen mit Hemmstoffen zur Unterdrückung der Rapamycin-induzierten Akt-Aktivität zum Einsatz kommen, vielversprechend sein und die Radiotherapie bei Tumorerkrankungen optimieren (**Abb. 4.3**).

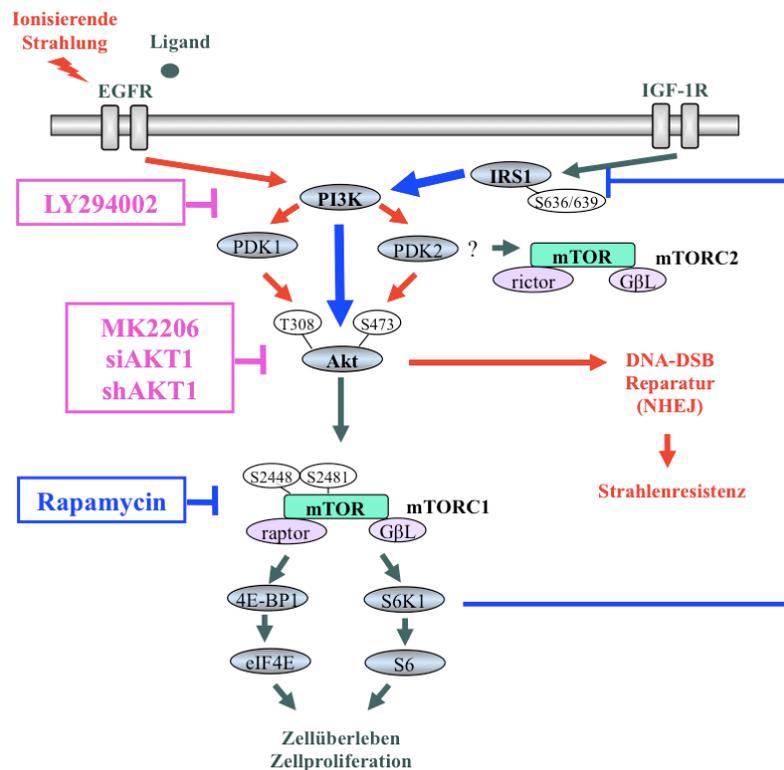


Abb. 4.3: Co-Targeting Strategien zur Wiederherstellung der fehlenden Rapamycin-induzierten Strahlensensitivierung in nicht-responsiven Tumorzellen. In nicht-responsiven Zellen führt eine Rapamycin-Behandlung zur PI3K-abhängigen Akt1-Aktivität. Da Akt1 in die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB involviert ist, kann Rapamycin seine eigentlich strahlensensitivierende Wirkung in nicht-responsiven Zellen nicht entfalten. Mit einer zusätzlichen PI3K-/Akt-Hemmung (LY294002 bzw. MK2206, siAKT1, shAKT1) sollte die maskierte Rapamycin-induzierte Strahlensensitivierung wiederhergestellt werden.

Sowohl die hier gezeigten Daten (**Abb. 3.24**) als auch Forschungsergebnisse von anderen Wissenschaftlern zeigen, dass die Rapamycin-induzierte Akt-Aktivierung PI3K-abhängig ist (Sun *et al.*, 2005; O'Reilly *et al.*, 2006) und demnach möglicherweise durch den PI3K-Inhibitor LY294002 aufgehoben werden könnte (O'Reilly *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013b; Kasukabe *et al.*, 2013). Tatsächlich resultierte eine kombinierte Rapamycin-/LY294002-Gabe zum einen in einer synergistisch verstärkten Proliferationshemmung in *In-vitro*-Studien (Breslin *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Kasukabe *et al.*, 2013), zum anderen aber auch in einer synergistischen Tumorzellvolumenabnahme in A549- und H460-Xenograft-Modellen (Wang *et al.*, 2008). In Übereinstimmung damit zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Koloniebildungstests unter Rapamycin-/LY294002-Gabe in nicht-responsiven SK-MES-1, HTB-182 und MDA-MB-231 Zellen, dass die strahlensensitivierende Wirkung unter kombinierter Inhibitor-Gabe signifikant größer war als bei Behandlung mit nur einem Inhibitor (**Abb. 3.25A**). Diese Arbeit ist die bisher einzige, in der die kombinierte Wirkung von Rapamycin, LY294002 und ionisierender Strahlung untersucht wurde, daher gibt es keine Literatur, die diese Ergebnisse verifizieren könnte.

Demnach ist fragwürdig, welche Mechanismen die zelluläre Strahlensensitivierung nach Behandlung mit Rapamycin, LY294002 und ionisierender Strahlung bedingen könnten. Da bereits vorangegangene Versuche die strahlensensitivierende Wirkung des PI3K-Inhibitors LY294002 mit einer verminderten Kapazität zur Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB in Verbindung brachten (**Abb. 3.4**) und auch die strahlensensitivierende Wirkung von Rapamycin zumindest in responsiven Zelllinien teilweise auf eine reduzierte DNA-Schadensreparatur zurückzuführen war (**Abb. 3.20A**), lag der Verdacht nahe, dass sich möglicherweise auch die kombinierte Rapamycin-/LY294002-/Strahlentherapie auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB auswirken könnte. Und tatsächlich bestätigte sich diese Vermutung – eine kombinierte Rapamycin-/LY294002-/Strahlentherapie resultierte in nicht-responsiven A549, SK-MES-1 bzw. MDA-MB-231 Zellen in einem signifikant bzw. tendenziell größeren strahleninduzierten DNA-Restschaden (**Abb. 3.26, Abb. 3.27A**), was mit den Überlebenskurven der Koloniebildungstests nach kombinierter Rapamycin-/LY294002-Behandlung und anschließender Bestrahlung einher ging (**Abb. 3.25A**). Die verstärkte Strahlensensitivierung nach Kombinationsbehandlung kann dadurch erklärt werden, dass die Rapamycin-induzierte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs durch die LY294002-Gabe gehemmt wurde. Dadurch konnte die zuvor versteckte Strahlensensitivierung von Rapamycin in nicht-responsiven Zellen wiederhergestellt werden. Infolgedessen verstärkten sich dann die sensitivierenden Wirkungen von LY294002 und Rapamycin.

Mittlerweile gibt es einen dualen PI3K-/mTOR-Inhibitor namens BEZ235, der laut einer Studie von Konstantinidou und Kollegen annähernd die gleiche antiproliferative Wirkung haben soll wie eine kombinierte Rapamycin-/LY294002-Behandlung (Konstantinidou *et al.*, 2009). Auch in anderen Studien wurde die hemmende Wirkung dieses Inhibitors auf die Proliferation von Tumorzellen und Tumorgewebe bestätigt (Roper *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011; Cerniglia *et al.*, 2012). Da die Kombination aus Rapamycin und BEZ235 wachstumshemmende Effekte in NSCLC-Zellen und A549-Xenograft-Modellen zeigte (Xu *et al.*, 2011) und zudem von einer BEZ-induzierten, mit der DNA-Schadensreparatur in Zusammenhang stehenden Strahlensensitivierung die Rede ist (Cerniglia *et al.*, 2012), wäre auch die Durchführung von Rapamycin-/BEZ235-Kombinationsversuchen inklusive Bestrahlung sinnvoll. Derartige Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Der PI3K-Inhibitor LY294002 zeigt zwar in präklinischen Studien sehr erfolgreiche Ergebnisse, kann aber aufgrund seiner Toxizität in der Klinik keine Anwendung finden. Deshalb wird gerne auf klinisch erprobte Akt-Inhibitoren (z. B. MK2206, Perifosine) zurückgegriffen, die mit Rapamycin kombiniert werden. Grundlage für die Kombination von Akt-Inhibitoren mit Rapamycin in der Klinik bilden präklinische Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass der kombinierte Einsatz von Rapamycin mit einem Akt-Inhibitor die Zytotoxizität in Myelomzellen, Prostatakarzinomzellen, Cholangiokarzinomzellen sowie in

entsprechenden Xenograft-Modellen verstärkt (Cirstea *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Ewald *et al.*, 2013). In einigen, aber nicht allen, Kopf-Hals-Tumor-Modellen konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden, die dann mit einer verstärkten Caspase-3-Aktivität begründet wurden (Radhakrishnan *et al.*, 2013). Die in dieser Arbeit gezeigten Rapamycin-/MK2206-Ergebnisse harmonisieren gut mit diesen publizierten Daten, denn im Rahmen dieser Arbeit konnte auf Basis der γ -H2AX Focus Assays in A549 Zellen, in denen es zu einer Rapamycin-induzierten Akt1-Aktivierung kommt, gezeigt werden, dass eine kombinierte Rapamycin-/MK2206-Behandlung die Reparaturkapazität im Vergleich zu einer Singlebehandlung herabsetzte (**Abb. 3.29A**) und schließlich in einer erhöhten strahlensensitivierenden Wirkung resultierte (**Abb. 3.28A**). Weitere Untersuchungen mit siRNA und shRNA konnten Akt1 als diejenige Akt-Isoform identifizieren, die für die Modulation der Rapamycin-bedingten Strahlensensitivierung in nicht-responsiven Zellen verantwortlich ist (**Abb. 3.30A, Abb. 3.31, Abb. 3.32A, Abb. 3.33**).

In responsiven Zellen unterscheidet sich das Reparaturmuster merklich von dem in nicht-responsiven Zellen, d. h. nach einer kombinierten Rapamycin-/LY294002-, Rapamycin-/MK2206- bzw. Rapamycin-/siAKT1-Behandlung war die Anzahl unreparierter DNA-DSB 24 Stunden nach Bestrahlung vergleichbar mit der in Kontrollzellen (**Abb. 3.27B, Abb. 3.29B, Abb. 3.32B**). Diese Beobachtung kann mit den dazugehörigen Koloniebildungstests, in denen nach kombinierter Behandlung ein additiver Effekt beobachtet werden konnte, nicht zur Deckung gebracht werden (**Abb. 3.25B, Abb. 3.28B, Abb. 3.30B**). Die Ursachen, warum γ -H2AX Foci nach kombinierter Behandlung lediglich auf Kontrollniveau detektiert werden konnten, ist fragwürdig und nicht auf eine Induktionsproblematik zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise nehmen hier andere Mechanismen überhand, die die Radiotoxizität erhöhen. Denkbar wären Mechanismen wie die bereits oben in Kopf-Hals-Tumor-Modellen genannte Erhöhung in der Caspase-3-Aktivität, die Induktion der Autophagie oder auch des Zellzyklusarrests. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch keine Untersuchungen dahingehend vorgenommen.

4.3 Schlussbetrachtung

Fasst man die Daten dieser Arbeit und die vorhandene Literatur zusammen, wird ersichtlich, dass die EGFR-vermittelte PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade bei der Vermittlung einer zellulären Strahlenresistenz eine entscheidende Rolle spielt und dass durch gezieltes, molekulares Targeting gegen bestimmte Komponenten dieser Signalkaskade die Radiotoxizität der Strahlentherapie verstärkt werden kann.

Entsprechend bereits veröffentlichter Daten (Gupta *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006; Toulany *et al.*, 2006; Kao *et al.*, 2007; No *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010) konnte gezeigt werden, dass durch gezielte Hemmung der PI3K Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung sensitiviert werden können, da PI3K die Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB

entscheidend lenkt. In dieser Arbeit kam der pharmakologische PI3K-Inhibitor LY294002 zum Einsatz. Da dieser Inhibitor allerdings aufgrund seiner Toxizität in der Klinik nicht eingesetzt werden kann, sollte man die Entwicklung geeigneter klinischer PI3K-Inhibitoren in Erwägung ziehen.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen Akt-Isoformen in der Transduktion strahleninduzierter Signale unterschiedliche Rollen einnehmen. Wie bereits veröffentlicht (Toulany *et al.*, 2008; No *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Toulany *et al.*, 2012), führte die Hemmung der Akt1 mittels pharmakologischen Inhibitoren, siRNA oder shRNA zu einer reduzierten Reparatur strahleninduzierter DNA-DSB, was eine Erhöhung der Radiotoxizität bewirkte. Ebenso verhielt sich die Akt-Isoform Akt3. Dagegen schien Akt2 in die zelluläre Klonogenität und die NHEJ-Reparatur weniger involviert zu sein. Die Rolle der Akt1-Isoform im NHEJ-Prozess wurde in der Vergangenheit bereits sehr anschaulich belegt (Toulany *et al.*, 2008; Golding *et al.*, 2009; Toulany *et al.*, 2012). Wie die beiden anderen Isoformen mechanistisch in diesen Prozess involviert sein könnten, bleibt noch zu klären. In diesem Zusammenhang wären Fragestellungen bezüglich der Interaktion der Akt2- und Akt3-Isoform mit Proteinen der Reparaturmaschinerie interessant.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal festgestellt werden, dass die Rapamycin-induzierte Akt1-Aktivierung dem Rapamycin-induzierten strahlensensitivierenden Potenzial entgegenwirkt und zumindest *in vitro* als Prädiktor für das Ansprechen einer Strahlentherapie dienen kann. Diese Korrelation kann dadurch erklärt werden, dass die erhöhte Akt1-Aktivität, wie sie in nicht-responsiven Zellen auftrat, die eigentlich strahlensensitivierende Wirkung von Rapamycin unterdrückte/aufhob, indem die DNA-DSB-Reparatur begünstigt wurde. Es war möglich, die fehlende/minimierte Rapamycin-bedingte Strahlensensitivierung in nicht-responsiven Tumorzellen durch Co-Targeting Strategien, bei denen Rapamycin zusammen mit Hemmstoffen zur Unterdrückung der Rapamycin-induzierten Akt1-Aktivität eingesetzt wurde, wiederherzustellen. Hier schien die DNA-DSB-Reparatur, neben weiteren noch zu erforschenden Mechanismen, eine Rolle zu spielen. Etwas fragwürdig ist im Moment das Reparaturmuster in responsiven Zellen, die der Co-Targeting Strategie unterzogen wurden – speziell in diesen Zellen ist es nötig, die Mechanismen, die die Radiotoxizität erhöhen, zu identifizieren, da hier die DNA-Schadensreparatur via NHEJ weniger eine Rolle zu spielen scheint.

Auch wenn noch sehr viel Arbeit bezüglich der Identifizierung der mechanistischen Vorgänge zu leisten ist, liefern die vorliegenden *In-vitro*-Ergebnisse die Erkenntnis, dass Kombinationsstrategien aus ionisierender Strahlung und molekularem Targeting der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade eine geeignete Vorgehensweise darstellen, mit der Strahlenresistenzen *in vitro* sehr erfolgreich überwunden werden können. Die Erprobung dieser vorgestellten Kombinationsstrategien scheint auch *in vivo* und in der Klinik sinnvoll zu sein.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham RT, Gibbons JJ (2007). The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res* **13**(11): 3109-3114.
- Abraham RT, Wiederrecht GJ (1996). Immunopharmacology of rapamycin. *Annual review of immunology* **14**: 483-510.
- Albert JM, Kim KW, Cao C, Lu B (2006). Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Mol Cancer Ther* **5**(5): 1183-1189.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, *et al.* (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* **15**(23): 6541-6551.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, *et al.* (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current biology : CB* **7**(4): 261-269.
- Altomare DA, Testa JR (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24**(50): 7455-7464.
- Amato RJ, Jac J, Giessinger S, Saxena S, Willis JP (2009). A phase 2 study with a daily regimen of the oral mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in patients with metastatic clear cell renal cell cancer. *Cancer* **115**(11): 2438-2446.
- Anandharaj A, Cinghu S, Park WY (2011). Rapamycin-mediated mTOR inhibition attenuates survivin and sensitizes glioblastoma cells to radiation therapy. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **43**(4): 292-300.
- Anbalagan S, Pires IM, Blick C, Hill MA, Ferguson DJ, Chan DA, *et al.* (2012). Radiosensitization of renal cell carcinoma in vitro through the induction of autophagy. *Radiother Oncol* **103**(3): 388-393.
- Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Current biology : CB* **8**(12): 684-691.
- Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, *et al.* (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* **272**(50): 31515-31524.
- Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, *et al.* (2002). Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* **62**(24): 7350-7356.
- Ataian Y, Krebs JE (2006). Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **84**(4): 490-504.
- Ballou LM, Lin RZ (2008). Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *Journal of chemical biology* **1**(1-4): 27-36.
- Bandyopadhyay D, Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R (1998). Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* **273**(3): 1568-1573.
- Barker FG, 2nd, Simmons ML, Chang SM, Prados MD, Larson DA, Sneed PK, *et al.* (2001). EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **51**(2): 410-418.
- Barnes CJ, Kumar R (2003). Epidermal growth factor receptor family tyrosine kinases as signal integrators and therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev* **22**(4): 301-307.
- Baumann M, Krause M, Dikomey E, Dittmann K, Dorr W, Kasten-Pisula U, *et al.* (2007). EGFR-targeted anti-cancer drugs in radiotherapy: preclinical evaluation of mechanisms. *Radiother Oncol* **83**(3): 238-248.
- Beck JT, Hortobagyi GN, Campone M, Lebrun F, Deleu I, Rugo HS, *et al.* (2014). Everolimus plus exemestane as first-line therapy in HR(+), HER2(-) advanced breast cancer in BOLERO-2. *Breast cancer research and treatment* **143**(3): 459-467.
- Beckmann I-A (ed) (2012). *Die blauen Ratgeber: Strahlentherapie - Antworten. Hilfen. Perspektiven.* Deutsche Krebshilfe.

- Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L (2004). A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol Ther* **3**(3): 268-275.
- Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C (eds) (2010). *Basic Radiation Oncology*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- Bjornsti MA, Houghton PJ (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**(5): 335-348.
- Block WD, Yu Y, Merkle D, Gifford JL, Ding Q, Meek K, *et al.* (2004). Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic acids research* **32**(14): 4351-4357.
- Boag JW (1975). The time scale in radiobiology. 12th Failla memorial lecture. In: *Radiation Research. Proceedings of the 5th International Congress of Radiation Research*, Nygaard OF, Adler HI, Sinclair WK (eds), pp 9-29. New York: Academic Press.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, *et al.* (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **354**(6): 567-578.
- Boura-Halfon S, Zick Y (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(4): E581-591.
- Bozulic L, Surucu B, Hynx D, Hemmings BA (2008). PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Molecular cell* **30**(2): 203-213.
- Breslin EM, White PC, Shore AM, Clement M, Brennan P (2005). LY294002 and rapamycin co-operate to inhibit T-cell proliferation. *British journal of pharmacology* **144**(6): 791-800.
- Brogna J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* **61**(10): 3986-3997.
- Brown JM, Wouters BG (1999). Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* **59**(7): 1391-1399.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**(45): 42462-42467.
- Cao C, Subhawong T, Albert JM, Kim KW, Geng L, Sekhar KR, *et al.* (2006). Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. *Cancer Res* **66**(20): 10040-10047.
- Cerniglia GJ, Karar J, Tyagi S, Christofidou-Solomidou M, Rengan R, Koumenis C, *et al.* (2012). Inhibition of autophagy as a strategy to augment radiosensitization by the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Molecular pharmacology* **82**(6): 1230-1240.
- Chan S, Scheulen ME, Johnston S, Mross K, Cardoso F, Ditttrich C, *et al.* (2005). Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **23**(23): 5314-5322.
- Chang SM, Wen P, Cloughesy T, Greenberg H, Schiff D, Conrad C, *et al.* (2005). Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Investigational new drugs* **23**(4): 357-361.
- Chen BP, Chan DW, Kobayashi J, Burma S, Asaithamby A, Morotomi-Yano K, *et al.* (2005). Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **280**(15): 14709-14715.
- Chen BP, Uematsu N, Kobayashi J, Lerenthal Y, Krempler A, Yajima H, *et al.* (2007a). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem* **282**(9): 6582-6587.
- Chen DJ, Nirodi CS (2007b). The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clin Cancer Res* **13**(22 Pt 1): 6555-6560.
- Chen H, Ma Z, Vanderwaal RP, Feng Z, Gonzalez-Suarez I, Wang S, *et al.* (2011). The mTOR inhibitor rapamycin suppresses DNA double-strand break repair. *Radiat Res* **175**(2): 214-224.

- Chen HP, Huang YQ, Ma XD (2013a). [Antiproliferative effects of LY294002 on MCL Jeko-1 cell line and its mechanism]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology* **21**(5): 1183-1186.
- Chen X, Zhao M, Hao M, Sun X, Wang J, Mao Y, *et al.* (2013b). Dual inhibition of PI3K and mTOR mitigates compensatory AKT activation and improves tamoxifen response in breast cancer. *Mol Cancer Res* **11**(10): 1269-1278.
- Cheng Y, Zhang Y, Zhang L, Ren X, Huber-Keener KJ, Liu X, *et al.* (2012). MK-2206, a novel allosteric inhibitor of Akt, synergizes with gefitinib against malignant glioma via modulating both autophagy and apoptosis. *Mol Cancer Ther* **11**(1): 154-164.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, *et al.* (2001a). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**(5522): 1728-1731.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ (2001b). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* **276**(42): 38349-38352.
- Choi EJ, Ryu YK, Kim SY, Wu HG, Kim JS, Kim IH, *et al.* (2010). Targeting epidermal growth factor receptor-associated signaling pathways in non-small cell lung cancer cells: implication in radiation response. *Mol Cancer Res* **8**(7): 1027-1036.
- Cirstea D, Hideshima T, Rodig S, Santo L, Pozzi S, Vallet S, *et al.* (2010). Dual inhibition of akt/mammalian target of rapamycin pathway by nanoparticle albumin-bound-rapamycin and perifosine induces antitumor activity in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* **9**(4): 963-975.
- Cloughesy TF, Yoshimoto K, Nghiemphu P, Brown K, Dang J, Zhu S, *et al.* (2008). Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med* **5**(1): e8.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**(6559): 785-789.
- Dai DL, Martinka M, Li G (2005). Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* **23**(7): 1473-1482.
- de Bono JS, Rowinsky EK (2002). The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends in molecular medicine* **8**(4 Suppl): S19-26.
- Dent P, Yacoub A, Contessa J, Caron R, Amorino G, Valerie K, *et al.* (2003). Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* **159**(3): 283-300.
- Ding Q, Reddy YV, Wang W, Woods T, Douglas P, Ramsden DA, *et al.* (2003). Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* **23**(16): 5836-5848.
- Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, *et al.* (2005a). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **280**(35): 31182-31189.
- Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP (2005b). Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol* **76**(2): 157-161.
- Dobashi Y, Kimura M, Matsubara H, Endo S, Inazawa J, Ooi A (2012). Molecular alterations in AKT and its protein activation in human lung carcinomas. *Human pathology* **43**(12): 2229-2240.
- Dobashi Y, Watanabe Y, Miwa C, Suzuki S, Koyama S (2011). Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *International journal of clinical and experimental pathology* **4**(5): 476-495.
- Doble BW, Woodgett JR (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of cell science* **116**(Pt 7): 1175-1186.
- Dong LQ, Liu F (2005). PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**(2): E187-196.
- Douros J, Suffness M (1981). New antitumor substances of natural origin. *Cancer treatment reviews* **8**(1): 63-87.

- Dufour M, Dormond-Meuwly A, Demartines N, Dormond O (2011). Targeting the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Cancer Therapy: Lessons from Past and Future Perspectives. *Cancers* **3**(2): 2478-2500.
- Dummler B, Hemmings BA (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochemical Society transactions* **35**(Pt 2): 231-235.
- Dumont FJ, Bischoff P (2012). Disrupting the mTOR signaling network as a potential strategy for the enhancement of cancer radiotherapy. *Current cancer drug targets* **12**(8): 899-924.
- Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, *et al.* (2005). Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Molecular and cellular biology* **25**(5): 1869-1878.
- Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, Hallahan DE (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res* **62**(16): 4671-4677.
- Ekshyyan O, Rong Y, Rong X, Pattani KM, Abreo F, Caldito G, *et al.* (2009). Comparison of radiosensitizing effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor CCI-779 to cisplatin in experimental models of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Ther* **8**(8): 2255-2265.
- Endlich B, Radford IR, Forrester HB, Dewey WC (2000). Computerized video time-lapse microscopy studies of ionizing radiation-induced rapid-interphase and mitosis-related apoptosis in lymphoid cells. *Radiat Res* **153**(1): 36-48.
- Eng CP, Sehgal SN, Vezina C (1984). Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)* **37**(10): 1231-1237.
- Engelman JA (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* **9**(8): 550-562.
- Ewald F, Grabinski N, Grottke A, Windhorst S, Norz D, Carstensen L, *et al.* (2013). Combined targeting of AKT and mTOR using MK-2206 and RAD001 is synergistic in the treatment of cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* **133**(9): 2065-2076.
- Fasolo A, Sessa C (2008). mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs* **17**(11): 1717-1734.
- Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **279**(39): 41189-41196.
- Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, *et al.* (1998). Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res* **4**(1): 241-249.
- Forrester HB, Vidair CA, Albright N, Ling CC, Dewey WC (1999). Using computerized video time lapse for quantifying cell death of X-irradiated rat embryo cells transfected with c-myc or c-Ha-ras. *Cancer Res* **59**(4): 931-939.
- Foster KG, Fingar DC (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* **285**(19): 14071-14077.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* **1**(5): 2315-2319.
- Fraser M, Harding SM, Zhao H, Coackley C, Durocher D, Bristow RG (2011). MRE11 promotes AKT phosphorylation in direct response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* **10**(13): 2218-2232.
- Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* **60**(5): 1383-1387.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T (eds) (2006). *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press: Washington, DC.
- Fujiwara K, Iwado E, Mills GB, Sawaya R, Kondo S, Kondo Y (2007). Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy. *International journal of oncology* **31**(4): 753-760.
- Fujiwara M, Izuishi K, Sano T, Hossain MA, Kimura S, Masaki T, *et al.* (2008). Modulating effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002 on cisplatin in human pancreatic cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **27**: 76.

- Gao Y, Ishiyama H, Sun M, Brinkman KL, Wang X, Zhu J, *et al.* (2011). The alkylphospholipid, perifosine, radiosensitizes prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Radiation oncology* **6**: 39.
- Garcia-Echeverria C, Sellers WR (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* **27**(41): 5511-5526.
- Gera JF, Mellinghoff IK, Shi Y, Rettig MB, Tran C, Hsu JH, *et al.* (2004). AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *J Biol Chem* **279**(4): 2737-2746.
- Golding SE, Morgan RN, Adams BR, Hawkins AJ, Povirk LF, Valerie K (2009). Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells. *Cancer Biol Ther* **8**(8): 730-738.
- Gonzalez E, McGraw TE (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8**(16): 2502-2508.
- Gorshtein A, Rubinfeld H, Kessler E, Theodoropoulou M, Cerovac V, Stalla GK, *et al.* (2009). Mammalian target of rapamycin inhibitors rapamycin and RAD001 (everolimus) induce anti-proliferative effects in GH-secreting pituitary tumor cells in vitro. *Endocr Relat Cancer* **16**(3): 1017-1027.
- Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, *et al.* (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature medicine* **8**(2): 128-135.
- Gulhati P, Cai Q, Li J, Liu J, Rychahou PG, Qiu S, *et al.* (2009). Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin signaling inhibits tumorigenesis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **15**(23): 7207-7216.
- Gulhati P, Zaytseva YY, Valentino JD, Stevens PD, Kim JT, Sasazuki T, *et al.* (2012). Sorafenib enhances the therapeutic efficacy of rapamycin in colorectal cancers harboring oncogenic KRAS and PIK3CA. *Carcinogenesis* **33**(9): 1782-1790.
- Guo M, Joiakim A, Reiners JJ, Jr. (2000). Suppression of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated aryl hydrocarbon receptor transformation and CYP1A1 induction by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *Biochemical pharmacology* **60**(5): 635-642.
- Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Cheng Y, Bernhard EJ, Muschel RJ, *et al.* (2001). The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res* **61**(10): 4278-4282.
- Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, Ahmed MS, Bakanauskas VJ, Muschel RJ, *et al.* (2003). Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **56**(3): 846-853.
- Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, *et al.* (2002). Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* **8**(3): 885-892.
- Harms V (ed) (1998). *Physik für Mediziner und Pharmazeuten*. Harms Verlag: Kiel-Mönkeberg.
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, *et al.* (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* **166**(2): 213-223.
- Hay N, Sonenberg N (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**(16): 1926-1945.
- Hayman TJ, Kramp T, Kahn J, Jamal M, Camphausen K, Tofilon PJ (2013). Competitive but Not Allosteric mTOR Kinase Inhibition Enhances Tumor Cell Radiosensitivity. *Translational oncology* **6**(3): 355-362.
- He X, Wang Y, Zhu J, Orloff M, Eng C (2011). Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling. *Cancer Lett* **301**(2): 168-176.
- Herbst RS (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **59**(2 Suppl): 21-26.
- Herrmann T, Baumann M, Dörr W (eds) (2006). *Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag.
- Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, *et al.* (2009). Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* **27**(23): 3822-3829.

- Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, Miyama K, Taguchi S, Tsujioka K, *et al.* (2010). MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **9**(7): 1956-1967.
- Hirst DG, Robson T (2010). Molecular biology: the key to personalised treatment in radiation oncology? *The British journal of radiology* **83**(993): 723-728.
- Holthusen H (1936). Erfahrungen über die Verträglichkeitsgrenze für Röntgenstrahlen und deren Nutzenanwendung. *Strahlentherapie* **57**: 254-269.
- Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, *et al.* (1999). Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res* **59**(4): 886-894.
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, *et al.* (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**(22): 2271-2281.
- Ikezoe T, Nishioka C, Bandobashi K, Yang Y, Kuwayama Y, Adachi Y, *et al.* (2007). Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia research* **31**(5): 673-682.
- Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, *et al.* (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res* **104**(1-4): 14-20.
- Joiner M, van der Kogel A (eds) (2009). *Basic Clinical Radiobiology*. Hodder Education.
- Kao GD, Jiang Z, Fernandes AM, Gupta AK, Maity A (2007). Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation. *J Biol Chem* **282**(29): 21206-21212.
- Karakas B, Bachman KE, Park BH (2006). Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *British journal of cancer* **94**(4): 455-459.
- Kasten-Pisula U, Saker J, Eicheler W, Krause M, Yaromina A, Meyer-Staeckling S, *et al.* (2011). Cellular and tumor radiosensitivity is correlated to epidermal growth factor receptor protein expression level in tumors without EGFR amplification. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **80**(4): 1181-1188.
- Kasukabe T, Okabe-Kado J, Haranosono Y, Kato N, Honma Y (2013). Inhibition of rapamycin-induced Akt phosphorylation by cotylenin A correlates with their synergistic growth inhibition of cancer cells. *International journal of oncology* **42**(2): 767-775.
- Kellerer AM, Rossi HH (1973). The biophysical properties of 3.9-GeV nitrogen ions. VI. Interpretation of results. *Radiat Res* **55**(3): 447-456.
- Khanna KK, Jackson SP (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**(3): 247-254.
- Kim KW, Hwang M, Moretti L, Jaboin JJ, Cha YI, Lu B (2008). Autophagy upregulation by inhibitors of caspase-3 and mTOR enhances radiotherapy in a mouse model of lung cancer. *Autophagy* **4**(5): 659-668.
- Kim KW, Moretti L, Mitchell LR, Jung DK, Lu B (2009). Combined Bcl-2/mammalian target of rapamycin inhibition leads to enhanced radiosensitization via induction of apoptosis and autophagy in non-small cell lung tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* **15**(19): 6096-6105.
- Kim TJ, Lee JW, Song SY, Choi JJ, Choi CH, Kim BG, *et al.* (2006). Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *British journal of cancer* **94**(11): 1678-1682.
- Konstantinidou G, Bey EA, Rabellino A, Schuster K, Maira MS, Gazdar AF, *et al.* (2009). Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin blockade is an effective radiosensitizing strategy for the treatment of non-small cell lung cancer harboring K-RAS mutations. *Cancer Res* **69**(19): 7644-7652.
- Kovacina KS, Park GY, Bae SS, Guzzetta AW, Schaefer E, Birnbaum MJ, *et al.* (2003). Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem* **278**(12): 10189-10194.
- Krasilnikov MA (2000). Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry. Biokhimiia* **65**(1): 59-67.

- Lang SA, Stoeltzing O, Klein D, Bolder U, Schlitt HJ, Geissler EK (2005). Inhibition von mTOR reduziert Tumorwachstum und Angiogenese des Magenkarzinoms in einem experimentellen Modell. In: Rothmund M, Jauch K-W, Bauer H (eds). *Chirurgisches Forum 2005 für experimentelle und klinische Forschung 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie Berlin, 05.04.-08.04.2005*, edn. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. p^{pp} 113-114.
- Leber R, Wise TW, Mizuta R, Meek K (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **273**(3): 1794-1801.
- Lee CM, Fuhrman CB, Planelles V, Peltier MR, Gaffney DK, Soisson AP, *et al.* (2006). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **12**(1): 250-256.
- Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, *et al.* (2005). Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *Journal of clinical pathology* **58**(11): 1199-1205.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**(8): 627-644.
- Liu R, Liu D, Trink E, Bojdani E, Ning G, Xing M (2011). The Akt-specific inhibitor MK2206 selectively inhibits thyroid cancer cells harboring mutations that can activate the PI3K/Akt pathway. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **96**(4): E577-585.
- Liu Y, Sun SY, Owonikoko TK, Sica GL, Curran WJ, Khuri FR, *et al.* (2012). Rapamycin induces Bad phosphorylation in association with its resistance to human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* **11**(1): 45-56.
- Lo Nigro C, Arnolfo E, Taricco E, Fruttero A, Russi EG, Lucio F, *et al.* (2007). The cisplatin-irradiation combination suggests that apoptosis is not a major determinant of clonogenic death. *Anti-cancer drugs* **18**(6): 659-667.
- Lobrich M, Jeggo PA (2005). Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair (Amst)* **4**(7): 749-759.
- LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA (2008). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* **11**(1-2): 32-50.
- Luwor RB, Zhu HJ, Walker F, Vitali AA, Perera RM, Burgess AW, *et al.* (2004). The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR. *Oncogene* **23**(36): 6095-6104.
- Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *The Biochemical journal* **417**(3): 639-650.
- Manning BD, Cantley LC (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**(7): 1261-1274.
- Margolin K, Longmate J, Baratta T, Synold T, Christensen S, Weber J, *et al.* (2005). CCI-779 in metastatic melanoma: a phase II trial of the California Cancer Consortium. *Cancer* **104**(5): 1045-1048.
- Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann MP (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1784**(1): 159-185.
- Martelli AM, Tazzari PL, Tabellini G, Bortul R, Billi AM, Manzoli L, *et al.* (2003). A new selective AKT pharmacological inhibitor reduces resistance to chemotherapeutic drugs, TRAIL, all-trans-retinoic acid, and ionizing radiation of human leukemia cells. *Leukemia* **17**(9): 1794-1805.
- Mita MM, Mita A, Rowinsky EK (2003). The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther* **2**(4 Suppl 1): S169-177.
- Mitchell G (2013). The rationale for fractionation in radiotherapy. *Clinical journal of oncology nursing* **17**(4): 412-417.
- Moscatoello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, *et al.* (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* **55**(23): 5536-5539.
- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, *et al.* (2010). Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma : final results and analysis of prognostic factors. *Cancer* **116**(18): 4256-4265.

- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, *et al.* (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* **372**(9637): 449-456.
- Murphy JD, Spalding AC, Somnay YR, Markwart S, Ray ME, Hamstra DA (2009). Inhibition of mTOR radiosensitizes soft tissue sarcoma and tumor vasculature. *Clin Cancer Res* **15**(2): 589-596.
- Murray D, McEwan AJ (2007). Radiobiology of systemic radiation therapy. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* **22**(1): 1-23.
- Nagata Y, Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Ohnishi T, Tojo T, *et al.* (2010). Effect of rapamycin, an mTOR inhibitor, on radiation sensitivity of lung cancer cells having different p53 gene status. *International journal of oncology* **37**(4): 1001-1010.
- Nassim R, Mansure JJ, Chevalier S, Cury F, Kassouf W (2013). Combining mTOR inhibition with radiation improves antitumor activity in bladder cancer cells in vitro and in vivo: a novel strategy for treatment. *PLoS One* **8**(6): e65257.
- Neshat MS, Mellinghoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, *et al.* (2001). Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(18): 10314-10319.
- Nicholson KM, Anderson NG (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**(5): 381-395.
- No M, Choi EJ, Kim IA (2009). Targeting HER2 signaling pathway for radiosensitization: alternative strategy for therapeutic resistance. *Cancer Biol Ther* **8**(24): 2351-2361.
- Noh WC, Mondesire WH, Peng J, Jian W, Zhang H, Dong J, *et al.* (2004). Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **10**(3): 1013-1023.
- Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS (2006). Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* **6**(11): 876-885.
- O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, *et al.* (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* **66**(3): 1500-1508.
- Paez J, Sellers WR (2003). PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer treatment and research* **115**: 145-167.
- Pajonk F, Vlashi E, McBride WH (2010). Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem cells* **28**(4): 639-648.
- Park J, Feng J, Li Y, Hammarsten O, Brazil DP, Hemmings BA (2009). DNA-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of protein kinase B requires a specific recognition sequence in the C-terminal hydrophobic motif. *J Biol Chem* **284**(10): 6169-6174.
- Povirk LF, Zhou RZ, Ramsden DA, Lees-Miller SP, Valerie K (2007). Phosphorylation in the serine/threonine 2609-2647 cluster promotes but is not essential for DNA-dependent protein kinase-mediated nonhomologous end joining in human whole-cell extracts. *Nucleic acids research* **35**(12): 3869-3878.
- Puck TT, Marcus PI (1956). Action of x-rays on mammalian cells. *The Journal of experimental medicine* **103**(5): 653-666.
- Radhakrishnan P, Baraneedharan U, Veluchamy S, Dhandapani M, Pinto DD, Thiyagarajan S, *et al.* (2013). Inhibition of rapamycin-induced AKT activation elicits differential antitumor response in head and neck cancers. *Cancer Res* **73**(3): 1118-1127.
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current opinion in genetics & development* **12**(2): 162-169.
- Reiser M, Kunh F-P, Debus J (eds) (2011). *Duale Reihe Radiologie*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
- Rewcastle G, Denny, WA (2009). Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-kinases: The Next Wave of Anti-Cancer Drugs? *Chemistry in New Zealand January 2009*: 9-11.
- Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, *et al.* (2001). Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* **61**(16): 6105-6111.

- Rivera VM, Squillace RM, Miller D, Berk L, Wardwell SD, Ning Y, *et al.* (2011). Ridaforolimus (AP23573; MK-8669), a potent mTOR inhibitor, has broad antitumor activity and can be optimally administered using intermittent dosing regimens. *Mol Cancer Ther* **10**(6): 1059-1071.
- Robertson GP (2005). Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24**(2): 273-285.
- Roforth MM, Tan C (2008). Combination of rapamycin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin abrogates Akt activation and potentiates mTOR blockade in breast cancer cells. *Anti-cancer drugs* **19**(7): 681-688.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**(10): 5858-5868.
- Roper J, Richardson MP, Wang WV, Richard LG, Chen W, Coffee EM, *et al.* (2011). The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 induces tumor regression in a genetically engineered mouse model of PIK3CA wild-type colorectal cancer. *PLoS One* **6**(9): e25132.
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology* **23**(16): 5706-5715.
- Roulin D, Cerantola Y, Dormond-Meuwly A, Demartines N, Dormond O (2010). Targeting mTORC2 inhibits colon cancer cell proliferation in vitro and tumor formation in vivo. *Mol Cancer* **9**: 57.
- Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, *et al.* (1998). Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *Journal of the National Cancer Institute* **90**(11): 824-832.
- Sabatini DM (2006). mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* **6**(9): 729-734.
- Saki M, Toulany M, Rodemann HP (2013). Acquired resistance to cetuximab is associated with the overexpression of Ras family members and the loss of radiosensitization in head and neck cancer cells. *Radiother Oncol* **108**(3): 473-478.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology* **19**(3): 183-232.
- Samuels Y, Ericson K (2006). Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Current opinion in oncology* **18**(1): 77-82.
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, *et al.* (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**(5670): 554.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* **73**: 39-85.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**(5712): 1098-1101.
- Schiewer MJ, Den R, Hoang DT, Augello MA, Lawrence YR, Dicker AP, *et al.* (2012). mTOR is a selective effector of the radiation therapy response in androgen receptor-positive prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* **19**(1): 1-12.
- Schlessinger J (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**(2): 211-225.
- Schutze C, Krause M, Yaromina A, Zips D, Baumann M (2010). [Nuclear medicine meets radiation therapy- the radiooncologist's view]. *Nuklearmedizin. Nuclear medicine* **49 Suppl 1**: S11-15.
- Serr F, Wiedmann M, Kamenz T, Tannapfel A, Mössner J, Hauss J, *et al.* (2006). Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib (Glivec) und NVP-AEE788 und der mTOR-Inhibitor Sirolimus hemmen das Wachstum von Gallengangskarzinomen in vitro und in vivo. In: H-D. S, Jauch K-W, Bauer H (eds). *Chirurgisches Forum 2006 für experimentelle und klinische Forschung 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie Berlin, 02.05.-05.05.2006*, edn. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. p^{pp} 49-51.
- Seufferlein T, Rozengurt E (1996). Rapamycin inhibits constitutive p70s6k phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* **56**(17): 3895-3897.
- Sheridan MT, West CM (2001). Ability to undergo apoptosis does not correlate with the intrinsic radiosensitivity (SF2) of human cervix tumor cell lines. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **50**(2): 503-509.

- Shi Y, Gera J, Hu L, Hsu JH, Bookstein R, Li W, *et al.* (2002). Enhanced sensitivity of multiple myeloma cells containing PTEN mutations to CCI-779. *Cancer Res* **62**(17): 5027-5034.
- Shinohara ET, Cao C, Niermann K, Mu Y, Zeng F, Hallahan DE, *et al.* (2005). Enhanced radiation damage of tumor vasculature by mTOR inhibitors. *Oncogene* **24**(35): 5414-5422.
- Simpson L, Parsons R (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Experimental cell research* **264**(1): 29-41.
- Sinclair WK, Ross DW (1969). The cell cycle distribution of Chinese hamster cells in stationary phase cultures. ANL-7635. *Anl*: 229-232.
- Singh K, Sun S, Vezina C (1979). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. IV. Mechanism of action. *J Antibiot (Tokyo)* **32**(6): 630-645.
- Soliman GA, Acosta-Jaquez HA, Dunlop EA, Ekim B, Maj NE, Tee AR, *et al.* (2010). mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J Biol Chem* **285**(11): 7866-7879.
- Song G, Ouyang G, Bao S (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**(1): 59-71.
- Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH (1989). The 5Rs of radiobiology. *Int J Radiat Biol* **56**(6): 1045-1048.
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res* **64**(7): 2390-2396.
- Streffler C, Herrmann T (2012). [A century of development in radiation biology. Basic principles of targeted and efficient radiotherapy]. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]* **188 Suppl 3**: 231-244.
- Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, *et al.* (2005). Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res* **65**(16): 7052-7058.
- Taberero J, Rojo F, Calvo E, Burriss H, Judson I, Hazell K, *et al.* (2008). Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* **26**(10): 1603-1610.
- Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, Kanzawa T, Aoki H, Mills GB, *et al.* (2005). Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res* **65**(8): 3336-3346.
- Tanaka T, Munshi A, Brooks C, Liu J, Hobbs ML, Meyn RE (2008). Gefitinib radiosensitizes non-small cell lung cancer cells by suppressing cellular DNA repair capacity. *Clin Cancer Res* **14**(4): 1266-1273.
- Tanno S, Yanagawa N, Habiro A, Koizumi K, Nakano Y, Osanai M, *et al.* (2004). Serine/threonine kinase AKT is frequently activated in human bile duct cancer and is associated with increased radioresistance. *Cancer Res* **64**(10): 3486-3490.
- Tannock IF (1996). Treatment of cancer with radiation and drugs. *J Clin Oncol* **14**(12): 3156-3174.
- Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, *et al.* (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* **284**(12): 8023-8032.
- Toker A, Newton AC (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* **275**(12): 8271-8274.
- Toulany M, Dittmann K, Baumann M, Rodemann HP (2005). Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS. *Radiother Oncol* **74**(2): 117-129.
- Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, Wang S, Chen J, Dittmann K, *et al.* (2006). Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res* **12**(13): 4119-4126.
- Toulany M, Kehlback R, Florczak U, Sak A, Wang S, Chen J, *et al.* (2008). Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther* **7**(7): 1772-1781.

- Toulany M, Lee KJ, Fattah KR, Lin YF, Fehrenbacher B, Schaller M, *et al.* (2012). Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Res* **10**(7): 945-957.
- Toulany M, Rodemann HP (2010). Membrane receptor signaling and control of DNA repair after exposure to ionizing radiation. *Nuklearmedizin. Nuclear medicine* **49 Suppl 1**: S26-30.
- Toulany M, Rodemann, HP (2013). Potential of Akt mediated DNA repair in radioresistance of solid tumors overexpressing erbB-PI3K-Akt pathway. *Transl Cancer Res* **2**(3): 190-202.
- Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczyk M, Watanabe T, *et al.* (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**(13): 2943-2954.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends in biochemical sciences* **22**(7): 267-272.
- Vink SR, Lagerwerf S, Mesman E, Schellens JH, Begg AC, van Blitterswijk WJ, *et al.* (2006). Radiosensitization of squamous cell carcinoma by the alkylphospholipid perfosine in cell culture and xenografts. *Clin Cancer Res* **12**(5): 1615-1622.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**(7): 5241-5248.
- Wagener C, Müller O (eds) (2010). *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
- Walker RA, Dearing SJ (1999). Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast cancer research and treatment* **53**(2): 167-176.
- Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ (2007). Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* **26**(13): 1932-1940.
- Wang X, Sun SY (2009). Enhancing mTOR-targeted cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **13**(10): 1193-1203.
- Wang X, Yue P, Kim YA, Fu H, Khuri FR, Sun SY (2008). Enhancing mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted cancer therapy by preventing mTOR/raptor inhibition-initiated, mTOR/rictor-independent Akt activation. *Cancer Res* **68**(18): 7409-7418.
- Weterings E, Chen DJ (2007). DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys? *J Cell Biol* **179**(2): 183-186.
- Weterings E, Chen DJ (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell research* **18**(1): 114-124.
- Withers HR (1975). The four Rs of radiotherapy. In: *Advances in radiation biology*, Lett JT, Adler H (eds). New York: Academic Press.
- Wolpin BM, Hezel AF, Abrams T, Blaszkowsky LS, Meyerhardt JA, Chan JA, *et al.* (2009). Oral mTOR inhibitor everolimus in patients with gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **27**(2): 193-198.
- Xu CX, Li Y, Yue P, Owonikoko TK, Ramalingam SS, Khuri FR, *et al.* (2011). The combination of RAD001 and NVP-BEZ235 exerts synergistic anticancer activity against non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *PLoS One* **6**(6): e20899.
- Yap TA, Yan L, Patnaik A, Fearon I, Olmos D, Papadopoulos K, *et al.* (2011). First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* **29**(35): 4688-4695.
- Yu K, Toral-Barza L, Discafani C, Zhang WG, Skotnicki J, Frost P, *et al.* (2001). mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **8**(3): 249-258.
- Yuan R, Kay A, Berg WJ, Lebowitz D (2009). Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol* **2**: 45.
- Zhang W, Haines BB, Efferson C, Zhu J, Ware C, Kunii K, *et al.* (2012). Evidence of mTOR Activation by an AKT-Independent Mechanism Provides Support for the Combined Treatment of PTEN-Deficient Prostate Tumors with mTOR and AKT Inhibitors. *Translational oncology* **5**(6): 422-429.

- Zhou HY, Huang SL (2012). Current development of the second generation of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Chin J Cancer* **31**(1): 8-18.
- Zhuang W, Li B, Long L, Chen L, Huang Q, Liang Z (2011). Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *Int J Cancer* **129**(11): 2720-2731.
- Zips D, Krause M, Yaromina A, Dorfler A, Eichele W, Schutze C, *et al.* (2008). Epidermal growth factor receptor inhibitors for radiotherapy: biological rationale and preclinical results. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **60**(8): 1019-1028.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(1): 21-35.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Akt1/2/3	Proteinkinase B (PKB) alpha/beta/gamma
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BOLERO2	<i>Breast Cancer Trials of Oral Everolimus 2</i>
BSA	Albumin Fraktion V, <i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
D ₃₇	Strahlendosis, bei der die SF 37 % beträgt
Dapi	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dullbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	dosismodifizierende Faktor, <i>dose modification factor</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase, <i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	katalytische Untereinheit der DNA-PK, <i>DNA-PK catalytic subunit</i>
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
4E-BP1	<i>eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, <i>epidermal growth factor receptor</i>
eIF4E	<i>eukaryotic initiation factor 4E</i>
ErbB	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog</i>
FCS	Fetales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKBP12	<i>12 kDa FK506 Binding Protein</i>
g	Gramm
GβL	<i>G protein beta subunit-like</i>
GS3α/β	<i>Glycogen synthase kinase 3α/β</i>
Gy	Gray
γ-H2AX	Histon 2AX, phosphoryliert an S139
HCl	Salzsäure
HM	hydrophobes Motiv
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
HR	Homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>

IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
i. d. R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
IRS1	<i>insulin receptor substrate 1</i>
iSH2	<i>inter-Src homology 2</i>
J	Joule
JAK	Januskinase, <i>Janus kinase</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Konz.	Konzentration
KRAS	<i>Ki-ras2 Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
kVp	Kilovolt Peak
l	Liter
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mSIN1	<i>mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1</i> , auch MAPKAP1
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1/2	<i>mTOR complex 1/2</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung, <i>non-homologous end joining</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, non-small cell lung cancer
Opti-MEM	<i>Opti-Minimum Essential Medium Eagle</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P-	Phospho-
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PDK1/2	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1/2</i>
PE	Koloniebildungseffizienz, <i>plating efficiency</i>
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol(4,5)biphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphat

PKB $\alpha/\beta/\gamma$	Proteinkinase alpha/beta/gamma, auch Akt1/2/3
PLC γ	Phospholipase c gamma, <i>Phospholipase c gamma</i>
PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate 40 kDa</i>
Protor	<i>protein observed with rictor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Raptor	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rictor	<i>rapamycin-insensitive comapnion of mTOR</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>resolutions per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Serin
S6	<i>ribosomal protein S6</i>
S6K1	<i>p70 ribosomal protein S6 kinase 1</i>
SH2/3	<i>Src-homology 2/3</i>
SD	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodiumdodecylsulfate</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, <i>standard error of the mean</i>
SF	Überlebensfraktion, <i>surviving fraction</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Std.	Stunde
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-Buffered Saline Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF α	<i>Transforming growth factor alpha</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSC1/2	<i>Tuberous sclerosis 1/2</i>
u. a.	unter anderem
v/v	Volumen/Volumen, Volumenprozent
wt	Wildtyp
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 4</i>
z. B.	zum Beispiel
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten
°C	Grad Celcius
%	Prozent
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
*	signifikant
**	sehr signifikant
***	höchst signifikant

7 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Marina Holler, geb. Bechtel
 Geburtsdatum: 14.12.1983
 Geburtsort: Brackenheim
 Nationalität: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit 10/2014 **Quality Manager**
 Protagen Protein Services GmbH, Heilbronn

05/2014 – 09/2014 **Berufliche Fortbildung „Life Science Management“**
 Ausbildung Training Vernetzung GmbH, München

12/2010 – 11/2013 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Radioonkologie, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung

05/2010 – 11/2010 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
 Universitätsklinikum Tübingen, Medizinische Klinik II, Abteilung für Onkologie, Hämatologie, Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie

11/2008 – 12/2009 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
 Universität Ulm, Institut für Allgemeine Zoologie und Endokrinologie sowie Institut für Biochemie und Molekulare Biologie

03/2008 – 04/2008 **Praktikantin im Bereich Zell- und Tumorbiologie**
 Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, Abteilung Molekularbiologie der Zelle II

08/2007 – 09/2007 **Praktikantin im Bereich mikrobiologische Qualitätskontrolle**
 Weleda AG, Schwäbisch Gmünd, Abteilung Mikrobiologie

Ausbildung

12/2010 – 11/2013 **Promotion im internationalen DFG-Graduiertenkolleg 1302 „Der PI3K Signalweg bei Tumorwachstum und Diabetes“**
 Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Radioonkologie, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung

10/2004 – 03/2010 **Abschluss: Diplom-Biologin**
 Universität Ulm

09/1994 – 09/2003 **Abschluss: Allgemeine Hochschulreife**
 Gymnasium Eppingen

Poster

„Role of PI3K/Akt signaling in the differential radiation response of NSCLC cells to rapamycin *in vitro*.“

06/2013 - Ermatingen (CH):

13. International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology

„Activation of PI3K/Akt by rapamycin prevents its radiosensitizing effect in NSCLC cells.“

02/2013 - Keystone (Colorado, USA):

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, PI3-Kinase and Interplay with Other Signaling Pathways

„Radiosensitization of human solid tumor cells by double targeting PI3K/Akt and mTOR signaling pathways.“

09/2011 - Rheinbach (DE):

14. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung

Vorträge

„Rapamycin-induced activation of Akt prevents its radiosensitizing effect on human solid tumor cells.“

05/2012 - Barcelona (ES):

31. European Society for Radiotherapy and Oncology

„Rapamycin-induced activation of the PI3K/Akt pathway interferes with its radiosensitization in lung cancer cell lines.“

02/2012 - Hamburg (DE):

21. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie

Publikationen

Toulany M, Mihatsch J, Holler M, Chaachouay H, Rodemann HP

„Cisplatin-mediated radiosensitization of non-small cell lung cancer cells is stimulated by ATM inhibition.“

Radiother Oncol. 2014; 111(2):228-36

Toulany M, Minjee M, Saki M, Holler M, Meier F, Eicheler W, Rodemann HP

„ERK2-dependent reactivation of Akt mediates the limited response of tumor cells with constitutive K-RAS activity to PI3K inhibition.“

Cancer Biol Ther. 2013;15(3):1-12

Laschak M, Bechtel M, Spindler KD, Hessenauer A

„Inability of NCoR/SMRT to repress androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cell lines.“

Int J Mol Med. 2011;28(4):645-51

8 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt all jenen, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Mahmoud Toulany für die ausgezeichnete und kompetente Betreuung, die wirklich vorbildlich war, bedanken. Vielen Dank für das Vertrauen, das du mir entgegengebracht hast. Ich bin sehr froh darüber, dass es dir gelungen ist, deine enorme Begeisterungsfähigkeit auf mich zu übertragen. Deine Anregungen und Ideen haben ganz entscheidend zu meiner Motivation und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Prof. Dr. H. Peter Rodemann für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die Übernahme des Erstgutachtens und insbesondere auch dafür, dass Sie es mir ermöglicht haben, an Weiterbildungen und zahlreichen Kongressen teilzunehmen.

Bei Prof. Blin bedanke ich mich, dass er mir durch die Begutachtung meiner Arbeit die Möglichkeit gegeben hat, an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen zu promovieren. Vielen Dank für den unkomplizierten und freundlichen Umgang!

Danken möchte ich auch Dr. Rainer Kehlbach und Rüdiger Bantleon aus der Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Tübingen, für die Mitbenutzung des Fluoreszenzmikroskops. Vielen Dank für eure kooperative und durchweg freundliche Art!

Natürlich geht ein ganz lieber Dank an alle gegenwärtigen und ehemaligen Mitglieder der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung: an Prof. Dr. Klaus Dittmann, Claus Mayer, Dr. Petra Ohneseit, Dr. Apostolos Menegakis, Eva Bathelt, Dr. Julia Mihatsch, Elena Hausherr, Angela Paasch, Dr. Hassan Chaachouay, Dr. Mohammad Saki und Franziska Hauth. Hervorheben möchte ich Tim Schickfluß, der mich in meiner Anfangszeit so gut in die Methoden eingelernt hat, und Simone Keinath, deren Anwesenheit und herzliche Art mich immer sehr erfreute.

Ganz besonders danken möchte ich auch Neele Drobnitzky, die mich während meiner Doktorarbeit im Labor leider nur sehr kurze Zeit begleitete. Neele, unsere gemeinsame Zeit als Kolleginnen war zwar kurz, aber dafür sehr intensiv! Vielen Dank für deine Hilfsbereitschaft, deinen Tatendrang, deine selbstgebackenen Leckereien und dafür, dass du immer ein offenes Ohr hattest. Unvergessen bleibt natürlich auch dein Engagement bezüglich meiner Hochzeitsfrisur ☺.

Ein ganz liebes Dankeschön gebührt Katharina Mück, in der ich nicht nur die weltbeste Büro- und Laborkollegin, sondern auch eine ganz tolle Freundin fand. Kathi, vielen herzlichen Dank für die hervorragende Zusammenarbeit, deine Hilfe, die tollen und oftmals verrückten

Gespräche, deine geteilte Süßigkeiten-Abstinenz-Begeisterung, das „zu viele“ Lachen ☺, fürs Korrekturlesen meiner Arbeit und einfach dafür, dass wir eine unvergessliche gemeinsame Zeit hatten. Du fehlst mit ganz doll!

Ein ganz großes Dankeschön gilt auch meiner großartigen Familie. Es ist schön zu wissen, dass ihr immer für mich da seid! Ein ganz besonderer Dank geht an meine Schwester Linda, die diese Arbeit sehr schnell gelesen und sich auf die Suche nach Tippfehlern gemacht hat.

Unendlich dankbar bin ich meinem Ehemann Felix für seine bedingungslose Unterstützung. Danke, dass du mir – auch wenn du das universitäre System nicht immer begreifen konntest/wolltest – geholfen hast, auch in schwierigen Zeiten durchzuhalten und sorry, dass du meine schlechten Launen ertragen musstest ☹, wenn die Versuche mal wieder nicht so funktionierten wie sie sollten! Vielen lieben Dank auch dafür, dass du in der von mir als endlos empfundenen Schreibphase immer für mich (und auch für meine Computerproblemchen) da warst – deine aufmunternden Worte und lebensfrohe Art ließen mich immer wieder nach vorne blicken und den Glauben an mich selbst nicht verlieren. Tausend Dank für deine unendliche Liebe und die schönen Momente, die wir bisher zusammen erleben durften!