Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. G. Hildebrandt

Wirkung von Celecoxib und Cetuximab auf die Strahlensensibilität der Tumorzelllinien A549 und FaDu *in vitro*

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften
(Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Stephan Kriesen

aus Rostock

geboren am 08.09.1975 in Rostock

urn:nbn:de:gbv:28-diss2013-0080-5

Gutachter:

1. Gutachter:
   Prof. Dr. Guido Hildebrandt
   Universitätsmedizin Rostock
   Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie

2. Gutachter:
   Prof. Dr. J.G. Barbara Nebe
   Universitätsmedizin Rostock
   Zentrum für Medizinische Forschung, Arbeitsbereich Zellbiologie

3. Gutachter:
   Prof. Dr. Cordula Petersen
   Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
   Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Datum der Einreichung: 07. November 2012

Datum der Verteidigung: 21. Mai 2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ……III

1. Einleitung ...……1
1.1 Interdisziplinäre Onkologie .....……1
1.2 Zielmoleküle und Wirkstoffe zur potentiell kombinierten Therapie …...……..2
1.2.1 Cyclooxygenase-2 und Celecoxib ……...……2
1.2.2 EGF-Rezeptor und Cetuximab ……...…….4
1.3 Direktive für eine Kombination von Celecoxib und Cetuximab 7
1.4 Fragestellung ...……..9

2. Material und Methoden ...……...10
2.1 Zelllinien ……...……..10
2.2 Wirkstoffe …...…….10
2.3 Experimentelle Methoden ...…….11
2.3.1 Untersuchung des Zellwachstums mittels Wachstumskurven ……...…11
2.3.2 Bestrahlung der Zellkulturen ...…….12
2.3.3 Untersuchungen zum klonogenen Überleben mittels Koloniebildungstest …..16
2.3.4 Untersuchungen zum Reparaturverhalten von DNA-Doppelstrangbrüchen …18
2.3.5 Analyse des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie …….20
2.4 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien …….21
2.5 Chemikalien ……23

3. Ergebnisse ……25
3.1 Wachstumskurven – Zunahme der Zellzahl ……..……..25
3.2 Koloniebildungstests – klonogenes Überleben ……30
3.2.1 Einfluss von Celecoxib auf das klonogene Überleben ……30
3.2.2 Einfluss von Cetuximab auf das klonogene Überleben ……...……32
3.2.3 Einfluss der kombinierten Behandlung mit Celecoxib und Cetuximab ……
auf das klonogene Überleben ……..……..34

3.3 γH2AX-Tests – Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ……...…36
3.4 Durchflusszytometrie – Zellzyklus ……..……41

4. Diskussion ……..……49
4.1 Zellwachstum ……...……49
4.1.1 Zellwachstum unter Einfluss von Celecoxib ……..……..49
4.1.2 Zellwachstum unter Einfluss von Cetuximab ……...50
4.2 Klonogenes Überleben ……....51
4.2.1 Klonogenes Überleben unter Einfluss von Celecoxib ……..52
4.2.2 Klonogenes Überleben unter Einfluss von Cetuximab …….53
4.2.3 Klonogenes Überleben unter Einfluss von Celecoxib und Cetuximab ……53
4.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen …….54
4.4 Zellzyklus …….56
4.5 Direktive für eine Kombination der Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab ……59

5. Zusammenfassung ……62

Literaturverzeichnis ..…….64

Abkürzungsverzeichnis

14-3-3σ	Bindeprotein 14-3-3σ
A549	Zelllinie eines Adenokarzinoms der Lunge
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
Akt	Proteinkinase B
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	ataxia telangiectasia mutated (Protein-Kinase)
ATR	ataxia telangiectasia Rad3-related (Protein-Kinase)
BSA	bovine serum albumin
C225	Erbitux® bzw. Cetuximab
CDK	cyclin-dependent kinase
COX	Cyclooxygenase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
et al.	und andere
FaDu	Zelllinie eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx
FDA	Food and Drug Administration
G-Phase	Gap-Phase
GFL mbH	Gesellschaft für Labortechnik mbH
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H2AX	Histongruppe H2A, phosphoryliert
HBS	HEPES-buffered saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	humaner epidermaler Rezeptor

HR	homologe Rekombination
IC_{50}	Konzentration, bei der das Wachstum um 50 % gehemmt wird
LQ-Modell	Linear-Quadratisches-Modell
MAPK	mitogen-aktivierende Protein-Kinasen
N	Anzahl der durchgeführten, unabhängigen Versuche
NHEJ	nicht-homologes end joining
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p53	Tumorprotein p53
PBS	phosphat buffered saline
PE	Plattiereffizienz, plating efficiency
PGE_2	Prostaglandin E_2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PTW	Physikalisch Technische Werkstätten Freiburg GmbH
Rad3	Proteinkinase Rad3
S-Phase	Synthese-Phase
STAT	signal transducers and activators of transcription
STL	Stammlösung
T_{25}	Zellkulturflasche mit 25 cm² Wachstumsfläche
T_{75}	Zellkulturflasche mit 75 cm² Wachstumsfläche
Tab.	Tabelle
TGF-α	transforming growth factor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VL	Verdünnungslösung
Δ	Messunsicherheit

1. Einleitung

1.1 Interdisziplinäre Onkologie

Die evidenzbasierten komplexen onkologischen Behandlungskonzepte maligner Tumoren stellen eine interdisziplinäre Herausforderung an alle beteiligten Fachdisziplinen dar. Dabei werden je nach Tumorart im Wesentlichen die chirurgische Entfernung des soliden Tumors und befallener Lymphknoten, die Strahlentherapie und eine medikamentöse Systemtherapie (Chemotherapie, Antikörpertherapie) miteinander kombiniert [1,2]. Die Kombination von Strahlen- und Chemotherapie verspricht dabei nicht nur einen additiven Effekt. In den letzten Jahren wird vielmehr nach Substanzen gesucht, die einen direkten Einfluss auf die Strahlensensibilität der Tumorzellen ausüben und damit synergistische Effekte auslösen [3]. Es hat sich sehr schnell gezeigt, dass eine generelle Radiosensibilisierung von Tumorzellen durch Medikamente schwierig ist. Daher ist es sinnvoll, die zu behandelnden malignen Tumorzellen molekularbiologisch näher zu charakterisieren. Dies ermöglicht die Entwicklung einer exakt darauf abgestimmten medikamentösen Behandlung (sog. targeted therapy), die eine größtmögliche zytotoxische Wirkung in Kombination mit Bestrahlung bei gleichzeitig fehlender oder geringer therapieassoziierter Toxizität am gesunden Normalgewebe gewährleistet [4]. Präklinische Untersuchungen an etablierten Tumorzelllinien sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell bilden dabei die Grundlage der Entwicklung neuer, molekularbiologisch basierter Therapieoptionen. Auf diese Weise können Erkenntnisse zu den intra- und extrazellulären Wirkungsmechanismen kombinierter Therapien gewonnen werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich dazu mit zwei potentiellen Zielmolekülen an zwei repräsentativen malignen Tumorzell-linien *in vitro*.

1.2 Zielmoleküle und Wirkstoffe zur potentiell kombinierten Therapie

1.2.1 Cyclooxygenase-2 und Celecoxib

Die Cyclooxygenase (COX) ist ein seit langem bekanntes Enzym, das essentiell an der Synthese der Prostaglandine aus der in der Zellmembran lokalisierten Arachidonsäure mitwirkt [5,6]. Eine Hemmung dieses Enzyms führt zu einer verminderten Prostaglandinausschüttung und wird daher seit Jahrzehnten zur therapeutischen Intervention bei Entzündungen und Schmerzen mittels nicht-steroidaler anti-inflammatorischer Medikamente (non-steroidal anti-inflammatory drugs, sog. NSAIDs, z. B. Acetylsalicylsäure) genutzt. Ein gravierender Nachteil dieser NSAIDs besteht in unerwünschten Nebenwirkungen auf den Gastrointestinaltrakt, der in seiner physiologischen Funktion ebenfalls auf COX angewiesen ist [7,8].

In den frühen 90er Jahren wurde entdeckt, dass COX in den beiden Isoformen Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) vorliegt. Während COX-1 in den meisten Geweben permanent exprimiert wird und für normale physiologische Prozesse verantwortlich ist, wird COX-2 über eine Vielzahl von zellulären Mechanismen, z.B. bei Entzündungen, induziert [8,9]. Die unterschiedliche geometrische Molekülstruktur, welche Unterschiede im aktiven Zentrum von COX-1 und COX-2 zu Folge hat, erlaubte die Entwicklung hoch spezifischer Inhibitoren für COX-2 [10], die einerseits die induzierte Prostaglandinsynthese stark hemmen und damit sehr potent gegen Entzündungen und Schmerzen eingesetzt werden können, andererseits aber COX-1 kaum beeinflussen und daher ein deutlich günstigeres Nebenwirkungsprofil hinsichtlich des Gastrointestinaltraktes aufweisen [8, 11].

Von vier auf dem Arzneimittelmarkt eingeführten spezifischen COX-2-Inhibitoren mussten zwei Substanzen, Rofecoxib (Vioxx®) und Valdecoxib (Bextra®), wegen möglicher schwerwiegender kardiovaskulärer Komplikationen wieder vom Markt genommen werden. Von den verbleibenden Substanzen ist Celecoxib (Celebrex®) der einzige weltweit zugelassene selektive COX-2-Inhibitor. Etoricoxib (Arcoxia®)

ist in den USA von der FDA (Food and Drug Administration) zurzeit nicht zugelassen [12].

Der Wirkstoff Celecoxib wurde ursprünglich im Wesentlichen zur systemischen Schmerztherapie, vor allem bei rheumatoider Arthritis, entwickelt. Für die Onkologie ist dieser Wirkstoff insofern interessant, als dass COX-2 offenbar schon bei der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt und diese mit einer Hemmung der COX-2 z. B. mittels Celecoxib positiv beeinflusst werden kann [13,14]. In zahlreichen malignen Tumoren und Tumorzelllinien konnte eine deutlich erhöhte Expression der COX-2 nachgewiesen werden [15-19]. Es ist bekannt, dass diese COX-2-Überexpression in Tumorzellen zu einem beschleunigten Wachstum und einer verstärkten Angiogenese und Metastasierung, sowie zu einer Protektion gegenüber Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung führen kann [20-22]. Weiterhin kann die Aktivität von COX-2 auch durch Strahlung induziert werden, wobei das synthetisierte Prostaglandin E_2 (PGE_2) zur Radioprotektion der Zellen beitragen kann [23-25]. Daher wird von einer Hemmung der COX-2 ein zytotoxischer und radiosensibilisierender Effekt auf Tumorzellen über einen COX-2-abhängigen Wirkungsmechanismus erwartet. Dies wurde bereits für verschiedene Tumorzelllinien in einer Vielzahl von präklinischen Studien untersucht [25-33]. Die so gewonnenen Daten waren vielversprechend, so dass diverse klinische Studien zur kombinierten Therapie z. B. mit Celecoxib initiiert wurden [34-38]. Allerdings gibt es bisher keine Phase-III-Studie, in der für die zusätzliche Gabe von Celecoxib ein Überlebensvorteil oder eine Verbesserung der lokalen Kontrolle nachgewiesen werden konnte. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass COX-2-Inhibitoren wie Celecoxib in viele verschiedene Regulationsmechanismen der Zelle eingreifen können, und zwar auch und vielleicht sogar wesentlich in COX-2-unabhängigen Wirkungsmechanismen [39,40]. Einen Überblick über die Vielzahl der möglichen intrazellulären Interventionen des COX-2-Inhibitors Celecoxib und damit auch eine Darlegung der offensichtlichen Komplexität dieser Thematik gibt die Abbildung 1 [40]. Die Interaktion dieses Wirkstoffes mit zahlreichen essentiellen Molekülen ermöglicht einerseits verschiedene Ansätze für kombinierte Therapien, erschwert aber andererseits auch das Verständnis der Wirkungsmechanismen und der Reaktionen von Tumorzellen auf diese Substanz.

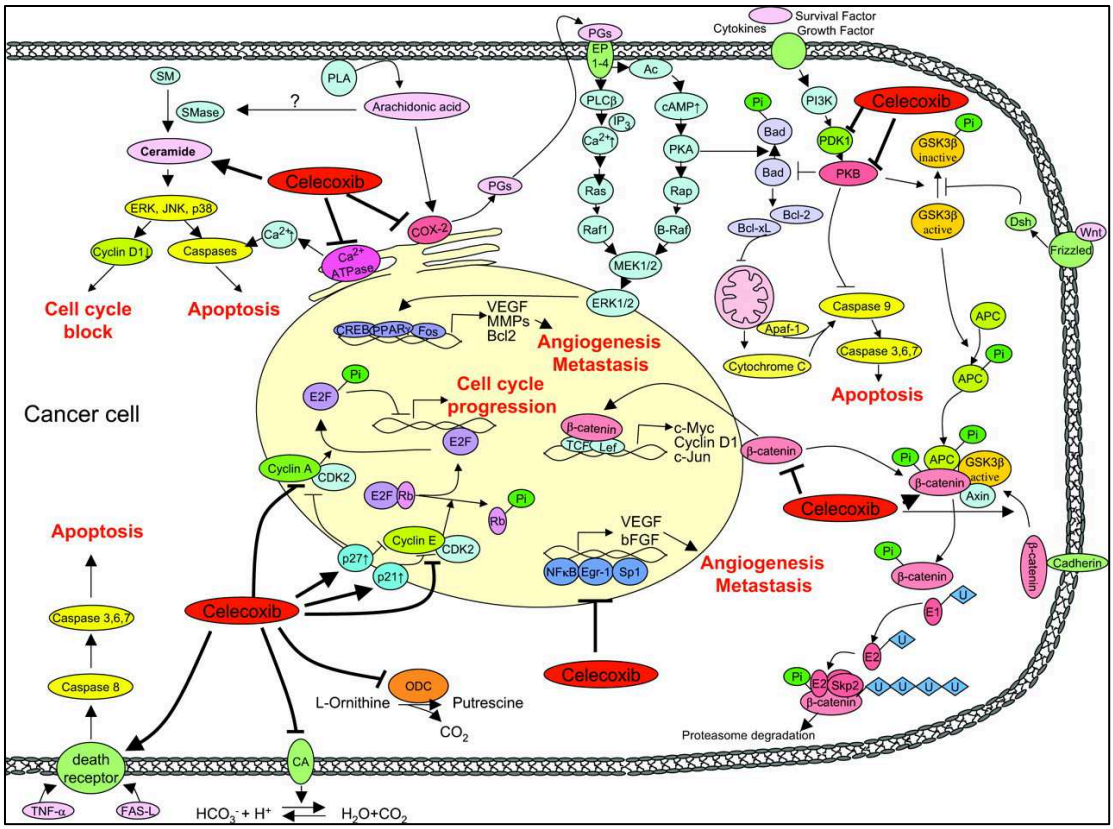

Abb. 1: Zusammenfassung COX-2-abhängiger und -unabhängiger Wirkungsmechanismen von Celecoxib; aus [40].

In genetischen Analysen konnten nicht weniger als 27 Gene identifiziert werden, die über COX-2 und Celecoxib synchron reguliert werden [41].

Im Allgemeinen kann die Wirkung von Celecoxib auf Tumorzellen, vor allem in kombinierten Therapieansätzen in der Onkologie, noch nicht als vollständig aufgeklärt angesehen werden. Vielmehr scheint eine individuelle Analyse abhängig von der Tumorzellart mittels molekularbiologischer Methoden unerlässlich zu sein.

1.2.2 EGF-Rezeptor und Cetuximab

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) ist ein transmembraner Tyrosinkinase-Rezeptor der ErbB-Familie. Dabei wird der

EGF-Rezeptor auch ErbB-1 oder HER1 genannt. Die weiteren Mitglieder der ErbB-Familie tragen die Bezeichnungen ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3 (HER3) und ErbB-4 (HER4). Alle Rezeptoren dieser Familie sind an der Zellmembran lokalisiert und besitzen ein extrazelluläre Domäne, einen transmembranen Teil und eine intrazelluläre Proteinkinase-Domäne. Die Bindung eines Liganden (z. B. eines Wachstumsfaktors wie den epidermalen Wachstumsfaktor EGF oder den transformierenden Wachstumsfaktor TGF-α) an die extrazelluläre Domäne führt zu einer Änderung der räumlichen Struktur derselben, welche eine Dimerisierung zu Homo- oder Heterodimeren ermöglicht. Auf diese Weise wird der Rezeptor aktiviert. Dies führt wiederum zur Autophosphorylierung der Tyrosinkinase, in deren Folge diverse intrazelluläre Moleküle gebunden und phosphoryliert werden, was zur Aktivierung verschiedener molekularer Signalkaskaden im Zellinneren führen kann. [42-44]. Es sind bislang drei onkologisch bedeutende Signalwege bekannt, die in der Abbildung 2 [45] schematisch zusammengefasst sind.

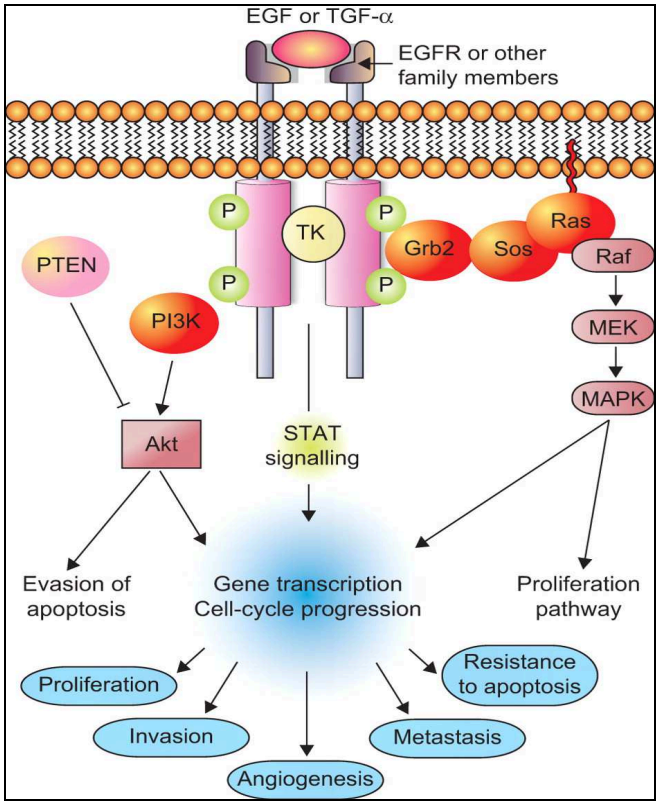

Abb. 2: Zusammenfassung der wichtigsten durch Aktivierung des EGF-Rezeptors ausgelösten Signalwege und ihr Einfluss auf die Zelle; aus [45].

Im ersten Signalweg führt die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase über die Proteine Ras und Raf zur Aktivierung mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) [46,47]. In einem zweiten Weg können Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) zur Aktivierung der Proteinkinase B (auch Akt) führen [48-50]. Eine dritte Möglichkeit besteht in der Auslösung von Transkriptionsprozessen über sogenannte STAT-Proteine (signal transducers and activators of transcription) [43]. Alle diese Signalwege modulieren über verschiedene Mechanismen das Zellwachstum und -überleben, die Reaktion der Zelle auf äußere Einflüsse sowie die Zellteilung, -bewegung und -transformation [42-44,46-50]. Die Erkenntnisse über den Einfluss dieser Signalwege und die Tatsache, dass sehr viele maligne Tumorzellen eine Überexpression des EGF-Rezeptors aufweisen, machen diesen Rezeptor als molekuares Target in der Onkologie schon seit langer Zeit interessant [51,52].

Cetuximab (Erbitux®, C225) ist ein bereits in den 80iger Jahren entwickelter, chimärer, monoklonaler Antikörper, der selektiv an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors bindet und diesen dadurch blockiert [52-55]. Als Folge werden die Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase und die Auslösung der entsprechenden Signalkaskaden verhindert und damit für die Tumorzelle wesentliche Überlebens- und Wachstumssignale inhibiert [56,57]. Zudem ist die Affinität dieses Antikörpers zur Ligandenbindungsstelle des EGF-Rezeptors größer als die der endogenen Liganden wie EGF oder TGF-α (transforming growth factor alpha) [52,58]. Damit kann Cetuximab den EGF-Rezeptor sehr effektiv inaktivieren und wurde daher schon vielfach als Medikament für molekulare Therapieansätze in der Onkologie sowohl präklinisch als auch klinisch untersucht [59-65]. Mittlerweile ist Cetuximab für bestimmte Tumorentitäten in der onkologischen Behandlung von Patienten klinisch zugelassen, und zwar sowohl als Monotherapie als auch in der Kombination mit Strahlen- und Chemotherapie [57]. Dies betrifft z. B. metastasierte, EGFR-positive kolorektale Karzinome [66] und metastasierte bzw. lokal und regional fortgeschrittene Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches [57]. Dennoch ist das klinische Potential dieses monoklonalen Antikörpers vor allem in Hinblick auf mögliche Kombinationstherapien sicher noch nicht ausgeschöpft. Zudem konnte in kleineren Studien belegt werden, dass Cetuximab auch bei Tumoren erfolgreich eingesetzt werden kann, die den EGF-Rezeptor nicht überexprimieren [67,68].

Insofern sind auch präklinisch noch eine Reihe von ungeklärten Fragen zu den Wirkungsmechanismen von Cetuximab auf Tumorzellen zu beantworten.

1.3 Direktive für eine Kombination von Celecoxib und Cetuximab

Mit dem EGF-Rezeptor und COX-2 sind bislang zwei sehr vielversprechende Zielmoleküle für die Onkologie identifiziert. Mit den Medikamenten Cetuximab und Celecoxib sind zwei präklinisch und klinisch sehr gut untersuchte Substanzen etabliert, die eine hocheffektive Hemmung dieser Zielproteine ermöglichen. Zahlreiche experimentelle Untersuchungen befassten sich bisher mit den möglichen Wirkungsmechanismen und Einflüssen dieser Wirkstoffe sowohl auf die Zielproteine selbst, als auch auf andere, in der Onkologie wichtige intrazelluläre Signalwege. Dennoch erlaubt die Komplexität der Wechselwirkungsmechanismen auf Proteinebene in der Zelle bisher keine vollständige Aufklärung aller beteiligten Prozesse und ihrer allgemeingültigen Bedeutung für die Onkologie, und zwar weder für die Inaktivierung des EGF-Rezeptors, noch für die Hemmung der COX-2.
Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich die vermuteten Signalwege beider Proteine an einigen Punkten überschneiden und sich damit COX-2 und EGF-Rezeptor gegenseitig beeinflussen [69-72]. So führt z. B. die Aktivierung des EGF-Rezeptors zu einer erhöhten MAP-Kinase-Aktivität und damit zur Induktion der Transkription von COX-2 [71]. Weiterhin beeinflusst das durch COX-2 synthetisierte PGE_2 offensichtlich den EGF-Rezeptor. So gibt es Hinweise darauf, dass die Stimulation der Zellproliferation durch PGE_2 über eine Aktivierung der EGFR-Signalwege stattfindet [73,74]. Damit könnte eine gleichzeitige Inhibierung sowohl des EGF-Rezeptors als auch der COX-2 durchaus zu additiven Effekten hinsichtlich der Proliferation von Tumorzellen führen und eine gegenseitige Verstärkung von EGF-Rezeptor und COX-2 durchbrechen [71]. Andererseits sind auch Untersuchungen publiziert, die eine Verminderung der Expression des EGF-Rezeptors durch COX-2 und damit eine Resistenz für COX-2-überexprimierende Tumorzellen gegen EGFR-Inhibitoren zeigen [75]. Auch dies ließe den Schluss zu, dass bei einer kombinierten

Hemmung beider Zielmoleküle eine additive Wirkung zu erwarten wäre. Dennoch gibt es bislang nur wenige publizierte Daten, die onkologisch relevante Endpunkte bei der kombinierten Anwendung von EGFR-Inhibitoren und COX-2-Hemmern untersuchen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich deshalb mit der kombinierten Wirkung der Substanzen Celecoxib und Cetuximab, sowie einer Bestrahlung auf Tumorzellen. Dazu wurden die Bronchialkarzinom-Zelllinie A549 und die Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu *in vitro* auf eine mögliche Radiosensibilisierung durch diese Wirkstoffe und deren Kombination untersucht. Beide Zelllinien repräsentieren *in vivo* Tumorerkrankungen, die bislang mit mäßigen Therapieoptionen und einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten assoziiert sind. Mit einem positiven Befund hinsichtlich eines additiven oder synergistischen Effektes in Bezug auf die Strahlensensibilität könnten sich Hinweise auf neue Therapieoptionen in der Radioonkologie ergeben.

1.4 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit folgenden Fragestellungen:

1.) Beeinflussen die Wirkstoffe Celecoxib oder Cetuximab das Wachstum der zu untersuchenden Tumorzelllinien A549 und FaDu?

2.) Wird die Strahlensensibilität der Tumorzellen durch die Behandlung mit Celecoxib oder Cetuximab verändert?

3.) Haben die Substanzen Celecoxib oder Cetuximab Auswirkungen auf die Zellzyklusverteilung der Tumorzelllinien nach einer Bestrahlung?

4.) Wird die Kapazität der Tumorzellen zur Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Wirkstoffe Celecoxib oder Cetuximab beeinflusst?

5.) Treten bei einer kombinierten Anwendung beider Wirkstoffe synergistische Effekte auf?

Die Bearbeitung dieser Fragestellungen erfolgte mit verschiedenen experimentellen Methoden im strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock.

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die beiden Tumor-Zelllinien A549 und FaDu verwendet. Beides sind in Kultur adhärent wachsende Karzinomzellen. Die Zelllinie A549 wurde aus einem nicht kleinzelligen Adenokarzinom der Lunge, die FaDu-Zellen aus einem Plattenepithekarzinom des Hypopharynx isoliert. Beide Zelllinien stammen ursprünglich von der amerikanischen Zellbank ATCC (American Type Culture Collection). Sie sind im strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock seit 2005 etabliert und kryokonserviert verfügbar.

2.2 Wirkstoffe

Celecoxib wurde in Pulverform von der Firma Pfizer Deutschland GmbH (Berlin) bezogen. Das Molekulargewicht beträgt 381,38 g/mol. Zur Herstellung einer Stammlösung (STL) mit 20 mM wurden zunächst 7,63 mg des Pulvers in 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Von dieser STL wurden Aliquote von jeweils 1ml bei -20°C eingelagert. Unmittelbar vor der Wirkstoffzugabe wurden diese Aliquote aufgetaut und im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Diese Verdünnungslösung (VL) konnte in entsprechender Menge direkt in das Zellkulturmedium gegeben werden. Die Kontrollgruppen ohne Wirkstoff wurden grundsätzlich mit einer analogen DMSO-Konzentration versehen, um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Celecoxib-Konzentrationen sowie die analogen DMSO-Konzentrationen.

Tab. 1: Verwendete Konzentrationen des Wirkstoffs Celecoxib

Konzentration in µM	Zugabe VL in µl pro 10ml Zellkulturmedium	analoge DMSO-Konzentration in %
10	50	0,05
30	150	0,15
50	250	0,25
70	350	0,35
100	500	0,5

Cetuximab (Erbitux®) wurde als Infusionslösung vom Hersteller Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. Die Konzentration der Infusionslösung betrug 5 mg/ml (Lösungsmittel Wasser) bei einem Molekulargewicht von 145,78 kg/mol. Damit ergab sich eine Stammlösung von 34,3 µM (STL). Vor der Wirkstoffzugabe wurde diese Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt (VL). Die auf diese Weise in den Zellkulturen applizierten Konzentrationen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Verwendete Konzentrationen des Wirkstoffs Cetuximab

Konzentration in nM	Zugabe VL in µl pro 1ml Zellkulturmedium
30	8,8
60	17,5
120	35

2.3 Experimentelle Methoden

2.3.1. Untersuchung des Zellwachstums mittels Wachstumskurven

Zunächst wurden mit beiden Zelllinien Wachstumskurven mit und ohne Wirkstoff erstellt. Dazu wurde eine definierte Zellzahl (10^3 Zellen/cm^2) entweder in

T_{25}-Zellkulturflaschen (25 cm²) oder 24er Wellplatten (1,9 cm²) eingesät. Die Wirkstoffzugabe erfolgte nach 24 Stunden. Nach jeweils weiteren 24 Stunden erfolgte über einen Zeitraum von insgesamt bis zu 8 Tagen die tägliche Bestimmung der Zellzahl. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült, dann abtrypsiniert, die so erhaltene Zellsuspension zusammen mit dem Überstand und der Spüllösung zentrifugiert und anschließend das entstandene Pellet in Kulturmedium resuspendiert. Die eigentliche Zellzählung wurde manuell mittels Neubauer-Zählkammer oder automatisch mittels Coulter-Counter durchgeführt. Die Neubauer Zählkammer hatte dabei den Vorteil, dass sie bei Färbung der Zellen mit Trypanblau eine Aussage über den Anteil toter und morphologisch veränderter Zellen zuließ. Der Vorteil des Coulter-Counter lag in der deutlich schnelleren und genaueren Zellzahlbestimmung.
Die getesteten Wirkstoffkonzentrationen für die Wachstumsuntersuchungen lagen beim Wirkstoff Celecoxib bei 0 (Kontrolle), 10, 30, 50, 70 und 100 µM; beim Wirkstoff Cetuximab bei 0 (Kontrolle), 30, 60 und 120 nM. Die wirkstofffreien Kontrollen erhielten bei den Versuchen mit Celecoxib eine entsprechende Menge DMSO (Tabelle 1). In Vorversuchen wurde der Einfluss verschiedener DMSO-Konzentrationen bis zu 1% auf das Wachstum beider Zelllinien untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die getesteten DMSO-Konzentrationen keinen Einfluss auf das Zellwachstum hatten.

2.3.2 Bestrahlung der Zellkulturen

Für die Bestrahlung der Zellkulturen mit unterschiedlichen Strahlendosen musste ein Bestrahlungs-Setup entwickelt werden, welches zum einen hinsichtlich der physikalischen Parameter der strahlentherapeutischen Behandlung von Patienten nahekommt und zum anderen aber auch so universell und normiert abgearbeitet werden kann, dass es reproduzierbare Ergebnisse in den Zellexperimenten hervorbringt.
Um dem ersten Anliegen gerecht zu werden, wurden die Bestrahlungen an einem klinischen Linearbeschleuniger des Typs Siemens ONCOR (Siemens AG, Erlangen)

mit einer nominellen Photonenenergie von 6 MV und einer Dosisleistung von 3,7 Gy/min durchgeführt. Dies entspricht in etwa den Parametern einer standardisierten Behandlung eines soliden Tumors in der Strahlentherapie.

Für das zweite Kriterium war eine ausgiebige dosimetrische Charakterisierung des Strahlenfeldes notwendig. Dazu wurden zunächst bei der maximal einstellbaren Feldgröße von 40 x 40 cm² Dosisquerprofile in einem Wasserphantom MP3 der PTW Freiburg GmbH in der Tiefe des Dosismaximums gemessen. Aus diesen Messungen (Abbildung 3) ergab sich ein ringförmiges Areal, in dem von einer homogen verteilten Dosis ausgegangen werden konnte, so dass die Dosisabweichungen zum Normierungspunkt kleiner als 3 % waren. Der Normierungspunkt, der gleichzeitig der Messpunkt für die Absolutdosimetrie war, wurde in 10 cm Abstand vom Mittelpunkt des zur Bestrahlung verwendeten Ringareals festgelegt. In der Abbildung 3 entspricht dies den X/Y-Koordinaten +/- 100 mm bei einer relativen Dosis von 100 %.

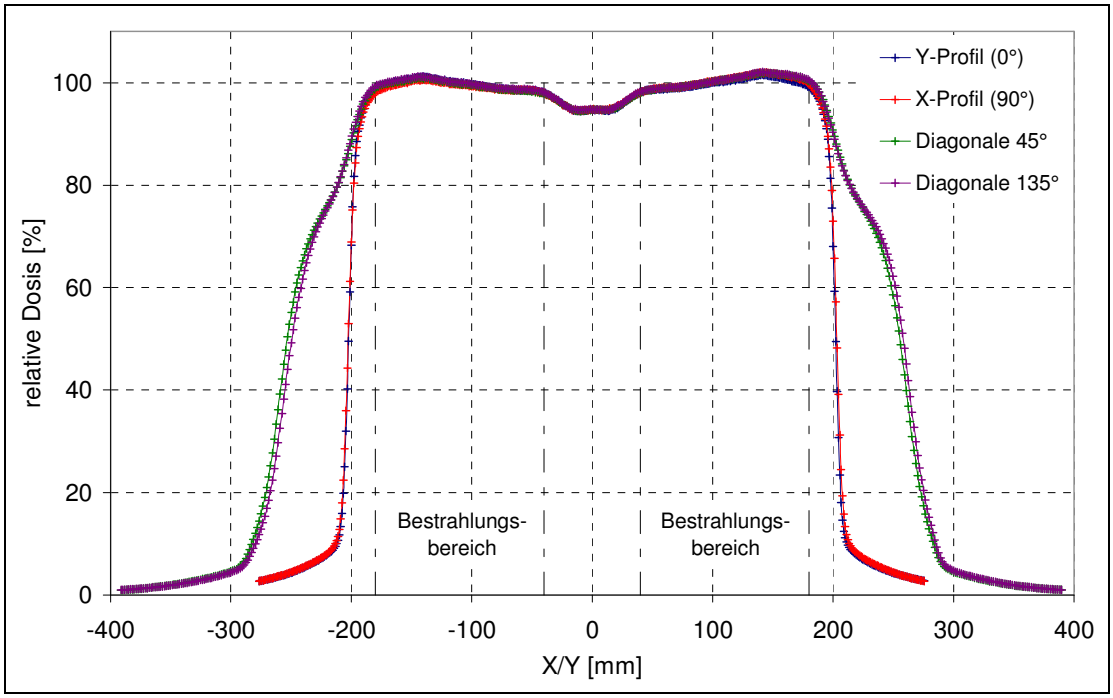

Abb. 3: Gemessene Dosisquerprofile für 6 MV Photonen in der Tiefe des Dosismaximums bei einer Feldgröße von 40 x 40 cm² und einem Oberflächenabstand von 100 cm.

Die auf diese Weise ermittelte Ringfläche wurde auf einer Plexiglasplatte markiert, auf der die zu bestrahlenden Proben in Zellkulturflaschen oder Petrischalen sehr einfach positioniert werden konnten. Die Plexiglasplatte wurde wiederum am Patientenlagerungstisch fixiert und anhand des im Bestrahlungsraum vorhandenen Laser-Visiers exakt isozentrisch ausgerichtet. Die Gantry des Beschleunigers wurde auf 180° eingestellt, so dass die Photonenstrahlung von unten durch den Patientenlagerungstisch und die Plexiglasplatte auf die Proben traf (Abbildung 4).

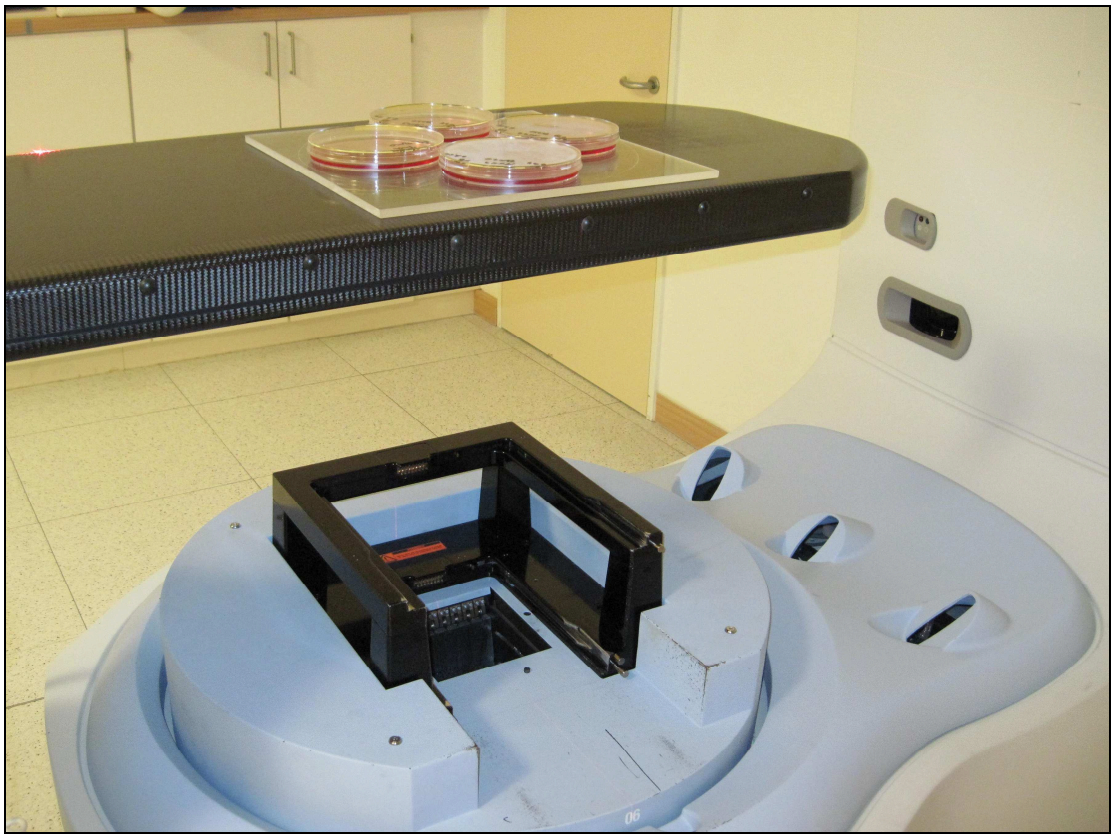

Abb. 4: Bestrahlungssetup für Zellkulturen am klinischen Linearbeschleuniger Siemens ONCOR.

Die Dicke der Plexiglasplatte wurde mit 8 mm so bemessen, dass Tisch, Plexiglasplatte und Boden des Zellkulturgefäßes zusammen ein Aufbaumaterial darstellten, welches radiologisch einer 14 mm dicken Wasserschicht entsprach. Da dies gerade der Lage des Maximums der Tiefendosiskurve in Wasser für die

verwendete Photonenstrahlung entsprach (Abbildung 5), konnte davon ausgegangen werden, dass sich die zu bestrahlenden Zellen exakt im Maximum der Tiefendosiskurve befanden. Damit spielten die leicht unterschiedlichen Bodendicken der verwendeten Zellkulturgefäße eine untergeordnete Rolle.

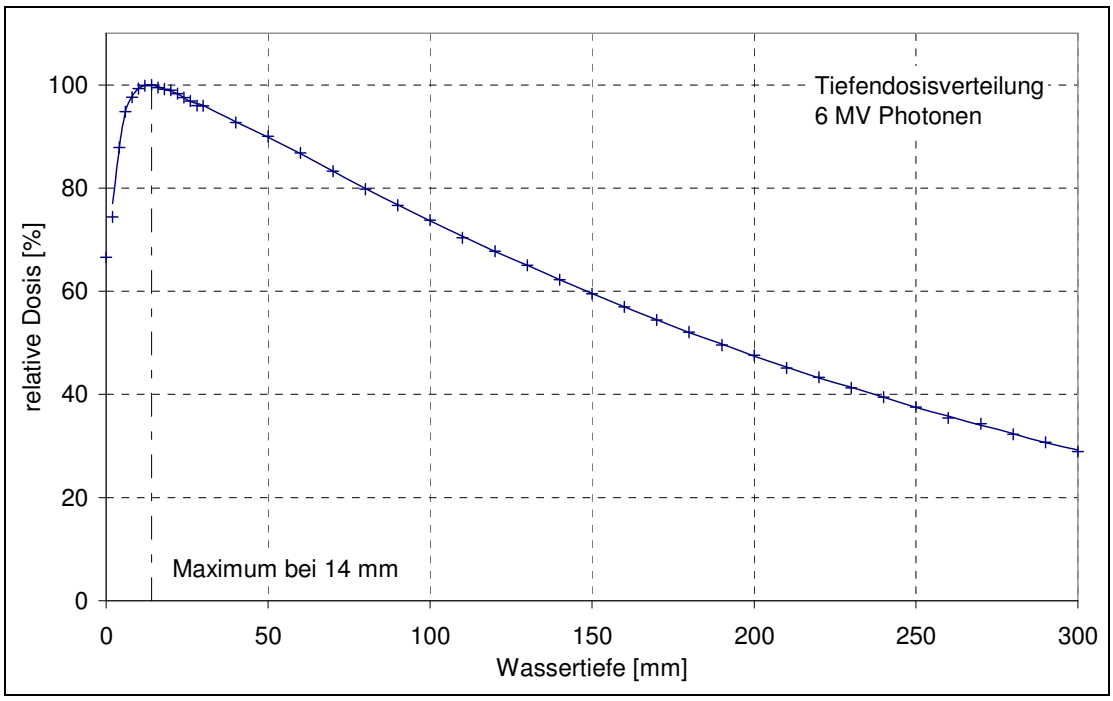

Abb. 5: Gemessene Tiefendosisverteilung für 6 MV Photonen bei einer Feldgröße von 40 x 40 cm² und einem Oberflächenabstand von 100 cm.

Die Absolutdosimetrie erfolgte mit einer absolut kalibrierten Ionisations-Flachkammer (PTW Advanced Markus, Typ 34045) direkt auf der Oberfläche der Plexiglasplatte an verschiedenen Positionen der markierten Ringfläche.

Auf diese Weise wurde ein universelles Bestrahlungs-Setup für Zellkulturen etabliert, welches für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche verwendet wurde.

2.3.3 Untersuchungen zum klonogenen Überleben mittels Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest stellt eine Art Goldstandard zur quantitativen Bestimmung des reproduktiven Zellüberlebens dar. Dafür werden die Zellen in so geringer Konzentration in Kultur genommen, dass von adhärent wachsenden Einzelzellen ausgegangen werden kann. Nach einer gewissen Zeit werden die gebildeten Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt. Ihre Anzahl im Verhältnis zur Einsaatzellzahl ergibt die Plattiereffizienz (plating efficiency, PE), die den Anteil der eingesäten Zellen beschreibt, der mindestens 5 Zellzyklen durchlaufen hat und damit sicher proliferiert. Wird die PE nun z. B. bei verschiedenen Bestrahlungsdosen bestimmt und auf die unbestrahlte Kontrolle normiert, so ergeben sich die Überlebensfraktionen, die über der Dosis aufgetragen die Überlebenskurven bilden.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden für den Koloniebildungstest verwendet. Die erste Methode wurde mit Celecoxib angewandt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und mit bzw. für die Kontrolle ohne Wirkstoff über 48 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Abtrypsinierung und Neueinsaat ohne Wirkstoff in Petrischalen (9,1 cm²). Die Einsaatdichte wurde dabei anhand mehrerer Vorversuche so gewählt, dass die Anzahl der gebildeten Kolonien für alle Bestrahlungsdosen in der gleichen Größenordnung lag. Nach 7 Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 14 Tagen wurde das Medium verworfen, die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 70%igem Alkohol zehn Minuten fixiert. Nach der Entfernung des Alkohols wurden die fixierten Zellen mit Kristallviolettlösung fünf Minuten lang gefärbt. Die Kolonien mit mehr als 50 Zellen wurden dann am Lichtmikroskop gezählt. Die getesteten Celecoxib-Konzentrationen betrugen 0 (Kontrolle), 10, 30 und 50 µM. Die wirkstofffreien Kontrollen wurden auch hier mit den analogen DMSO-Konzentrationen (Tabelle 1) versehen. Die applizierten Bestrahlungsdosen waren 0 (scheinbestrahlte Kontrolle), 2, 4, 6 und 8 Gy.

Bei der zweiten Methode, die sowohl mit Celecoxib als auch mit Cetuximab angewendet wurde, war die Einsaatdichte für alle Bestrahlungsdosen gleich (350, 500, 700 bzw. 1000 Zellen). Die Einsaat erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm². Bei den Versuchen mit Celecoxib wurde der

Wirkstoff nach 24 Stunden zugegeben, die Bestrahlung erfolgte 24, 48 oder 72 Stunden nach der Einsaat. Bei den Untersuchungen mit Cetuximab wurde der Wirkstoff 24 Stunden nach der Einsaat zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation erfolgte die Bestrahlung. Bei der Testung der Kombination von Celecoxib und Cetuximab wurde wie bei den Experimenten mit Cetuximab allein verfahren. Anschließend wurden bei beiden Wirkstoffen die Zellen ohne Mediumwechsel 10 Tage weiter inkubiert. Danach erfolgte die Fixierung, Färbung und Auszählung der Kolonien analog der ersten Methode. Die getesteten Celecoxib-Konzentrationen betrugen 0 (Kontrolle), 10, 30 µM. Die wirkstofffreien Kontrollen wurden auch hier mit den analogen DMSO-Konzentrationen (Tabelle 1) versehen. Cetuximab wurde in Konzentrationen von 0 (Kontrolle) und 60 nM eingesetzt. Die applizierten Bestrahlungsdosen betrugen 0 (scheinbestrahlte Kontrolle), 2, 4 und 6 Gy.

Die Bestrahlung erfolgte bei allen Versuchen nach der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Methode. Die unbestrahlten Kontrollen wurden scheinbestrahlt, d. h. sie wurden ebenfalls zum Bestrahlungsgerät transportiert und befanden sich damit genauso lange außerhalb des Brutschranks wie die bestrahlten Proben. Dadurch konnte von einer exakt gleichen Behandlung der Kontrollen ausgegangen werden.

An die experimentell bestimmten Werte für das klonogene Überleben bei verschiedenen Bestrahlungsdosen wurden mit dem Programm Origin™ Überlebenskurven nach dem Linear-Quadratischen-Modell (LQ-Modell) angefittet. Dieses seit Jahrzehnten etablierte und weit verbreitete theoretische Modell zur Vorhersage des klonogenen Überlebens nach Bestrahlung [76-78] erlaubt die Charakterisierung der Strahlenempfindlichkeit von Zellen mit nur zwei Parametern, die sich mechanistisch interpretieren lassen [79].

Die Formel für das LQ-Modell lautet wie folgt:

$$\ln(S / S_0) = -(\alpha d + \beta d^2)$$

Dabei ist S/S_0 die Überlebensfraktion und d die verabreichte Einzeldosis in Gy. α und β sind die unbekannten Parameter, welche mittels Fit an die experimentellen Daten bestimmt wurden.

2.3.4 Untersuchungen zum Reparaturverhalten von DNA-Doppelstrangbrüchen

Zur Untersuchung der Reparaturkapazität für Doppelstrangbrüche der DNA (DSB) wurden diese Strahlenschäden zu definierten Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit Hilfe der γH2AX-Methode angefärbt und somit fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht.

Dazu wurden jeweils 10^4 zu untersuchende Zellen mit 1 ml Medium je Kammer in 4-Kammer-Objekträger eingesät und vier Tage im Brutschrank inkubiert. Am vierten Tag erfolgte die Zugabe der Wirkstoffe. Celecoxib wurde mit einer Konzentration von 0 (Kontrolle) bzw. 30 µM und Cetuximab mit einer Konzentration von 0 (Kontrolle) bzw. 60 nM eingesetzt. Dabei wurden wiederum alle wirkstofffreien Kontrollen analog Tabelle 1 mit 0,15 % DMSO versehen, um die Vergleichbarkeit mit den mit Celecoxib behandelten Zellen zu gewährleisten.

Eine Stunde nach der Wirkstoffzugabe erfolgte die Bestrahlung der Proben mit einer Einzeldosis von 0 (Kontrolle) bzw. 4 Gy nach der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Methode. Die Kontrollen wurden wiederum scheinbestrahlt.

Nach definierten Zeitpunkten wurden die Zellen nach Abtrennung der Flaschenränder von den Objektträgern fixiert. Zur Beurteilung der Reparaturdynamik wurden die Zeitpunkte 2 Stunden und 24 Stunden nach Bestrahlung gewählt. Die Fixierung erfolgte in einer Formaldehydlösung (2 % in PBS) für 15 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS gespült. Daraufhin wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-100 und 1 % BSA in PBS fünf Minuten auf Eis permeabilisiert und anschließend in 1 % BSA in PBS unter leichtem Schütteln gewaschen. Danach erfolgte die Blockierung mit 3 % BSA in PBS für eine Stunde.

Nun wurde der erste Antikörper (γH2AX mono; 1:100) mit jeweils 50 µl auf jeden Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden mit Plastikdeckgläsern versehen und so für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. In dieser Zeit konnte der Antikörper an die phosphorylierten Serin-Reste von H2AX, welche bei DSB auftreten, binden. Danach wurden die Plastikdeckgläser entfernt und die Objektträger dreimal für jeweils 10 Minuten in einer Lösung aus 0,5 % Tween20 und 1 % BSA in PBS unter leichtem Schütteln gewaschen.

Daraufhin wurde der zweite Antikörper (Alexa mono; 1:400) ebenfalls mit jeweils 50 µl auf jeden Objektträger gegeben. Dieser bindet spezifisch an den vorher eingesetzten γH2AX-Antikörper und sorgt auf diese Weise für die Sichtbarmachung der DSB. Anschließend erfolgte die sofortige Zugabe von 20 µl DAPI-Arbeitslösung (1 µg/ml) zur Färbung der Zellkerne. Wiederum wurden die Objektträger mit Plastikdeckgläsern versehen und für eine Stunde in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Plastikdeckgläser entfernt und die Objektträger dreimal in einer Spüllösung aus 0,5 % Tween20 in PBS für jeweils 15 Minuten gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger mit einem Eindeckmedium versehen, mit Glasdeckgläsern abgedeckt und dann im Trockenblock getrocknet. Die Ränder der Objektträger wurden mit Nagellack versiegelt, um die Auswertung am Fluoreszensmikroskop möglichst dauerhaft zu ermöglichen. Dazu wurden die Objektträger im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Nichtsdestotrotz erfolgte die Auszählung der gefärbten DSB baldmöglichst in einem Zeitraum von wenigen Tagen. Dazu wurden die Farbstoffe im Fluoreszensmikroskop mit einer Quecksilberdampflampe breitbandig angeregt, um sowohl die DSB in rot als auch die Zellkerne in blau darzustellen. Die Auszählung erfolgte für mindestens 50 nicht morphologisch veränderte Zellkerne je Probe. Daraus wurde dann die mittlere Anzahl von residualen DSB pro Zelle bzw. Zellkern errechnet.

2.3.5 Analyse des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse des Zellzyklus wurden die Anteile der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen anhand ihres DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt.

Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen in T_{75}-Zellkulturflaschen ausgesät und mindestens einen Tag mit 10 ml Medium inkubiert. Zu einem definierten Zeitpunkt erfolgte die Zugabe der Wirkstoffe. Celecoxib wurde in einer Konzentration von 0 (Kontrolle) und 30 µM und Cetuximab in einer Konzentration von 0 (Kontrolle) und 60 nM zugegeben. Die wirkstofffreien Kontrollansätze erhielten auch hier 0,15 % DMSO nach Tabelle 1.

Nach einer Stunde erfolgte die Bestrahlung der Zellkulturen mit einer Dosis von 4 Gy nach der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Methode. Die unbestrahlten Kontrollen wurden im Sinne einer Scheinbestrahlung exakt genauso behandelt, wie die bestrahlten Proben.

Anschließend wurden die Zellen zu definierten Zeitpunkten fixiert. Die Fixierung erfolgte unmittelbar (30 Minuten), 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach der Bestrahlung. Dazu wurden die Zellkulturen zweimal mit PBS gespült und dann abtrypsiniert. Diese Suspension wurde zusammen mit dem Mediumüberstand und der PBS-Lösung vom Spülen bei 250×g und 4 °C 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde vorsichtig in PBS resuspendiert und vereinzelt. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen erneut bei 250×g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 100 µl PBS resuspendiert und die erhaltene Suspension langsam in -20 °C kalten 70%igen Alkohol getropft. Die so fixierten Proben wurden mindestens einen Tag bei -20 °C gelagert.

Im Anschluss erfolgte die Behandlung der fixierten Zellen mit RNase. Dazu wurden die fixierten Zellen bei 300×g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, das Pellet HBS (HEPES-buffered saline) gewaschen und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 1 ml auf 37 °C vorgewärmter RNase resuspendiert und diese Suspension mindestens 15 Minuten im 37 °C warmen

Wasserbad inkubiert. Dann wurden die Zellen wiederum zentrifugiert, mit HBS gewaschen und nochmals zentrifugiert.
Die Färbung der DNA der Zellen erfolgte mit einer Propidiumiodid-Lösung mit 100 µg/ml. Dazu wurde das Zellpellet in 250 µl der Lösung resuspendiert und für einen Zeitraum von etwa 8 bis12 Stunden bei 4 °C gelagert.
Die eigentliche Zellzyklusanalyse erfolgte maximal 48 Stunden nach der Färbung am Durchflusszytometer bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 575 bis 620 nm. Dabei wurden Histogramme der Zellzahl in Abhängigkeit vom DNA-Gehalt der Zellen erstellt und diese mittels Fitanalyse hinsichtlich der Verteilung der Zellen in G0/G1-Phase, S-Phase und G2/M-Phase ausgewertet.

2.4 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

Alle Versuche erfolgten unter sterilen Bedingungen und wurden unter einer Sicherheitswerkbank des Herstellers Zapf Instruments (Sarstedt) durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in Brutschränken der Hersteller Zapf Instruments (Sarstedt) und Varolab GmbH (Giessen) inkubiert. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte sowohl mit einem Zellzählgerät Coulter-Counter Z2 der Firma Beckmann Coulter GmbH (Krefeld) als auch lichtmikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer. Für die Langzeitlagerung der Zellen stand eine Tiefkühltruhe Ultra Flow der Firma Sanyo (Japan) sowie ein Flüssigstickstoffbehälter Arpege70 der Air Liquide GmbH (Düsseldorf) zur Verfügung. Für die Licht- und Fluoreszensmikroskopie wurde ein Mikroskop Eclipse TE300 sowie entsprechende Objektive des Herstellers Nikon (Düsseldorf) verwendet. Die Zellzyklusanalysen wurden an einem Durchflusszytometer Cytomics FC500 des Herstellers Beckmann-Coulter GmbH (Krefeld) durchgeführt. Des Weiteren kamen eine Zentrifuge Universal 16 R der Firma Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen), ein Wasserbad der GFL mbH (Burgwedel), diverse Durchmischungsgeräte der H+P Labortechnik GmbH (München) und der Edmund Böhler GmbH (Hechingen), ein pH-Meter CG841 der

Schott AG (Mainz) sowie Feinstwaagen der Sartorius AG (Göttingen) zum Einsatz. Die Sterilisation der unsteril gelieferten Verbrauchsmaterialien und Behältnisse erfolgte mit einem Dampfsterilisator des Typs Tuttnauer Autoclave 2540EL. Aqua dest wurde mit einer Reinstwasseranlage der SG-Wasseraufbereitung und Regenerierung GmbH (Hamburg-Barsbüttel) in Verbindung mit Deionisationskartuschen der gleichen Firma hergestellt. Pipettiert wurde mit Pipettierhilfen der Firma Eppendorf (Hamburg).
Die genutzten Verbrauchsmaterialien und ihre Herkunft sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	**Hersteller/Lieferant**
Falconröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen T_{25} und T_{75}	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Multiwellplatten 24 Loch	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz oder Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Spitzen Ultra Tipp®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipetten Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
12 mm Deckgläser (Stärke 1.0)	Carl Roth® GmbH+CoKG, Karlsruhe
4-Kammer-Objektträger	LabTek, Rochester, NY
Plastik-Deckgläser Thermanox® 22 mm x 60 mm	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Glas-Deckgläser 24 mm x 60 mm	Menzel GmbH Braunschweig
Trockenblock	Whatmann GmbH, Dassel
Plastikröhrchen	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Kryoröhrchen Nalgene®	VWR International GmbH, Darmstadt

Für die Auswertung der Messdaten und die Erstellung der Diagramme wurden Microsoft® Excel 2003 und Microcal™ Origin™ 5.0 verwendet. Die Fitanalysen zur Durchflusszytometrie wurden mit dem Programm Multicycle for Windows der Firma Phoenix Flow Systems (San Diego, CA) durchgeführt.

2.5 Chemikalien

In Tabelle 4 sind alle für die Zellkulturexperimente verwendeten Chemikalien sowie ihre Herkunft zusammengefasst.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
Zellkulturmedium DMEM	Biochrom AG, Berlin
Kälberserum FBS Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Natriumpyruvat	Biochrom AG, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Biochrom AG, Berlin
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypsin/EDTA 0,05% und 0,25%	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypanblau 0,5%	Biochrom AG, Berlin
Kristallviolett-Lösung ;1%	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Isoton-Lösung	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 70%	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
5fach PBS:	
NaCL	AppliChem, Darmstadt
KH_2PO_4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KCL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd 37%	Merck KGaA, Darmstadt
BSA 1% (Albumin bovine Fraction V; pH 7,0; standard grade; lyophil.)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween20 0,5%	Biorad Laboratories GmbH, München
Triton X-100 0,2% (T-9284)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Fortsetzung Tab. 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	**Hersteller/Lieferant**
Antikörper γ-H2AX monoclonal 1:100 (Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) clone JBW301; mouse monoclonal lgG1)	Upstate Cell signal solution (Millipore), Lake Placid, NY
Antikörper Alexa monoclonal 1:400 (Alexa Flour 594 goat anti-mouse lgG1	Molecular Probes (Invitrogen), Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich Co Ltd, Irvine, UK
Eindeckmedium	
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol	Carl Roth® GmbH+CoKG, Karlsruhe
TRIS-Puffer	Biorad Laboratories GmbH, München
RNase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3. Ergebnisse

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der durchgeführten Experimente als Mittelwert von N unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Fehlerbalken geben die einfache Standardabweichung an.

3.1 Wachstumskurven – Zunahme der Zellzahl

Zunächst sollte die Entwicklung der Population der Tumorzellen dargestellt werden. Für jeden Wirkstoff und jede Zelllinie wurden Wachstumskurven in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration über einen Zeitraum von 8 Tagen erstellt.
Die Abbildung 6 zeigt die Wachstumskurven für die Zellen der Zelllinie A549 nach Behandlung mit Celecoxib in unterschiedlichen Konzentrationen.

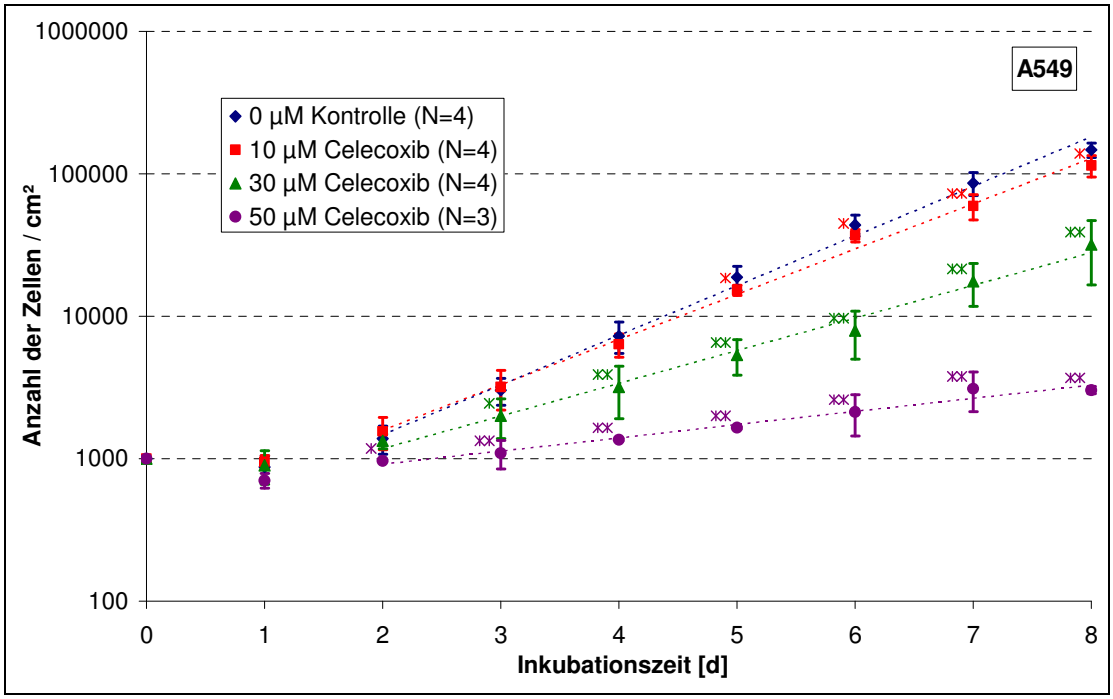

Abb. 6: Wachstumskurven der A549-Zellen unter Einfluss von Celecoxib (Zugabe am Tag 1). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Die Wachstumskurven für 10 µM und 30 µM resultieren aus vier, die Wachstumskurve für 50 µM aus drei unabhängigen Experimenten. Das Wachstum der Zellen unter Einfluss von 10 µM Celecoxib unterschied sich bis zum vierten Tag nicht signifikant von der Kontrolle, während ab dem fünften Tag eine signifikante Hemmung des Wachstums zu beobachten war. Für die Celecoxib-Konzentrationen 30 µM und 50 µM war eine deutlich langsamere Zunahme der Zellpopulation zu erkennen. Die Unterschiede zur Kontrolle waren für 30 µM Celecoxib ab dem dritten Tag signifikant ($p<0,05$), für die Konzentration 50 µM ab dem dritten Tag hoch signifikant ($p<0,001$). Die Populationsverdopplungszeiten wurden mittels linearer Regression vom zweiten bis zum achten Tag bestimmt und sind in Tabelle 5 dargestellt. Daraus ergab sich ein IC_{50}-Wert (Konzentration, bei der das Wachstum um 50 % gehemmt wird) von 38 µM.

Tab. 5: Populationsverdopplungszeiten unter Einfluss von Celecoxib für die Zelllinie A549

Celecoxibkonzentration in µM	Populationsverdopplungszeit t_{PD} in Stunden +/– Δt_{PD}
0 (Kontrolle)	21 +/– 1
10	23 +/– 1
30	32 +/– 2
50	78 +/– 6

In der Abbildung 7 sind die Wachstumskurven der Zelllinie FaDu nach Behandlung mit Celecoxib in unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt. Diese Wachstumskurven wurden aus den Daten von drei unabhängigen Experimenten erstellt. Die Werte für eine Celecoxib-Konzentration von 10 µM unterschieden sich ab dem sechsten Tag hoch signifikant ($p<0,001$) von der Kontrolle, während für die Konzentrationen 30 µM, 50 µM und 70 µM bereits ab dem dritten Tag, also 48 Stunden nach Zugabe, hoch signifikant ($p<0,001$) niedrigere Zellzahlen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurden. Bei 70 µM Celecoxib konnte kaum noch eine Zunahme der Zellzahl beobachtet werden. Ein Versuch mit 100 µM wurde ebenfalls durchgeführt, wobei jedoch ab dem zweiten Tag keine Zellen mehr gezählt werden konnten.

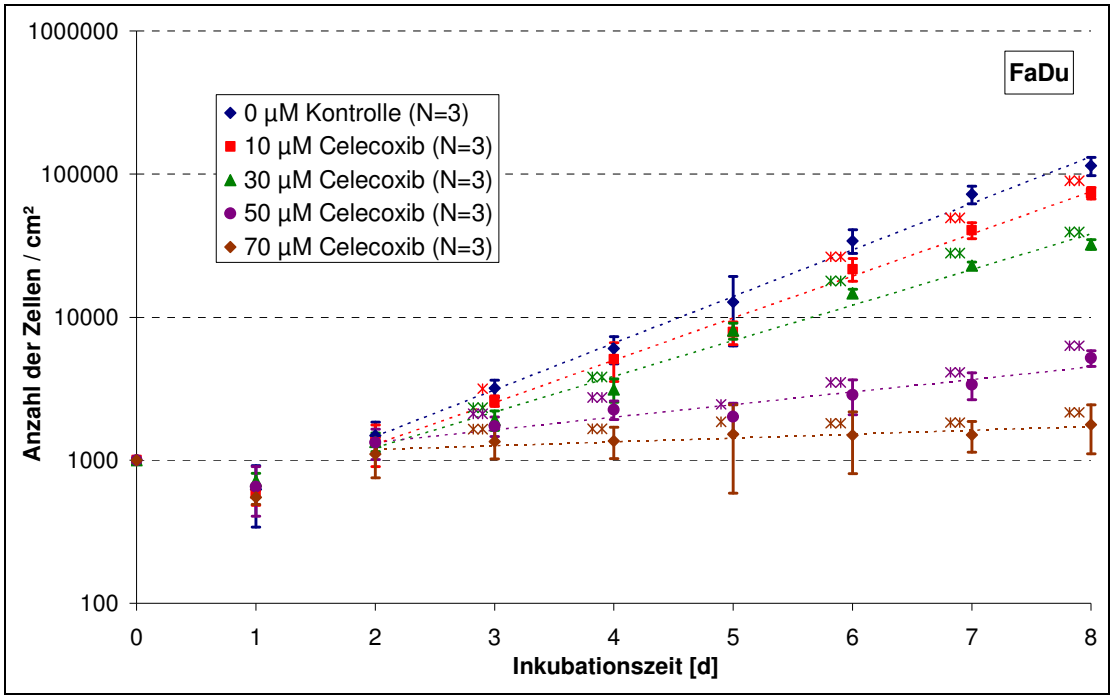

Abb. 7: Wachstumskurven der FaDu-Zellen unter Einfluss von Celecoxib (Zugabe am Tag 1). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Auch für die Zelllinie FaDu wurden vom zweiten bis zum achten Tag für die unterschiedlichen Celecoxib-Konzentrationen die Populationsverdopplungszeiten mittels linearer Regression bestimmt. Die entsprechenden Werte finden sich in Tabelle 6. Der IC_{50}-Wert wurde mit 40µM bestimmt.

Tab. 6: Populationsverdopplungszeiten unter Einfluss von Celecoxib für die Zelllinie FaDu

Celecoxibkonzentration in µM	Populationsverdopplungszeit t_{PD} in Stunden +/– Δt_{PD}
0 (Kontrolle)	22 +/– 1
10	25 +/– 1
30	29 +/– 2
50	82 +/– 10
70	268 +/– 53

Die Wachstumskurven der Zelllinie A549 nach Behandlung mit dem Wirkstoff Cetuximab in unterschiedlichen Konzentrationen zeigt die Abbildung 8. Die gezeigten Wachstumskurven resultieren aus den Ergebnissen von vier unabhängigen Experimenten. Es zeigte sich für alle drei Wirkstoffkonzentrationen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Eine Tendenz zur Wachstumsverzögerung war zu erkennen, welche jedoch unabhängig von der Wirkstoffkonzentration war. Dies zeigte sich auch in den Populationsverdopplungszeiten (Tabelle 7), die wiederum mittels linearer Regression aus den Werten der Wachstumskurve vom zweiten bis zum achten Tag bestimmt wurden.

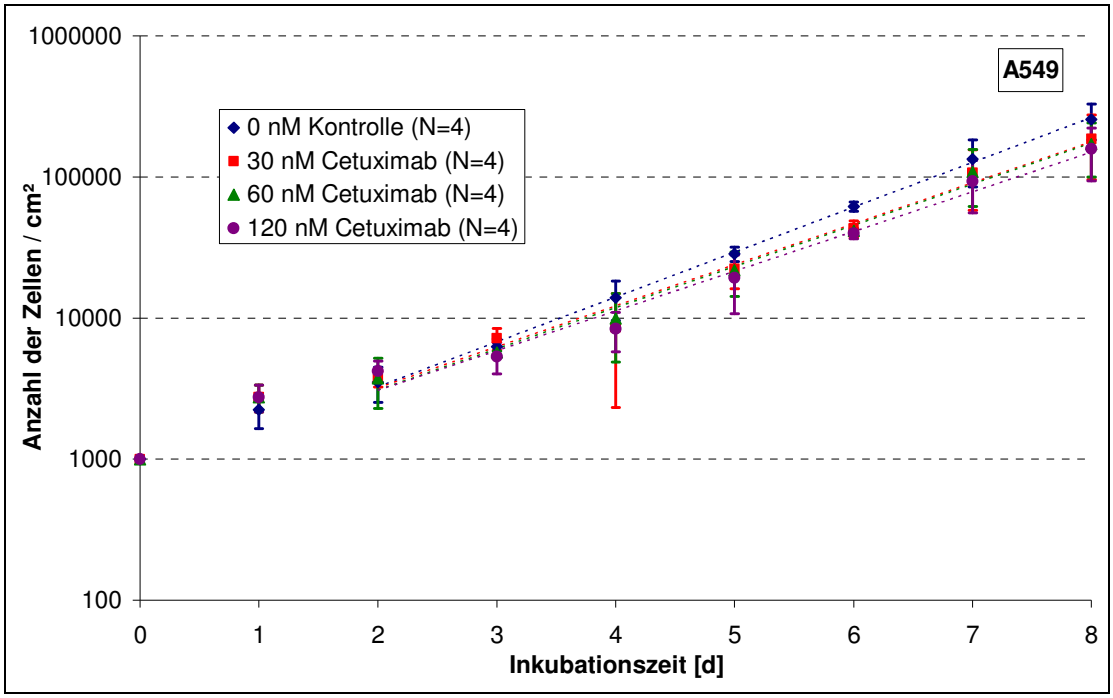

Abb. 8: Wachstumskurven der A549-Zellen unter Einfluss von Cetuximab (Zugabe am Tag 1).

Tab. 7: Populationsverdopplungszeiten unter Einfluss von Cetuximab für die Zelllinie A549

Cetuximabkonzentration in nM	Populationsverdopplungszeit t_{PD} in Stunden +/– Δt_{PD}
0 (Kontrolle)	23 +/– 1
30	25 +/– 1
60	25 +/– 1
120	26 +/– 2

Für die Zelllinie FaDu zeigte sich in Abbildung 9 ein ähnliches Bild. Hier resultieren die gezeigten Wachstumskurven ebenfalls aus den Daten von vier unabhängigen Versuchen. Auch hier lagen die Kurven nach Wirkstoffzugabe tendenziell unter der Kurve der Kontrolle und die Unterschiede waren ebenfalls nicht signifikant. Die Cetuximab-Konzentration spielte auch in diesem Fall keine Rolle. Die mittels linearer Regression vom zweiten bis zum achten Tag ermittelten Populationsverdopplungszeiten sind in Tabelle 8 dargestellt.

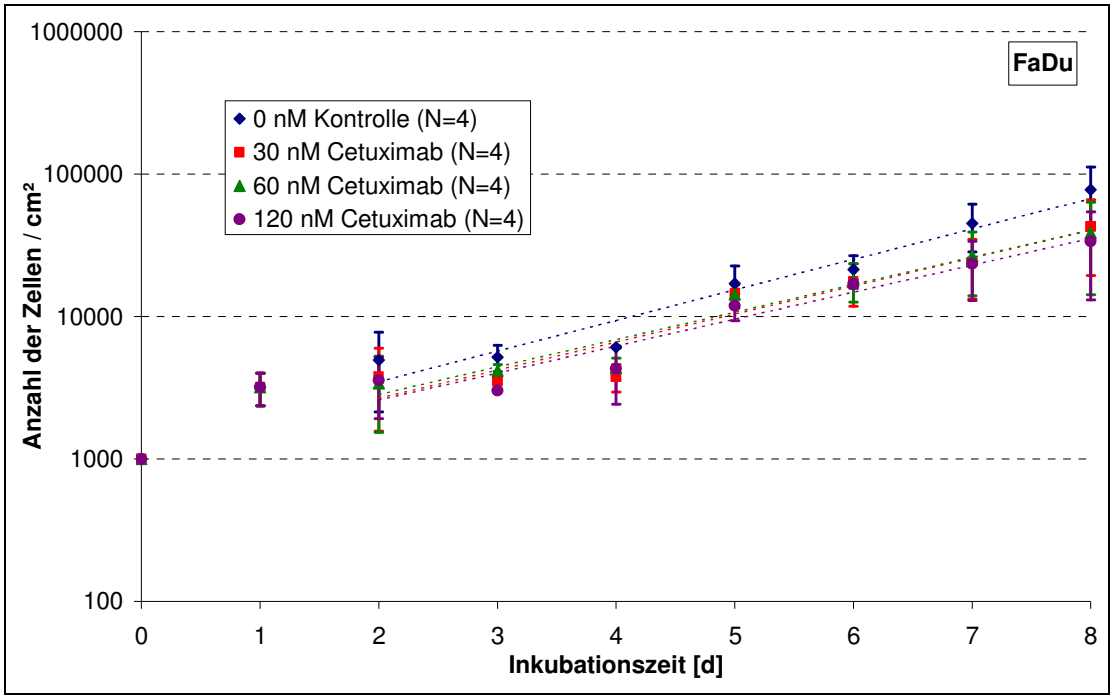

Abb. 9: Wachstumskurven der FaDu-Zellen unter Einfluss von Cetuximab (Zugabe am Tag 1).

Tab. 8: Populationsverdopplungszeiten unter Einfluss von Cetuximab für die Zelllinie FaDu

Cetuximabkonzentration in nM	Populationsverdopplungszeit t_{PD} in Stunden +/– Δt_{PD}
0 (Kontrolle)	34 +/– 4
30	37 +/– 5
60	37 +/– 4
120	38 +/– 5

3.2 Koloniebildungstests – klonogenes Überleben

3.2.1 Einfluss von Celecoxib auf das klonogene Überleben

Zunächst sollen die Ergebnisse der Koloniebildungstests mit der ersten Methode, bei der die Zellen nach der Inkubation mit Celecoxib neu ausgesät wurden, dargestellt werden. Die Abbildungen 10a-c zeigen die Ergebnisse dieser Versuche für die Zelllinie A549 mit den Celecoxib-Konzentrationen 10, 30 und 50 µM. Die Daten für 10 µM wurden aus 3 unabhängigen Versuchen gewonnen. Für die Daten für 30 µM und 50 µM wurden jeweils zwei Versuche durchgeführt. Bei keiner der drei verwendeten Konzentrationen konnte ein Effekt des Wirkstoffes auf das klonogene Zellüberleben festgestellt werden. Die durchgezogenen Linien resultieren aus einem nichtlinearen Fit nach dem Linear-Quadratischen-Modell.

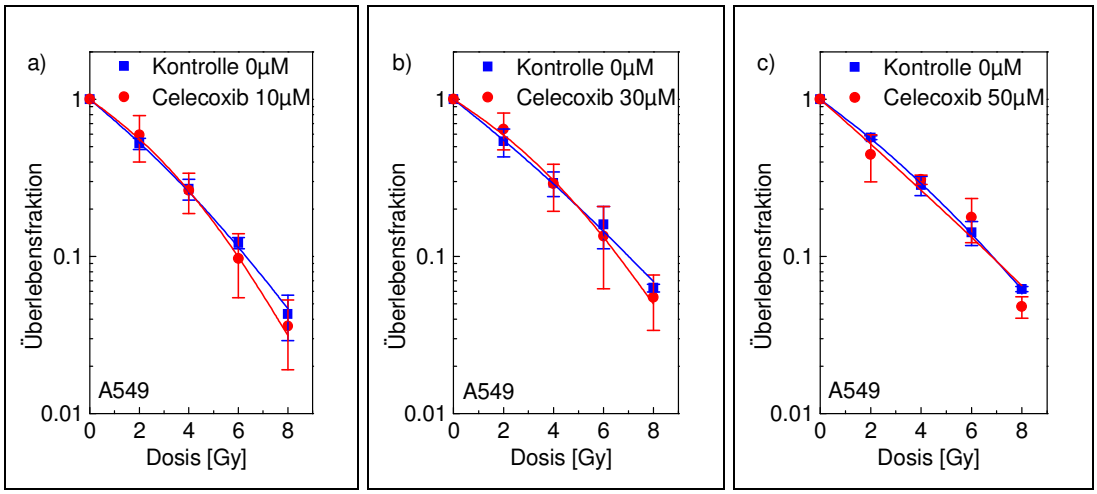

Abb. 10: Überlebenskurve der Zelllinie A549 unter Einfluss von a) 10 µM (N=3), b) 30 µM (N=2) und c) 50 µM (N=2) Celecoxib.

Die Ergebnisse der analogen Versuche für die Zelllinie FaDu sind in den Abbildungen 11a-c dargestellt. Die Überlebenskurven der Zellen nach Behandlung mit Celecoxib-Konzentrationen von 10 bzw. 50 µM stammen aus den Ergebnissen von 2 unabhängigen Versuchen. Für die Experimente mit einer Celecoxib-

Konzentration von 30 µM wurden aufgrund der sich andeutenden Differenzen insgesamt 5 unabhängige Versuche durchgeführt. Auch für die FaDu-Zellen konnte für keine der drei getesteten Wirkstoffkonzentrationen eine Strahlensensibilisierung gezeigt werden. Für die mit 30 µM behandelten Zellen deutete sich eher an, dass sie sich etwas strahlenresistenter zeigen. Jedoch sind auch hier für alle Versuche die Unterschiede nicht signifikant. Auch in diesem Fall wurde ein nichtlinearer Fit nach dem Linear-Quadratischen-Modell durchgeführt, der mit den durchgezogenen Linien dargestellt wurde.

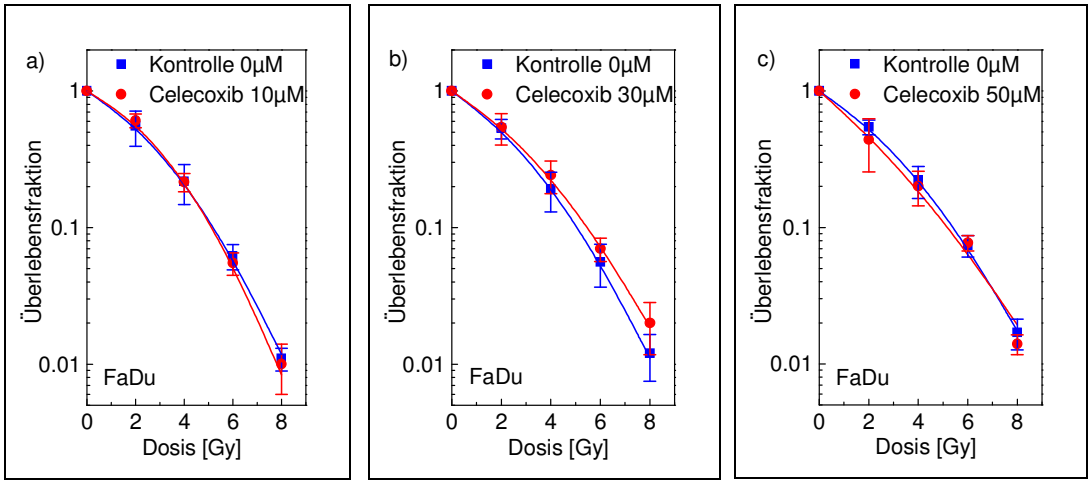

Abb. 11: Überlebenskurve der Zelllinie FaDu unter Einfluss von a) 10 µM (N=2), b) 30 µM (N=5) und c) 50 µM Celecoxib.

Die zweite Methode, bei der die Zellen nach der Bestrahlung nicht abtrypsiniert und neu ausgesät, sondern weiter inkubiert wurden, zeigte bei der Zelllinie A549 qualitativ ähnliche Ergebnisse für die Ansätze mit 30µM Celecoxib. Hier wurde zudem der Bestrahlungszeitpunkt variiert (24, 48 und 72 h nach Wirkstoffzugabe). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 12a-c dargestellt.

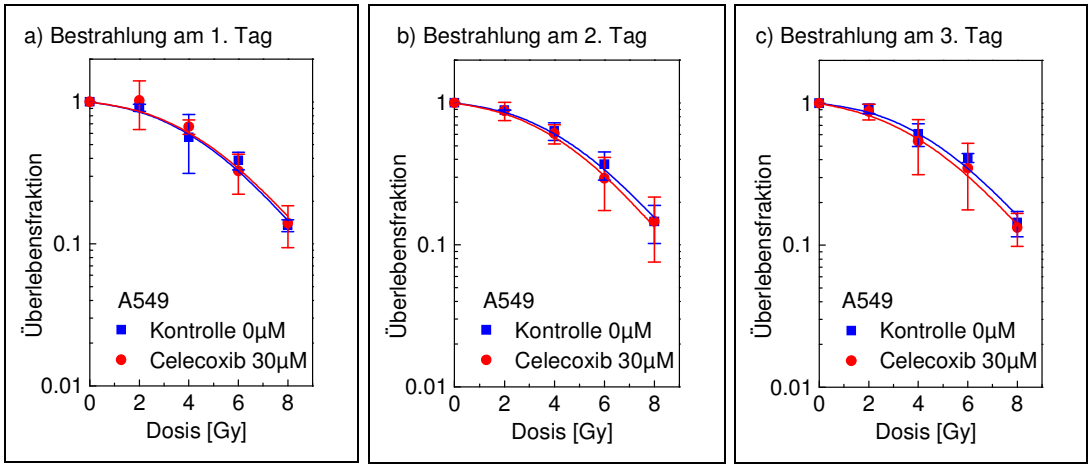

Abb. 12: Überlebenskurve der Zelllinie A549 nach Exposition mit 30 µM Celecoxib und Bestrahlung a) 24 h (N=2) , b) 48h (N=2) und c) 72h (N=2) nach der Einsaat.

Für die Erstellung der Zellüberlebenskurven wurden für jeden Bestrahlungszeitpunkt jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Es ist deutlich zu erkennen, dass auch unter diesen Bedingungen kein Einfluss des Wirkstoffes Celecoxib auf die Strahlensensibilität der Tumorzellen festgestellt werden konnte. Wenn überhaupt Unterschiede zur Kontrolle beobachtet wurden, so waren diese sehr klein und nicht signifikant. Die Variation des Bestrahlungszeitpunktes führte ebenfalls nicht zu Unterschieden in den Überlebenskurven. Anhand der durchgezogenen Linien, welche auch hier nach dem Linear-Quadratischen-Modell angepasst wurden, wird dieses Ergebnis nochmals verdeutlicht.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse mit den A549-Zellen wurde diese zweite Methode für die Zelllinie FaDu mit dem Wirkstoff Celecoxib allein nicht mehr getestet.

3.2.2 Einfluss von Cetuximab auf das klonogene Überleben

Die Ergebnisse für die alleinige Behandlung der Zellen mit Cetuximab sind im Folgenden dargestellt. Für die Erstellung der Überlebenskurven fand ausschließlich die zweite Methode Anwendung. Die Zellen wurden also nicht abtrypsiniert, sondern

nach der Bestrahlung weiter inkubiert. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse für die Zelllinie A549. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Dabei fiel auf, dass in jedem der drei Experimente die Zugabe von Cetuximab zu einer leichten Verringerung der Überlebensfraktion führte. Damit konnte tendenziell ein strahlensensibilisierender Effekt beobachtet werden. Die Varianz der Ergebnisse der unabhängigen Experimente war jedoch so groß, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Cetuximab behandelten und den unbehandelten Zellen der Kontrolle vorlag.

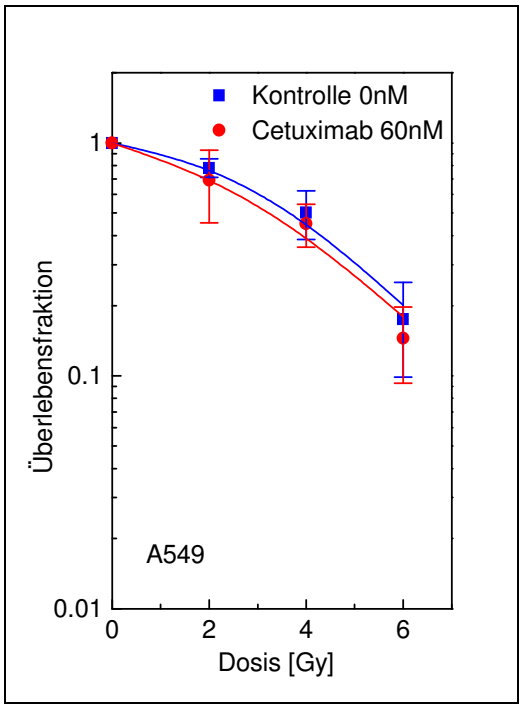

Abb. 13: Überlebenskurve der Zelllinie A549 nach Exposition mit 60 nM Cetuximab (N=3).

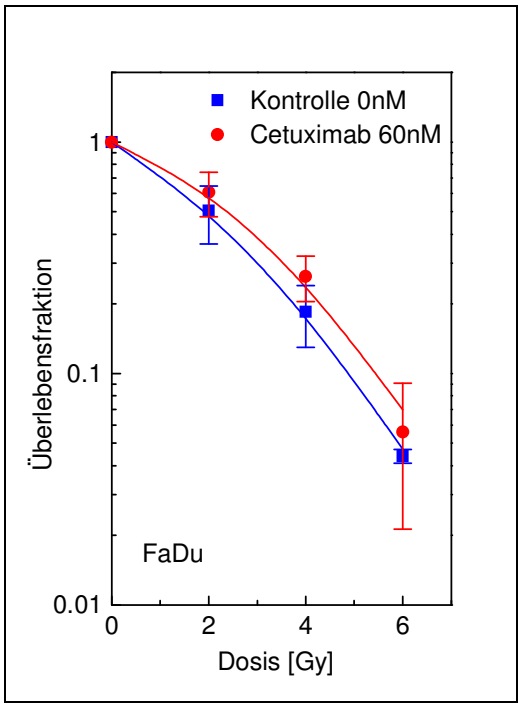

Abb. 14: Überlebenskurve der Zelllinie FaDu nach Expostion mit 60 nM Cetuximab (N=4).

In Abbildung 14 sind die analogen Ergebnisse für die Zelllinie FaDu dargestellt. Hier zeigte sich im Gegensatz zur Zelllinie A549 tendenziell ein strahlenprotektiver Effekt unter dem Einfluss von Cetuximab. Allerdings war auch dieser Unterschied insgesamt nicht signifikant. Die Daten wurden aus vier unabhängigen Experimenten gewonnen.

3.2.3 Einfluss der kombinierten Behandlung mit Celecoxib und Cetuximab auf das klonogene Überleben

Neben der Behandlung der Tumorzellen mit je einem Wirkstoff sollte anschließend getestet werden, ob eine Kombination der Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab das Überleben der Zellen beeinflusst. Celecoxib wurde dazu mit einer Konzentration von 30 µM und Cetuximab mit einer Konzentration von 60 nM eingesetzt.

In der Abbildung 15 sind die Überlebenskurven für die Zelllinie A549 dargestellt. Die Ergebnisse resultieren aus 4 unabhängigen Experimenten. Hier war deutlich ein strahlensensibilisierender Effekt zu erkennen. Die Unterschiede der Überlebensfraktionen waren für die Strahlendosen 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy signifikant ($p<0.05$).

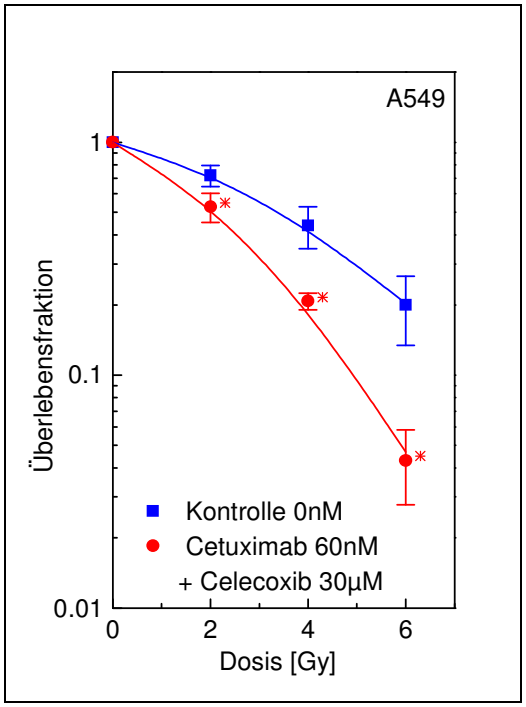

Abb. 15: Überlebenskurve der Zelllinie A549 nach Exposition mit 60 nM Cetuximab und 30 µM Celecoxib (N=4). * $p < 0.05$

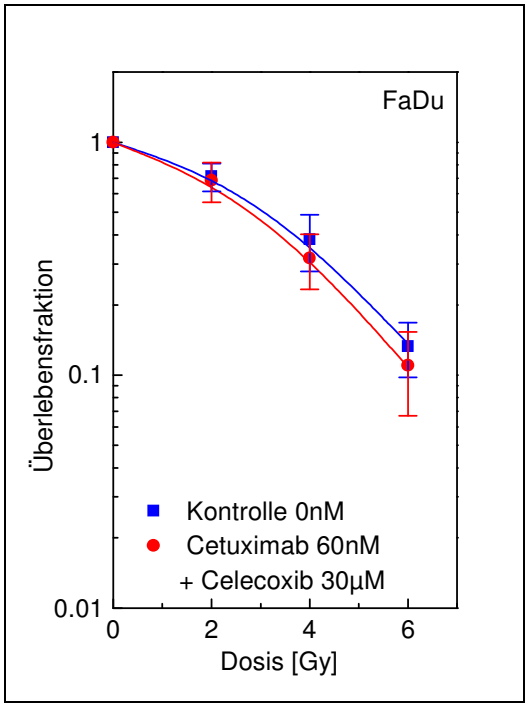

Abb. 16: Überlebenskurve der Zelllinie FaDu nach Exposition mit 60nM Cetuximab und 30µM Celecoxib (N=4).

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse für die Zelllinie FaDu. Auch hier wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt. Allerdings war unter diesen Bedingungen allenfalls eine Tendenz zur Strahlensensibilisierung zu erkennen. Die Unterschiede der Überlebensfraktionen waren nicht signifikant.

Auch bei diesen Versuchsansätzen wurde ein nichtlinearer Fit nach dem Linear-Quadratischen-Modell (durchgezogene Linien) durchgeführt, der abschließend hinsichtlich der Zahlenwerte exemplarisch ausgewertet werden soll. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse dieser Anpassungen dargestellt.

Tab. 9: Ausgewählte Ergebnisse der nichtlinearen Fits an die Daten der Überlebenstests.

Zelllinie	Wirkstoffzugabe	α +/– $\Delta\alpha$ [Gy^{-1}]	β +/– $\Delta\beta$ [Gy^{-2}]
A549	Kontrolle	0,10 +/– 0,01	0,027 +/– 0,002
	60 nM Cetuximab + 30 µM Celecoxib	0,21 +/– 0,03	0,051 +/– 0,007
FaDu	Kontrolle	0,08 +/– 0,01	0,043 +/– 0,003
	60 nM Cetuximab + 30 µM Celecoxib	0,10 +/– 0,01	0,044 +/– 0,002

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich sowohl die α– als auch die β–Werte für die Zelllinie A549 bei einer Behandlung mit der Wirkstoffkombination in etwa verdoppelten, während sie für die Zelllinie FaDu nahezu gleich blieben. Der Unterschied war für die A549-Zellen hoch signifikant ($p<0,001$). Das Verhältnis α/β wurde jedoch auch bei den A549-Zellen kaum durch die Zugabe der Wirkstoffe beeinflusst (α/β = 3,7 Gy für die Kontrolle, α/β = 4,1 Gy für die Wirkstoffkombination). Der Unterschied war hier nicht signifikant.

3.3 γH2AX-Tests – Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Für beide Zelllinien wurde mittels γH2AX-Test eine quantitative Analyse der Reparaturkapazität von DSB durchgeführt. Dazu wurden die angefärbten DSB unter dem Fluoreszenz-Mikroskop für mindestens 50 Zellen pro Ansatz gezählt. Die Abbildungen 17a und 17b zeigen beispielhaft Aufnahmen mit der Mikroskopkamera für beide Zelllinien.

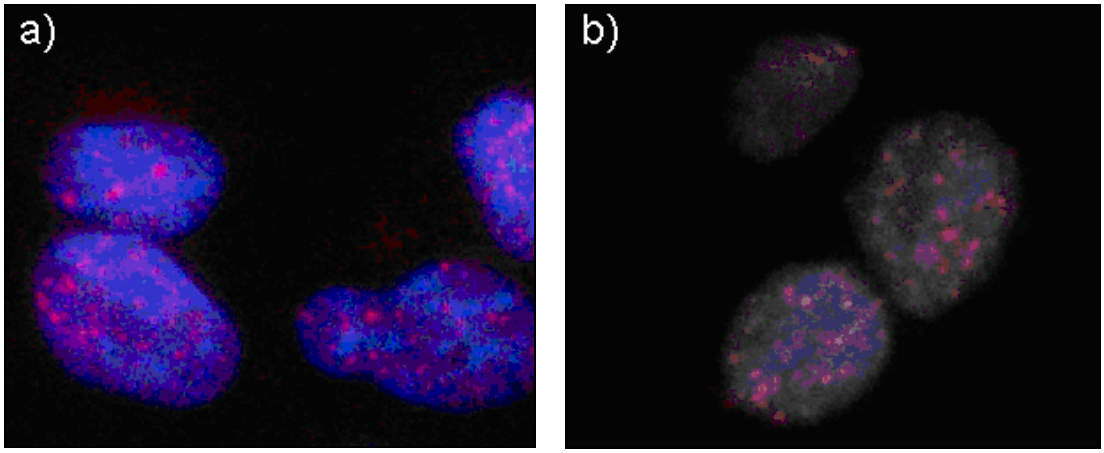

Abb. 17: Beispiel für die Anfärbung der DNA-Doppelstrangbrüche in einer Probe der Zelllinie a) A549 und b) FaDu 2 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy ohne Wirkstoffzusätze.

Es wurde die Zahl der residualen DSB der Kontrollproben ohne Wirkstoffzusatz mit denen der Proben unter Einfluss von 30 µM Celecoxib und 60 nM Cetuximab, jeweils allein und in Kombination, verglichen. Zudem war der Zeitpunkt der Probennahme für alle Ansätze, sowohl für die unbestrahlten Kontrollen als auch für die mit einer Dosis von 4 Gy bestrahlten Ansätze, jeweils zwei Stunden bzw. 24 Stunden nach der Bestrahlung. Die quantitative Auswertung von jeweils drei unabhängigen Experimenten soll zunächst für die Zelllinie A549 dargestellt werden. Die Abbildung 18 zeigt die Daten für die unbestrahlten Kontrollen, während in Abbildung 19 die Daten für die bestrahlten Proben dargestellt sind.

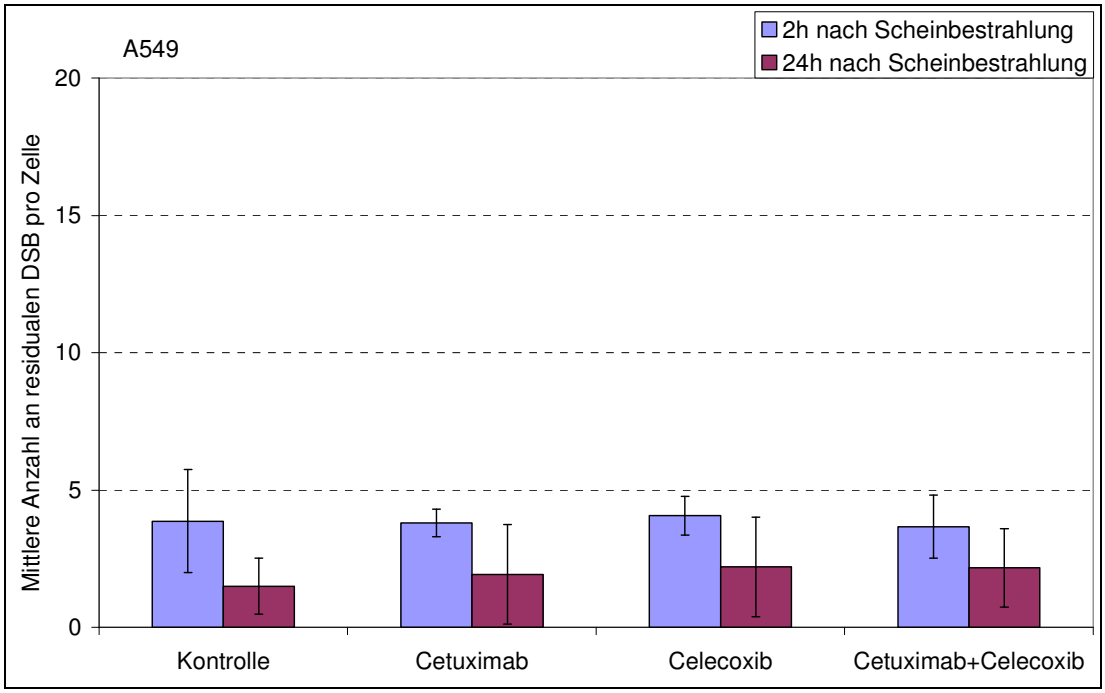

Abb. 18: Mittlere Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche pro Zelle in der Zelllinie A549 unter Zusatz verschiedener Wirkstoffe nach Scheinbestrahlung (N=3).

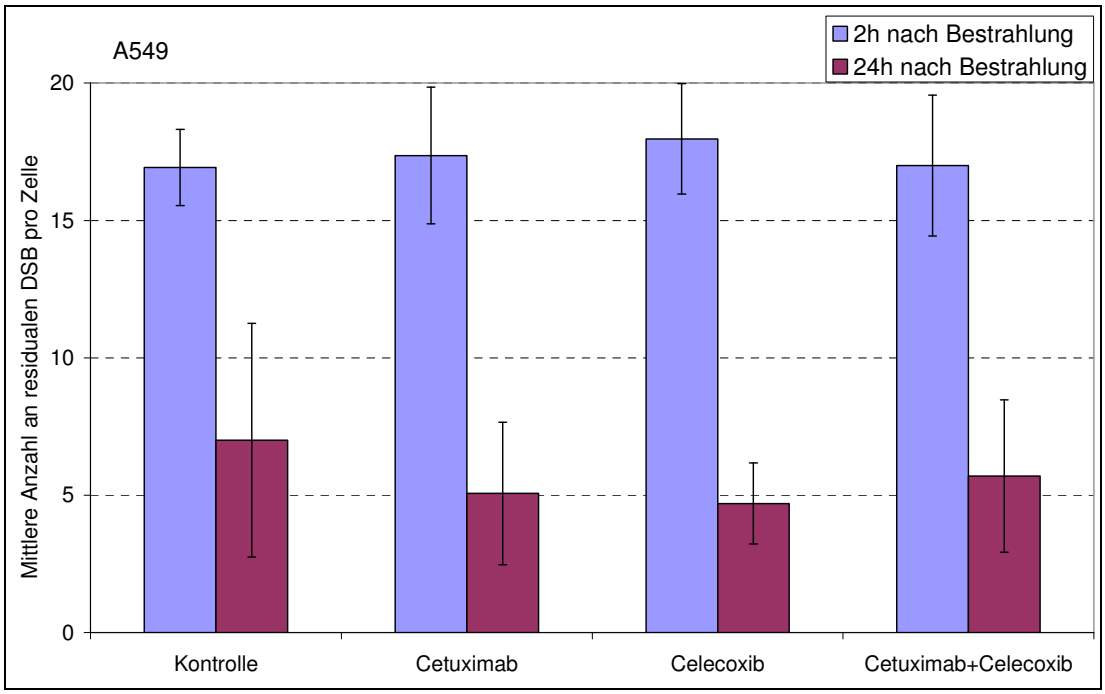

Abb. 19: Mittlere Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche pro Zelle in der Zelllinie A549 unter Zusatz verschiedener Wirkstoffe nach Bestrahlung mit 4 Gy (N=3).

In Abbildung 18 ist deutlich zu erkennen, dass bereits in den nur scheinbestrahlten Proben eine geringe mittlere Anzahl an residualen DSB pro Zelle vorlag. Zwei Stunden nach der Scheinbestrahlung wurden im Mittel etwa vier, nach weiteren 22 Stunden noch etwa zwei DSB pro Zelle gezählt. Aufgrund der großen Varianzen war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant. Der Zusatz der Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab bewirkte weder jeweils allein noch in Kombination einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle ohne Wirkstoffe.

Die Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy erhöhte die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche zwei Stunden nach der Exposition signifikant ($p<0,01$) auf mehr als 400 % der scheinbestrahlten Kontrolle (Abbildung 19). 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden im Vergleich dazu dann wieder signifikant ($p<0,05$) weniger DNA-Doppelstrangbrüche gezählt, aber immer noch etwa dreimal so viele, wie in der scheinbestrahlten Kontrolle. Dieser Unterschied zwischen der scheinbestrahlten Kontrolle und den bestrahlten Zellen war jedoch aufgrund der großen Varianzen nicht signifikant ($0,14<p<0,17$). Zudem bewirkte auch hier der Zusatz der Wirkstoffe weder allein noch in Kombination einen Unterschied zur wirkstofffreien Kontrolle.

Für die analogen Versuche mit der Zelllinie FaDu zeigte sich ein qualitativ anderes Ergebnis. In der Abbildung 20 sind die Daten für die scheinbestrahlten Kontrollen, in der Abbildung 21 die Daten für die mit einer Dosis von 4 Gy behandelten Zellen dargestellt. Es wurden ebenfalls jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Auch hier konnte schon in der scheinbestrahlten Kontrolle (Abbildung 20) eine geringe Anzahl an DSB nachgewiesen werden. Zwei Stunden nach der Scheinbestrahlung wurden im Mittel wiederum etwa vier DSB pro Zelle gezählt. 24 Stunden nach der Scheinbestrahlung erhöhte sich die Anzahl geringfügig auf etwa fünf pro Zelle. Dieser Unterschied war jedoch ebenfalls nicht signifikant. Die Zugabe der Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab hatte auch hier weder jeweils allein noch in Kombination einen Einfluss auf die ermittelte Anzahl an DSB.

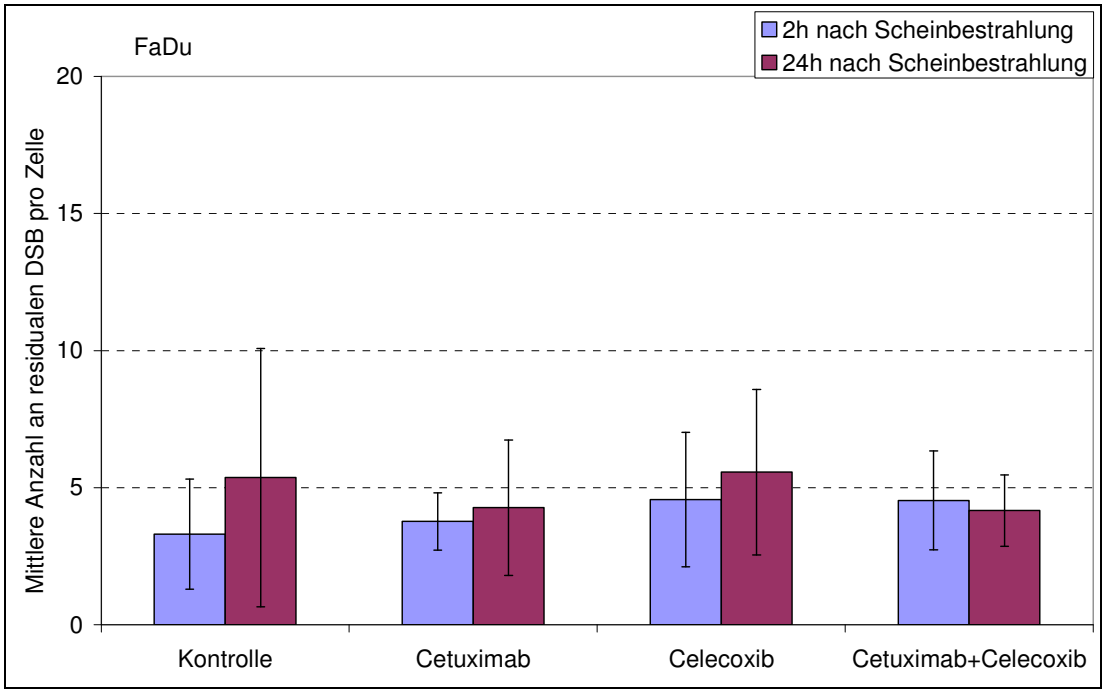

Abb. 20: Mittlere Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche pro Zelle in der Zelllinie FaDu unter Zusatz verschiedener Wirkstoffe nach Scheinbestrahlung (N=3).

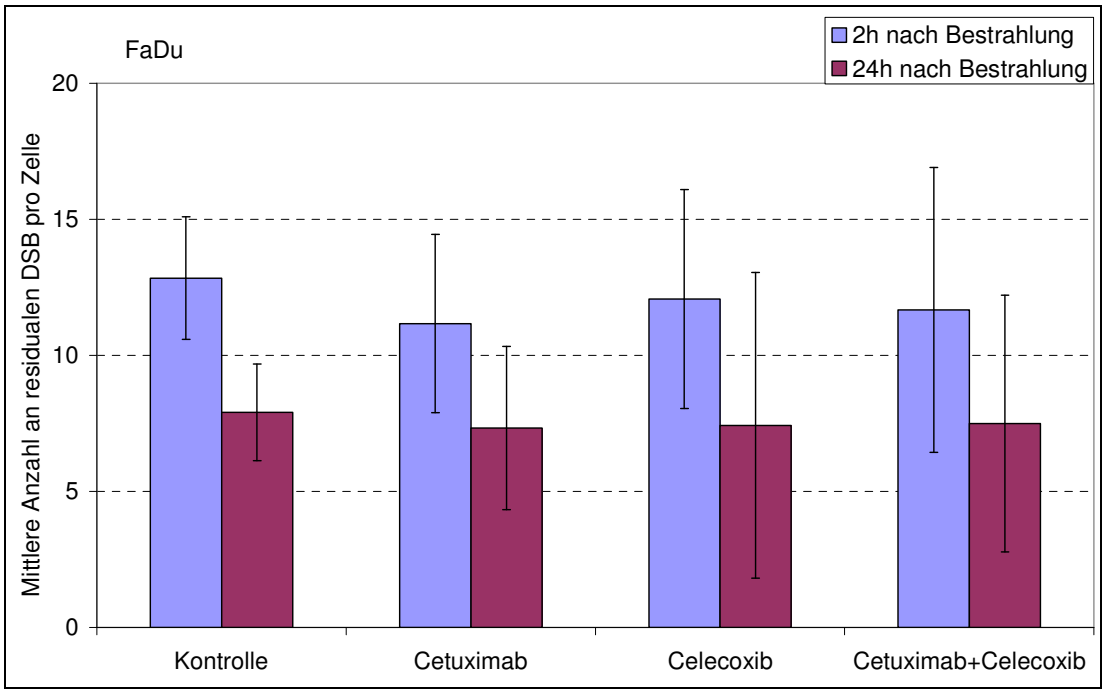

Abb. 21: Mittlere Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche pro Zelle in der Zelllinie FaDu unter Zusatz verschiedener Wirkstoffe nach Bestrahlung mit 4 Gy (N=3).

Die Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy führte bei den FaDu-Zellen zu Zunahme der Anzahl der DSB auf etwa 300 % zwei Stunden nach der Bestrahlung (Abbildung 21). Nach weiteren 22 Stunden konnte tendenziell wieder eine Verringerung der Anzahl festgestellt werden, welche jedoch nur für die wirkstofffreien Kontrollen signifikant war. Auch waren 24 Stunden nach der Bestrahlung immer noch tendenziell mehr DSB vorhanden als nach der Scheinbestrahlung. Allerdings war dieser Unterschied aufgrund der großen Varianzen nicht signifikant. Die Zugabe der Wirkstoffe beeinflusste die ermittelte Anzahl an DSB auch in diesem Versuchsansatz nicht.

Im Vergleich der Zelllinien A549 und FaDu bezüglich der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen konnte also ein qualitativ unterschiedliches Verhalten beobachtet werden. Zum einen wurden im Zeitfenster zwei Stunden nach der Bestrahlung bei den A549-Zellen im Mittel mehr DSB pro Zelle gezählt als bei den FaDu-Zellen. Der Unterschied war zwar nicht signifikant, aber in der Tendenz sowohl für die Kontrolle als auch für die Proben mit Wirkstoffzugabe zu beobachten. Zum Anderen kehrte sich das Ergebnis 24 Stunden nach der Bestrahlung um. Zu diesem Zeitpunkt war die mittlere Anzahl der DSB pro Zelle in den FaDu-Zellen tendenziell höher als in den A549-Zellen. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant, aber qualitativ ebenfalls in allen Proben zu beobachten. Insgesamt ergab sich damit eine deutlich unterschiedliche Reparaturkapazität innerhalb von 22 Stunden. Während die Anzahl der DSB für die Zellen der Zelllinie A549 auf ca. 25 % abnahm, wurden bei den Zellen der Zelllinie FaDu in dieser Zeit weniger als 50 % der Schäden repariert. Das Verhältnis der Anzahl der DSB nach 2 Stunden bzw. 24 Stunden in jedem Einzelversuch wurde als Reparaturkapazität definiert. Bei der Betrachtung aller Versuche ergab sich für die A549-Zellen ein Verhältnis von 4,0 +/– 2,4 und für die FaDu-Zellen ein Verhältnis von 1,8 +/– 0,7. Damit konnte quantitativ ein signifikanter Unterschied ($p<0,008$) in der Reparaturkapazität nachgewiesen werden.

3.4 Durchflusszytometrie – Zellzyklus

Die Ergebnisse der Untersuchung des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie sollen im Folgenden dargestellt werden.

Zunächst wurde untersucht, ob die Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab jeweils allein und in Kombination den Zellzyklus der beiden Zelllinien A549 und FaDu beeinflussen. Analog zu den anderen durchgeführten Experimenten betrug die getestete Konzentration für Celecoxib 30 µM und für Cetuximab 60 nM. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie 72 Stunden nach der Wirkstoffzugabe sind in der Abbildung 22 (A549-Zellen) und in der Abbildung 23 (FaDu-Zellen) dargestellt. Für beide Zelllinien wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Während der Wirkstoff Celecoxib die Verteilung des Zellzyklus für beide Zelllinien nicht beeinflusste, war der Wirkstoff Cetuximab offensichtlich in der Lage, Tumorzellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus zu arretieren und den Anteil der S-Phase-Zellen zu verringern. Bei den FaDu-Zellen konnte nach der Behandlung mit Cetuximab eine Zunahme des Anteils der Zellen in der G0/G1-Phase um 9,2 % und eine Abnahme bei den S-Phase-Zellen um 7,8 % beobachtet werden (Abbildung 23). Bei der Wirkstoffkombination war der Unterschied zur Kontrolle etwas weniger ausgeprägt (G0/G1-Phase: + 6,8 % ; S-Phase: – 5,3 %). Dieser Effekt war bei den A549-Zellen zwar in der gleichen Tendenz zu beobachten, der Unterschied zur Kontrolle betrug jedoch für eine Behandlung mit Cetuximab allein nur 1,4 % (Abbildung 22). Bei der Behandlung mit der Wirkstoffkombination war der Effekt nur geringfügig stärker ausgeprägt (G0/G1-Phase: + 4,0 % ; S-Phase: – 3,4 %). Die Kombination beider Wirkstoffe hatte demnach keinen zusätzlichen Effekt zur Folge. Das Ergebnis entsprach für beide Zelllinien in etwa dem Ergebnis unter Zugabe von Cetuximab allein. Die Unterschiede waren dabei kleiner als 3 %.

Die Ergebnisse der Analyse früherer Zeitpunkte (24 und 48 Stunden) nach der Wirkstoffzugabe wurden nicht dargestellt, da sich hier weder für die Zelllinie A549 noch für die Zelllinie FaDu ein Einfluss auf die Zellzyklusverteilung mit Unterschieden größer als 3 % nachweisen ließ.

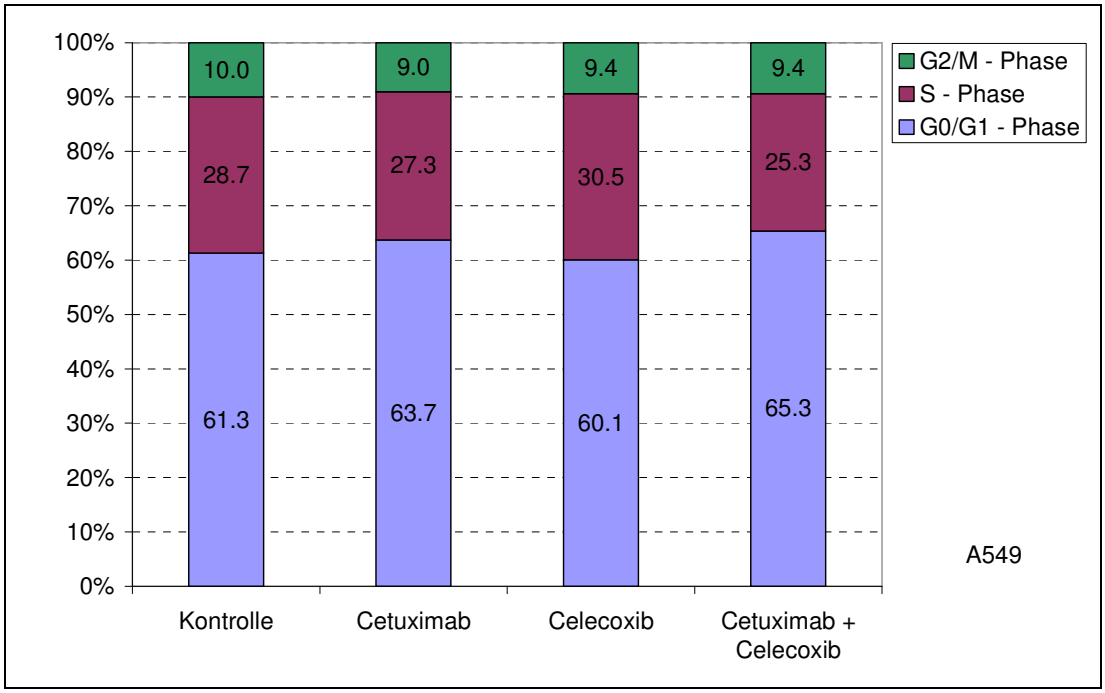

Abb. 22: Zellzyklusverteilung der A549-Zellen 72 h nach Zugabe von 30 µM Celecoxib und/oder 60 nM Cetuximab (N=3).

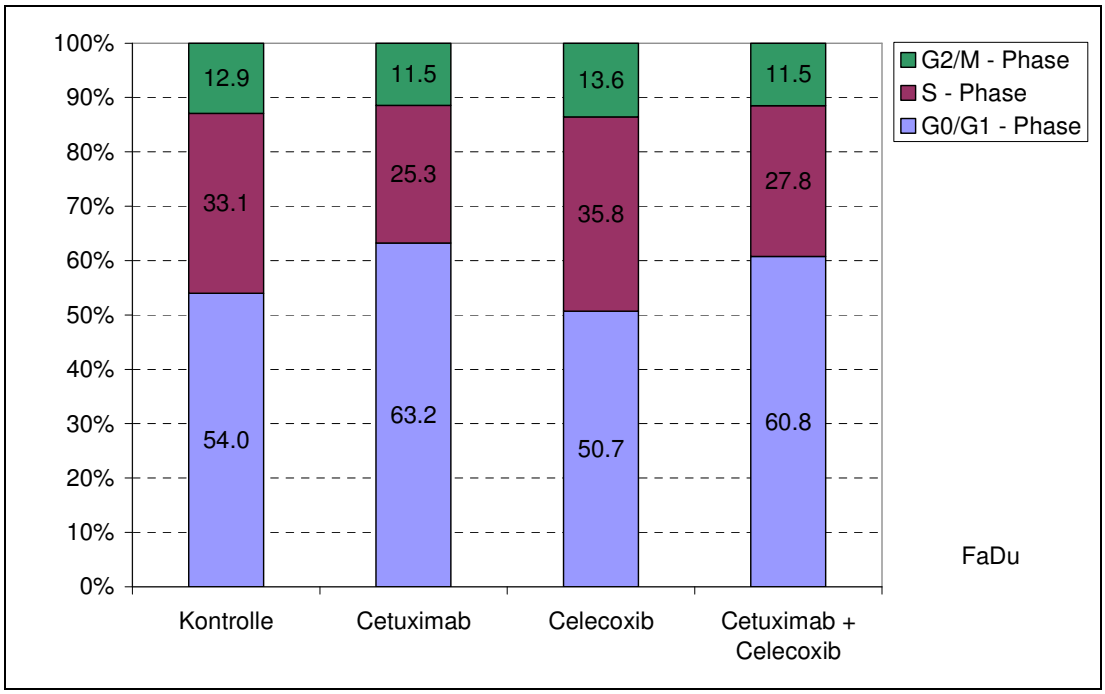

Abb. 23: Zellzyklusverteilung der FaDu-Zellen 72 h nach Zugabe von 30 µM Celecoxib und/oder 60 nM Cetuximab (N=3).

Während beide Zelllinien unter Zugabe von Celecoxib bzw. Cetuximab ein qualitativ ähnliches Verhalten bezüglich des Zellzyklus zeigten, stellte sich nach einer Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy ein gravierender Unterschied dar. Die Abbildungen 24a-c zeigen die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen für die A549-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung. Unmittelbar (0,5 Stunden) nach der Bestrahlung (Abbildung 24a) war weder ein Einfluss der Bestrahlung, noch ein Einfluss der Wirkstoffe auf die Zellzyklusverteilung erkennbar. Es konnte lediglich eine leichte Tendenz zum G0/G1-Arrest für die mit Cetuximab behandelten Zellen (+ 1,2 %) beobachtet werden.

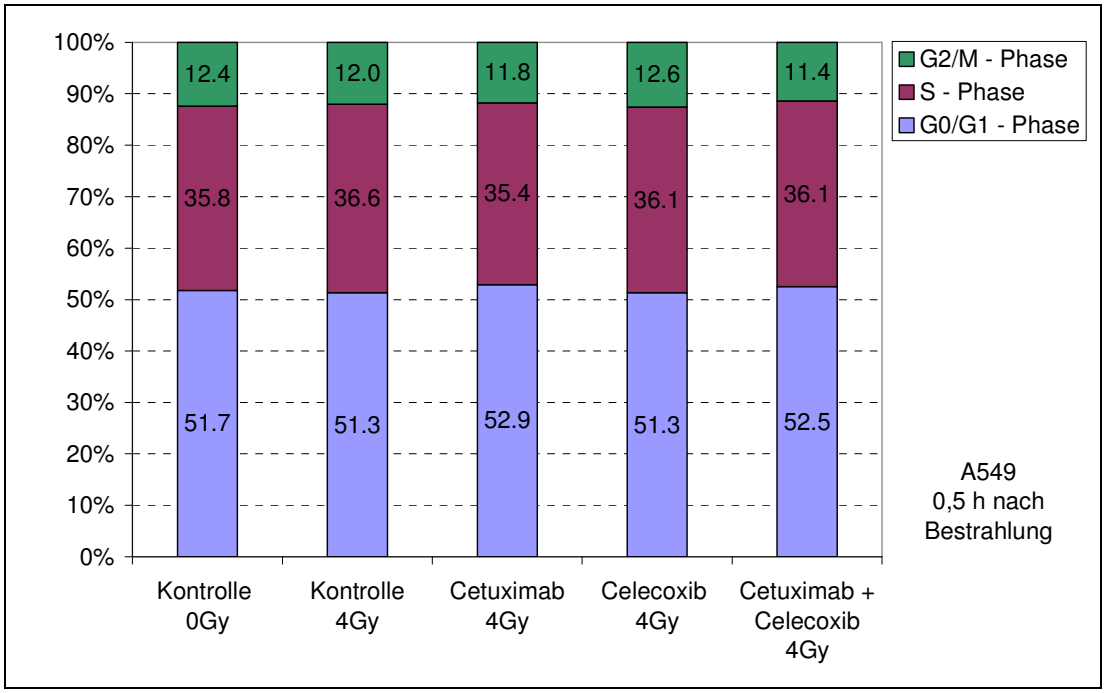

Abb. 24a: Zellzyklusverteilung der A549-Zellen 0,5 h nach Bestrahlung mit 4 Gy unter Zugabe von 30 µM Celecoxib oder/und 60 nM Cetuximab 1 h vor Bestrahlung (N=3).

24 Stunden nach der Bestrahlung (Abbildung 24b) nahm jedoch in den bestrahlten Ansätzen der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase zu (+ 3,5 %). Dieser Effekt wurde durch den Einfluss von Celecoxib verstärkt (+ 7,0 %). Außerdem war zu diesem

Zeitpunkt die Zunahme der Zellzahl in der G0/G1-Phase durch den Wirkstoff Cetuximab noch deutlicher zu erkennen (+ 6,3 %). Damit ergab sich eine Reduktion des Zellanteils in der S-Phase durch die Bestrahlung, welche sowohl durch den Wirkstoff Celecoxib als auch durch Cetuximab verstärkt wurde. Den geringsten Anteil an Zellen in der S-Phase hatten im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (27,3 %) die Proben, die mit der Kombination von Celecoxib und Cetuximab behandelt wurden (15,9 %).

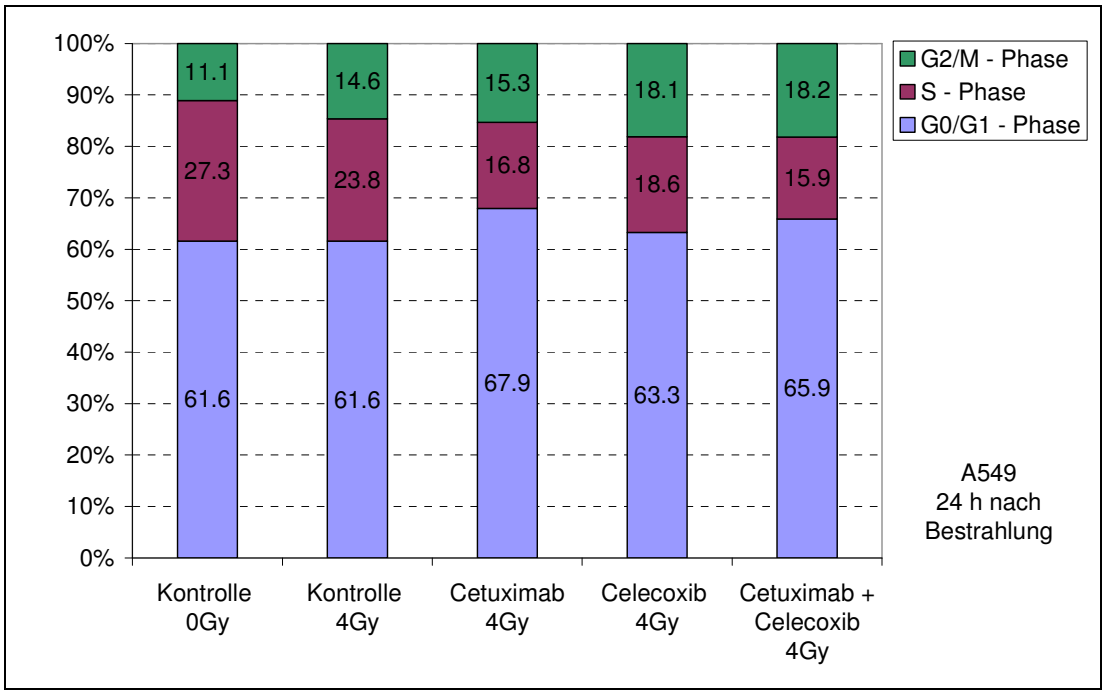

Abb. 24b: Zellzyklusverteilung der Zelllinie A549 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy unter Zugabe von 30 µM Celecoxib und/oder 60 nM Cetuximab 1 h vor Bestrahlung (N=3).

48 Stunden nach der Bestrahlung konnte für die bestrahlten Zellen ein ausgeprägter G2/M-Arrest beobachtet werden, der bei den mit Celecoxib behandelten Zellen mit einem Zellanteil von 22,7 % am deutlichsten war (Kontrolle: 12,1 %).

Ein Einfluss des Wirkstoffs Cetuximab war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachzuweisen. Der vorher beobachtete G0/G1-Arrest war im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle allenfalls noch tendenziell zu erkennen. Trotzdem war zu

diesem Zeitpunkt der Anteil der S-Phase-Zellen durch die Bestrahlung bereits deutlich reduziert (– 10,6 %), wobei dieser Effekt insbesondere durch die Kombination der Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab verstärkt wurde (– 12,8 %).

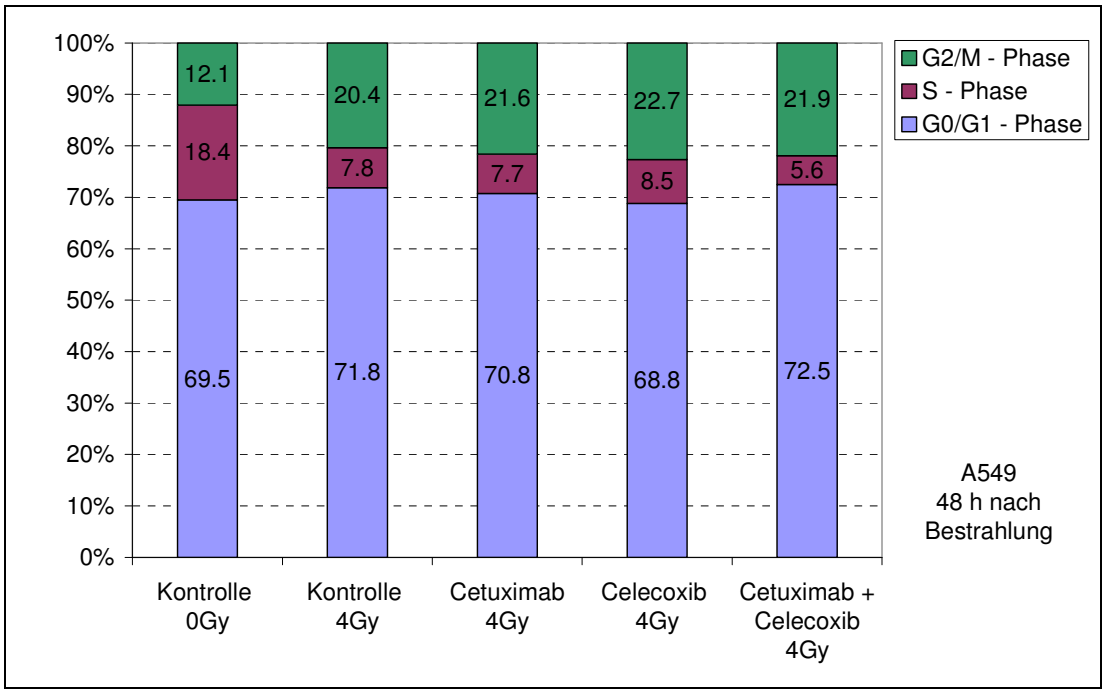

Abb. 24c: Zellzyklusverteilung der Zelllinie A549 48 h nach Bestrahlung mit 4 Gy unter Zugabe von 30 µM Celecoxib oder/und 60 nM Cetuximab 1 h vor Bestrahlung (N=3).

Für die FaDu-Zellen zeigte sich ein anderes Bild (Abbildungen 25a-c). Hier wurde der Anteil der S-Phase-Zellen durch die Bestrahlung nicht reduziert, sondern erhöht. Dieser Effekt war bereits unmittelbar (0,5 Stunden) nach der Bestrahlung (Abbildung 25a) zu beobachten (S-Phase: + 2,9 %). Auch 24 Stunden nach der Bestrahlung (Abbildung 25b) konnte im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ein erhöhter Anteil der S-Phase-Zellen (+ 6,0 %) beobachtet werden. Der Wirkstoff Cetuximab konnte diesen Effekt durch eine Arretierung von Zellen in der G0/G1-Phase (+ 7,3 %) nahezu aufheben. Dennoch konnte der Anteil der S-Phase-Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle weder durch die Wirkstoffe jeweils allein, noch durch ihre Kombination reduziert werden.

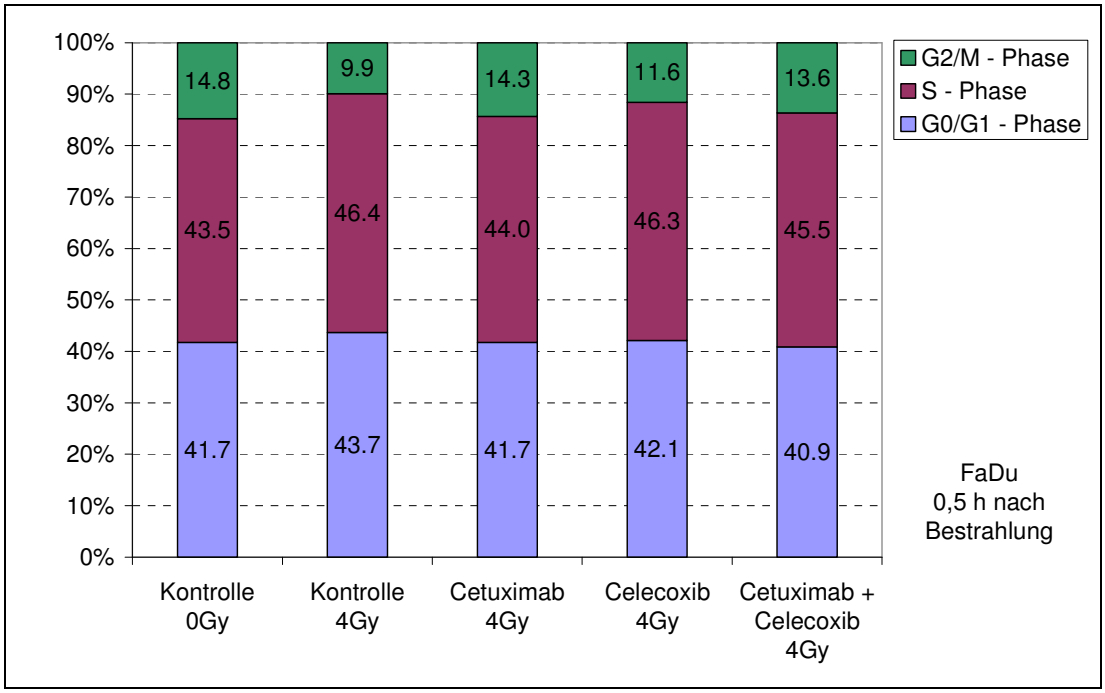

Abb. 25a: Zellzyklusverteilung der Zelllinie FaDu 0,5 h nach Bestrahlung mit 4 Gy unter Zugabe von 30 µM Celecoxib oder/und 60 nM Cetuximab 1 h vor Bestrahlung (N=3).

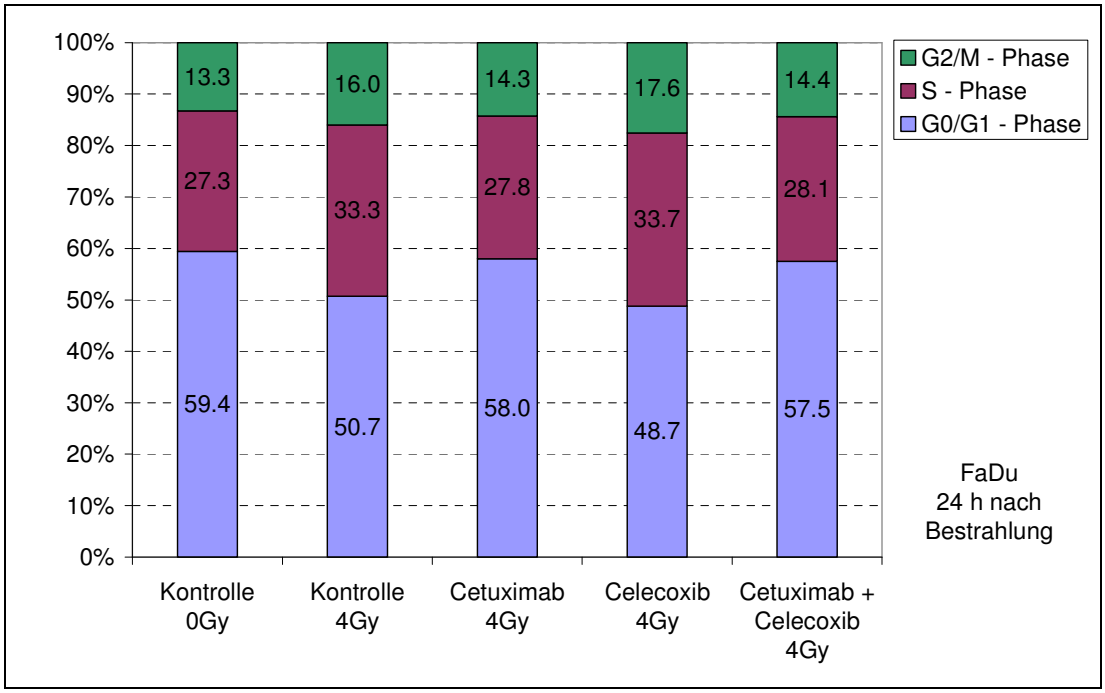

Abb. 25b: Zellzyklusverteilung der Zelllinie FaDu 24 h nach Bestrahlung mit 4 Gy unter Zugabe von 30 µM Celecoxib oder/und 60 nM Cetuximab 1 h vor Bestrahlung (N=3).

Auch bei der Analyse des Zellzyklus 48 Stunden nach Bestrahlung (Abbildung 25c) blieb das Ergebnis ähnlich. Der Anteil der Zellen in der S-Phase war bei der bestrahlten Kontrolle mit 32,7 % nach wie vor größer als in der unbestrahlten Kontrolle mit 23,9 %. Cetuximab konnte diesen Effekt wiederum aufheben, allerdings zu diesem Zeitpunkt durch eine Arretierung von Zellen in der G0/G1-Phase (+ 4,8 %) und in der G2/M-Phase (+ 5,6 %), verglichen mit der bestrahlten Kontrolle. Ein G2/M-Arrest durch Celecoxib konnte jedoch nicht gezeigt werden. Stattdessen war bei den FaDu-Zellen ein deutlicher G0/G1-Arrest (+ 9,7 %) unter Einfluss von Celecoxib zu erkennen. Dadurch führte auch hier die Kombination der Wirkstoffe zur geringsten Anzahl von Zellen in der S-Phase, wenngleich diese mit 21,3 % nur minimal kleiner war als in der unbestrahlten Kontrolle mit 23,9 %.

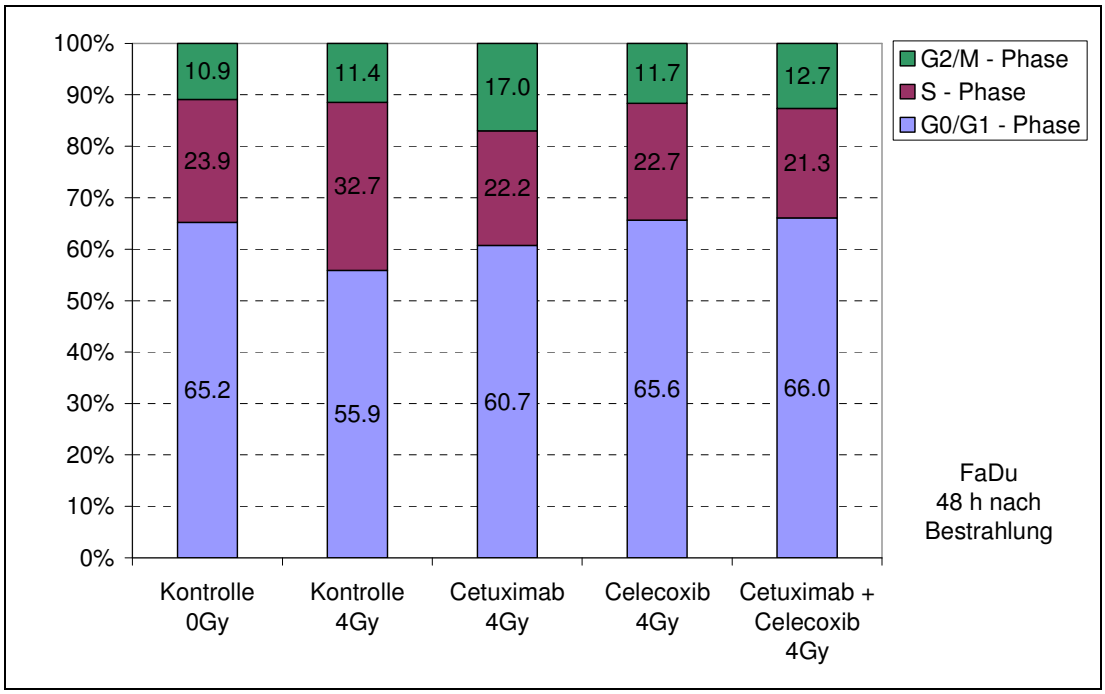

Abb. 25c: Zellzyklusverteilung der Zelllinie FaDu 48 h nach Bestrahlung mit 4 Gy unter Zugabe von 30 µM Celecoxib oder/und 60 nM Cetuximab 1 h vor Bestrahlung (N=3).

Die Reaktion der Zelllinien auf die Bestrahlung war also hinsichtlich der Zellzyklusverteilung sehr unterschiedlich. Die Wirkung der Substanzen Cetuximab

und Celecoxib sowie deren Kombination war jedoch in beiden Zelllinien teilweise ähnlich. So führte Cetuximab in beiden Zelllinien zur Arretierung von Zellen in der G0/G1-Phase. Unter Einfluss von Celecoxib zeigte sich eine Arretierung von A549-Zellen in der G2/M-Phase und von FaDu-Zellen in der G0/G1-Phase. Die Kombination der Wirkstoffe führte in beiden Zelllinien zu einer Minimierung der Anzahl an S-Phase-Zellen.

4. Diskussion

4.1 Zellwachstum

Der Vergleich des Zellwachstums mit und ohne Wirkstoffzugabe lässt erste Schlüsse auf den Einfluss der Substanzen auf die Tumorzellen in Kultur zu. In der vorliegenden Arbeit ging es in den Wachstumsversuchen vor allem darum, die Wirkstoffe auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu untersuchen und im Anschluss daran die Konzentration für die nachfolgenden Versuche festzulegen.
Die nativen Wachstumskurven ohne Wirkstoffzugabe zeigten einen typischen Verlauf. Ein bis zwei Tage nach der Einsaat (lag-Phase) begann bei beiden Zelllinien das exponentielle Wachstum (log-Phase), welches über die gesamten 8 Tage anhielt. Eine beginnende Sättigung wurde aufgrund der geringen Einsaatzellzahl erst ab dem achten Tag beim Überschreiten einer Zellzahl von 10^5 Zellen/cm² beobachtet. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt konfluent.

4.1.1 Zellwachstum unter Einfluss von Celecoxib

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit Celecoxib zeigten für die beiden untersuchten Zelllinien ein ähnliches Verhalten. Der Wirkstoff verursachte sowohl bei den A549- als auch bei den FaDu-Zellen eine dosisabhängige Wachstumsverzögerung. Mit steigender Dosierung nahm das Wachstum der Zellen deutlich ab. Es wurden IC_{50}-Werte von 38 µM (A549) und 40 µM (FaDu) ermittelt. Ab einer Celecoxib-Dosis von 70 µM konnte für die Zelllinie FaDu kaum noch eine Zunahme der Zellzahl beobachtet werden. Noch höhere Celecoxib-Konzentrationen führten zum Absterben aller Zellen nach wenigen Tagen. Diese beobachtete dosisabhängige Wirkung von Celecoxib auf das Wachstum von Tumorzellen wurde in der Literatur vielfach beschrieben und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. So

wurde diese Wirkung für A549- und MCa-35-Zellen (Mamma-Karzinom-Zellen) gezeigt [80]. Für weitere Mamma-Karzinom-Zelllinien konnte dies bestätigt werden [81]. Sun et al. (2005) testeten neben der Zelllinie A549 zwölf weitere Bronchial-Karzinom-Zelllinien und fanden für diese Zellen ebenfalls eine dosisabhängige Wachtumsverzögerung [82]. Das gleiche Verhalten konnte für fünf Zelllinien von Plattenepithel-Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches nachgewiesen werden [83]. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten IC_{50}-Werte für die Wachstumsverzögerung liegen ebenfalls in publizierten Größenordnungen (34 µM für MDA-MB-231 Zellen [81], 19 bis 33 µM für Bronchial-Karzinom-Zellen, 20 µM für A549 [82], 25 bis 50 µM für verschiedene Kopf-Hals-Tumor-Zellen [83]).

Die Wachstumskurven selbst lassen jedoch noch keinen Schluss auf die eigentliche Wirkung des Wirkstoffs Celecoxib zu. Für die beobachteten Wachstums-verzögerungen werden verschiedene Ursachen diskutiert. Zum einen wurde für diverse Tumorzelllinien ein von der Celecoxib-Konzentration abhängiger Arrest von Tumorzellen in der G1-Phase beobachtet [84, 85], der unmittelbar eine Proliferationshemmung verursacht. Zum anderen können gerade bei höheren Wirkstoffkonzentrationen zytotoxische Effekte, wie die Induktion von Apoptose [80, 82, 85, 86], eine Rolle spielen, die aktuell auch bei anderen COX-2-Inhibitoren beobachtet wurden [87].

Auch *in vivo* sind für die A549-Zellen und weitere Tumorzelllinien Wachstumsverzögerungen unter Celecoxibgabe nachgewiesen worden. So konnte gezeigt werden, dass sekundäre A549-Tumore in Mäusen durch Celecoxib im Wachstum gehemmt werden [88]. Der gleiche Effekt wurde bei Colon-Karzinomen (HCT-15 und HCT-116) in Nacktmäusen nachgewiesen [89].

4.1.2 Zellwachstum unter Einfluss von Cetuximab

Für den Wirkstoff Cetuximab war der Einfluss auf die beiden Zelllinien ebenfalls ähnlich. Es wurde sowohl für die Zelllinie A549 als auch für die FaDu-Zellen eine

leichte Tendenz zur Wachstumshemmung beobachtet, die jedoch insgesamt für keine der getesteten Wirkstoffkonzentrationen signifikant war. Auffallend war außerdem, dass für alle untersuchten Cetuximab-Konzentrationen nahezu der gleiche Effekt nachgewiesen wurde. Dies stellt ein typisches Sättigungsverhalten für einen Antikörper dar. Wenn die Bindungsstellen für den Antikörper (hier die EGF-Rezeptoren) komplett belegt sind, ist eine weitere Erhöhung der Wirkstoffdosis für die spezifische Wirkung des Antikörpers ohne Bedeutung.

In der Literatur wurden zu zytotoxischen bzw. -statischen Effekten von Cetuximab unterschiedliche Angaben gemacht. Ein Einfluss des Antikörpers auf das Wachstum konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden [90-92]. Teilweise korrelierte die Stärke dieses Effektes mit der EGF-Rezeptor-Expression. So konnte gezeigt werden, dass Tu212-Zellen (Kopf-Hals-Tumor mit sehr hoher EGFR-Expression) sehr stark durch Cetuximab im Wachstum gehemmt wurden, während für A549-Zellen mit niedrigerer EGFR-Expression nur eine moderate Wachstumsverzögerung beobachtet wurde [90]. Für die Bronchialkarzinom-Zelllinien A549, H460 und SW1573 wurde ein vernachlässigbarer bis moderater Effekt beschrieben [91]. Dies deckt sich mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten. Für die Zelllinie FaDu wurde ein dosisabhängiger, zytotoxischer Effekt beschrieben [93], der bei einer Cetuximab-Konzentration von 60 nM eine Reduktion der Zellzahl um mehr als 50 % zeigt. Dies konnte mit den in dieser Arbeit dargestellten Daten nicht reproduziert werden.

4.2 Klonogenes Überleben

Der Koloniebildungstest stellt in der Strahlenbiologie eine Art Goldstandard zur Untersuchung des klonogenen Überlebens von Tumorzellen *in vitro* dar. Die daraus gewonnenen Zellüberlebenskurven sind ein direktes Maß für die Strahlensensibilität der untersuchten Zellen. Insofern bot sich dieser Test gerade deshalb in der vorliegenden Arbeit an, weil die Strahlensensibilität der Tumorzellen im Hinblick

auf synergistische Effekte durch die eingesetzten Wirkstoffe untersucht werden sollte.

4.2.1 Klonogenes Überleben unter Einfluss von Celecoxib

In den Koloniebildungstests zeigten beide Zelllinien bei Behandlung mit Celecoxib und Photonenstrahlung wiederum ein ähnliches Verhalten. Unter den genutzten Bedingungen konnte kein signifikanter strahlensensibilisierender Effekt festgestellt werden. Während dies für die Zelllinie FaDu in der Literatur auch so beschrieben wurde [69], konnten Literaturdaten, die eine Strahlensensibilisierung der A549-Zellen zeigten [69, 70, 94], in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund wurden die Versuchsdurchführungen für die Zelllinie A549 in vielfältiger Weise variiert. Dabei wurde versucht, alle in der Literatur beschriebenen Methoden für die Koloniebildungstests, bei denen ein Effekt für die A549-Zellen unter Einfluss von Celecoxib beobachtet wurde, zu reproduzieren. So wurden sowohl Versuche mit und ohne Ausplattierung der Zellen nach Bestrahlung durchgeführt. Zudem wurden die Wirkstoffkonzentrationen und der Bestrahlungszeitpunkt variiert. Trotzdem ließ sich ein strahlensensibilisierender Effekt in keinem Versuch nachweisen. Allerdings sind auch dazu Daten unter anderem für die Zelllinie A549 publiziert [80], so dass davon ausgegangen werden kann, dass Celecoxib nicht generell eine strahlensensibilisierende Wirkung auf Tumorzellen, insbesondere die Zelllinie A549, ausübt. Zudem wurden in der Literatur die verschiedensten Ursachen für einen solchen strahlensensibilisierenden Effekt diskutiert. Es wurden beispielsweise die Induktion von Apoptose [70], die Beeinflussung des Zellzyklus [70, 94], die Hemmung der DNA-Reparatur [95] und auch Cyclooxygenase-2-unabhängige Wirkungsmechanismen [69] beschrieben. All dies legt den Schluss nahe, dass eine strahlensensibilisierende Wirkung des COX-2-Inhibitors Celecoxib auf Tumorzellen weiterhin kritisch hinterfragt und mit weiteren Untersuchungen belegt werden sollte.

4.2.2 Klonogenes Überleben unter Einfluss von Cetuximab

Im Gegensatz zu Celecoxib lieferte die Behandlung mit Cetuximab hinsichtlich einer Strahlensensibilisierung Ergebnisse, die mit derzeitigen Literaturangaben tendenziell übereinstimmten. Während für die Zelllinie A549 eine Strahlensensibilisierung durch Cetuximab und andere EGFR-Inhibitoren beschrieben wurde [96, 97], konnte dies für die Zelllinie FaDu nicht gezeigt werden [97]. Die Blockierung des EGF-Rezeptors durch Cetuximab führte damit nicht generell zu einer Strahlensensibilisierung. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse unterstützen diese Annahme. Zwar konnte hier keine signifikante Strahlensensibilisierung der Zelllinie A549 durch den Wirkstoff Cetuximab nachgewiesen werden, dennoch lag das Überleben der Zellen unter Einfluss des Wirkstoffes tendenziell unterhalb der unbehandelten Kontrolle. Bei der Zelllinie FaDu zeigten die Messwerte in den Überlebenskurven hingegen eine Tendenz zu einer strahlenprotektiven Wirkung durch den Wirkstoff Cetuximab. Allerdings waren die Varianzen in den unabhängigen Versuchen auch hier so groß, dass die Unterschiede zur Kontrolle ebenfalls nicht signifikant waren. Dennoch werden in der Literatur verschiedene Wirkungsmechanismen diskutiert, die zu einer Strahlensensibilisierung von Tumorzellen durch die Blockierung des EGF-Rezeptors führen sollen [98-101]. Für die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien A549 und FaDu werden dabei im Wesentlichen Prozesse beschrieben, die die Reparaturkapazität der Tumorzellen für subletale Strahlenschäden an der DNA beeinflussen [96, 97].

4.2.3 Klonogenes Überleben unter Einfluss von Celecoxib und Cetuximab

Die Kombination der beiden Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab führte zu einem signifikanten strahlensensibilisierenden Effekt bei den A549-Zellen. Bei den FaDu-Zellen konnte dieser Effekt zwar nicht signifikant gezeigt werden, jedoch lag auch hier das Überleben bei Einsatz der Wirkstoffkombination unterhalb der unbehandelten Kontrolle. Die Tendenz zur Strahlenprotektion, die der Wirkstoff

Cetuximab allein zeigte, konnte mit der Wirkstoffkombination nicht mehr beobachtet werden. In der Literatur gibt es bislang keinerlei Daten zu einer Wirkstoffkombination von Celecoxib und Cetuximab hinsichtlich einer Strahlensensibilisierung für die hier untersuchten Tumorzellen. Jedoch wurde ein synergistischer Effekt für die Kombination von Celecoxib und Gefitinib, einem Tyrosinkinase-Inhibitor des EGF-Rezeptors, für verschiedene Tumorzelllinien gezeigt [70]. Dieser konnte aber nicht für die Zelllinie A549 beobachtet werden [70]. Wie bereits erwähnt, zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch deutlich einen synergistischen Effekt bei Kombination der Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab bei den A549-Zellen. Um auf die Ursachen dieses strahlensensibilisierenden Effektes zu schließen, wurden in einem nichtlinearen Fit nach dem Linear-Quadratischen-Modell an die Messdaten der Überlebenskurve die Parameter α und β bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Parameter bei den A549-Zellen durch die Zugabe der Wirkstoffkombination aus Celecoxib und Cetuximab gegenüber der unbehandelten Kontrolle in etwa verdoppelt wurden. Die Unterschiede zur Kontrolle waren hoch signifikant. Das Verhältnis α/β, welches sich als das Reparaturvermögen der Zellen für subletale Strahlenschäden interpretieren lässt, wurde bei Applikation der Wirkstoffkombination hingegen nicht signifikant beeinflusst. Dies zeigt, dass die nachgewiesene synergistische Wirkung unter Einfluss der Wirkstoffkombination möglicherweise nicht durch einen Effekt auf die Reparaturkapazität der Tumorzellen verursacht wird.

4.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Reparatur von subletalen Strahlenschäden an der DNA ist für das klonogene Überleben von eukaryotischen Zellen essentiell [102]. DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) stellen dabei die für das Überleben biologisch wesentlichste Läsion nach der Einwirkung ionisierender Strahlung dar [103, 104].

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss der Wirkstoffe Celecoxib bzw. Cetuximab, weder allein noch in Kombination, auf die Reparatur solcher DSB nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu publizierten Daten für die Zelllinie A549, welche eine deutliche Erhöhung der Anzahl residueller DSB 24 Stunden nach Bestrahlung unter Einfluss von Celecoxib [69] als auch Cetuximab [105] zeigten. Für die Zelllinie FaDu konnte unter Zugabe von Celecoxib hingegen kein Effekt nachgewiesen werden [69]. Für den Wirkstoff Cetuximab sind hingegen auch für diese Zelllinie Daten publiziert, die einen Einfluss auf die Reparatur von DSB zeigen [106].

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich die beiden untersuchten Tumorzelllinien A549 und FaDu in ihrer Reparaturkapazität für radiogene DSB deutlich unterscheiden. Als Reparaturkapazität wurde hier das Verhältnis der experimentell ermittelten Anzahl von DSB jeweils 2 bzw. 24 Stunden nach Bestrahlung definiert. Während in der Zelllinie A549 in diesem Zeitfenster 75 % der DSB repariert wurden, konnte die Zelllinie FaDu in der gleichen Zeit nicht einmal die Hälfte dieser Schäden beheben. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei den FaDu-Zellen durch nicht-radiogene Einflüsse (z. B. genetische Instabilität) mehr DSB vorkommen als bei den A549-Zellen, wie die Daten der Kontrollansätze ohne Bestrahlung nach 24 Stunden tendenziell zeigen. Allerdings wurden in der Zelllinie FaDu 2 Stunden nach der Bestrahlung auch deutlich weniger DSB gezählt als in der Zelllinie A549. Dies könnte eine bessere Reparaturkapazität für die FaDu-Zellen in diesem kurzen Zeitfenster von der Bestrahlung bis zum ersten Messzeitpunkt nach 2 Stunden bedeuten.

Die Definition der Reparaturkapazität anhand der reinen Anzahl von DSB zu zwei Zeitpunkten ist also problematisch, solange die zeitliche Dynamik der Reparaturprozesse unbekannt ist. Es existieren jedoch Modelle, die Annahmen über die Reparaturkinetik in Tumorzellen zulassen. So werden im Allgemeinen zwei wesentliche Reparaturprozesse für DSB unterschieden: das nicht-homologe End-Joining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) [103, 104, 107]. Das NHEJ repariert DSB mit einer End-zu-End-Verknüpfung der DNA-Bruchenden. Diese Reparatur ist im Allgemeinen nicht fehlerfrei, da das Zusammenfügen der Bruchenden unabhängig von der vorliegenden Sequenz der Basenpaare erfolgt und

daher ein Verlust von genetischer Information wahrscheinlich ist [107, 108]. Die HR nutzt hingegen die genetischen Informationen auf einem Schwester-Chromatid zur fehlerfreien Erneuerung der Bruchstelle [109]. Während Reparaturen mit dem NHEJ im Allgemeinen wenige Stunden nach einer Bestrahlung abgeschlossen sind, ist die HR ein deutlich komplexerer und langwierigerer Prozess. Auch wird nach radiogenen DSB das NHEJ sehr schnell über die Serin-Proteinkinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) induziert. Die HR wird dagegen erst über die Proteinkinase ATR (ataxia telangiectasia Rad3-related) aktiviert, welche vor allem bei einem fehlgeschlagenen Replikationsversuch rekrutiert wird. Die vorliegenden Daten könnten hinsichtlich ihrer Kinetik daher ein Hinweis darauf sein, dass der Anteil der radiogenen Strahlenschäden, die mit der HR repariert werden, in der Zelllinie A549 größer ist als in der Zelllinie FaDu. Die Auswahl des Reparaturprozesses ist jedoch ein hoch komplexer Vorgang und hängt von zahlreichen Faktoren, wie der Aktivierung relevanter Signalwege und nicht zuletzt von der geometrischen Struktur der DNA-Bruchenden ab [107, 108]. Insofern kann mit den in dieser Arbeit dargestellten Daten die Frage nach einem generell bevorzugten Reparaturprozess nicht endgültig beantwortet werden.

4.4 Zellzyklus

Der Zellzyklus von Säugerzellen besteht aus zwei Phasen, der Interphase und der Mitose. Bei Tumorzellen wechseln sich diese Phasen kontinuierlich zyklisch ab. Die Interphase wird wiederum in Unterphasen eingeteilt, die G0-Phase, in der die Zellen ruhen und nicht proliferieren, die G1-Phase, in der die Zellen wachsen und die Replikation der DNA vorbereiten, die Synthese- bzw. S-Phase, in der die DNA repliziert und damit jedes Chromosom dupliziert wird und die G2-Phase, in der die Mitose vorbereitet wird. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, den DNA-Gehalt von Zellen zu messen und damit den Anteil der Zellen zu bestimmen, die sich in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus (G0/G1-Phase, S-Phase oder G2/M-Phase) befinden [110].

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist der Zellzyklus insofern interessant, als dass die zelluläre Strahlensensibilität von der Zellzyklusphase abhängt, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung befinden. So sind Säugerzellen in der G2/M-Phase am strahlenempfindlichsten, während sie in der G1- und S-Phase vergleichsweise strahlenresistent sind. Die höchste Strahlenresistenz besteht in der späten S-Phase [110, 111].

Die Ergebnisse der Zellzyklusmessungen unterschieden sich für die untersuchten Zelllinien deutlich. Dies betraf zunächst die Reaktion auf die alleinige Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy. Während in der Zelllinie A549 eine Arretierung von Zellen in der G2/M-Phase durch die Einwirkung der Strahlung gezeigt werden konnte, war dies in der Zelllinie FaDu unter den gewählten Bedingungen nicht zu beobachten. Dafür schien die Bestrahlung der FaDu-Zellen dazu zu führen, dass 24 bzw. 48 Stunden nach der Bestrahlung vermehrt Zellen von der G1- in die S-Phase eintreten. Dieser Effekt konnte wiederum in der Zelllinie A549 nicht beobachtet werden. In der Konsequenz führten diese Ergebnisse dazu, dass sich der Anteil der Zellen in der S-Phase durch die Bestrahlung in den A549-Zellen verringerte und in den FaDu-Zellen erhöhte. Dieser Unterschied kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass in den untersuchten Zelllinien unterschiedliche Reaktionen auf die Strahleneinwirkung bzw. die strahleninduzierten DNA-Schäden ausgelöst werden. Es sind zahlreiche Mechanismen bekannt, die über die Proteinkinasen ATM und ATR, das Protein p53 und diverse Checkpoint-Proteine in den Zellzyklus eingreifen [112, 113]. So reagieren die Zellen z. B. mit einem Arrest am Übergang von der G1- in die S-Phase, um somit vor der nächsten Synthesephase die Reparatur von DNA-Schäden zu ermöglichen und zu verhindern, dass defekte DNA repliziert wird. Weiterhin ist es möglich, dass Zellen in der G2/M-Phase arretiert werden, um das Durchlaufen der Mitose mit defekter DNA und damit den reproduktiven Zelltod bzw. Chromosomenabberationen (Mutationen) zu verhindern und auch hier eine Reparatur zu ermöglichen. Letzteres konnte bei den A549-Zellen beobachtet werden. Eine Erklärung dafür, dass die Zelllinie FaDu entgegengesetzt auf eine Bestrahlung reagiert, liegt möglicherweise darin, dass diese Zelllinie im Gegensatz zur Zelllinie A549 p53-mutiert ist [114]. Dieses Protein spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus. Zum Einen kann es einen G1-Arrest über die Aktivierung

des Proteins p21 und damit die Hemmung der cyclin-abhängigen Kinase Cyclin-E/CDK2 (cyclin-dependent kinase) auslösen, welche für den G1-S-Übergang essentiell ist. Aber auch eine Hemmung der für den G2-M-Übergang wichtigen CDK1 kann über das Bindeprotein 14-3-3σ durch p53 initiiert werden [112]. Es besteht die Möglichkeit, dass die in den FaDu-Zellen vorhandene p53-Mutation dazu führt, dass diese Signalwege gestört sind.

Der Einfluss der untersuchten Wirkstoffe auf den Zellzyklus soll im Folgenden diskutiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass der Wirkstoff Celecoxib in unbestrahlten Zellen keinen Einfluss auf den Zellzyklus zeigt. Dies wurde für die Zelllinie A549 in der Literatur bereits beschrieben [80]. Bei den bestrahlten Zellen konnte für Celecoxib tendenziell eine moderate zusätzliche Arretierung von Zellen in der G2/M-Phase beobachtet werden. Ein durch die Bestrahlung schon vorhandener G2/M-Arrest in der Zelllinie A549 wurde durch den Wirkstoff leicht verstärkt. In der Zelllinie FaDu war dieser Effekt allerdings kaum ausgeprägt. Dieses Ergebnis deckt sich mit publizierten Daten für Zelllinien mit einer moderaten Überexpression von COX-2, insbesondere für die Zelllinie A549 [94]. Allerdings wurde z. B. für HCT-116-Zellen mit unterschiedlicher COX-2-Expression auch der gegenteilige Effekt beschrieben [115]. So wurde eine Abschwächung des G2/M-Arrests bei bestrahlten Zellen unter dem Einfluss von Celecoxib beobachtet, der für eine strahlensensibilisierende Wirkung verantwortlich gemacht wurde. Andere Arbeiten konnten einen G1-Arrest durch Celecoxib für Mamma-Karzinom-Zellen der Maus [86], Prostata-Karzinom-Zellen der Ratte [87] und drei humanen Gallengang-Karzinom-Zelllinien [116] zeigen. Dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit für die untersuchten Zelllinien nur teilweise beobachten. So war bei den mit Celecoxib behandelten A549-Zellen der Anteil in der G0/G1-Phase gegenüber der bestrahlten Kontrolle nur zum Zeitpunkt 24 h nach Bestrahlung leicht erhöht. Bei der Zelllinie FaDu konnte dies 48 h nach Bestrahlung jedoch deutlich beobachtet werden.

Für den Wirkstoff Cetuximab zeigten die Messdaten bereits ohne Bestrahlung eine Erhöhung des Anteils von Zellen in der G0/G1-Phase. Dieser Effekt war in beiden Zelllinien zu beobachten und bei der Zelllinie FaDu besonders ausgeprägt. Eine solche Wirkung von Cetuximab ist für Prostata-Karzinom-Zellen, Kolorektal-

Karzinom-Zellen und Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereiches beschrieben worden, wobei mit der Inaktivierung des EGF-Rezeptors durch Antikörper eine direkte Herunterregulierung cyclin-abhängiger Kinasen beobachtet wurde [117-120]. Bei der Kombination mit einer Bestrahlung konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich der G2/M-Arrest und der G0/G1-Arrest unabhängig voneinander ausprägen. So ist die Bestrahlung für den G2/M-Arrest verantwortlich, während der Wirkstoff Cetuximab den G0/G1-Arrest bedingt. Dieser Effekt konnte in beiden Zelllinien gezeigt werden und wird auch in der Literatur beschrieben, z. B. für H-520-Zellen (Plattenepithel-Karzinom der Lunge) [99].

Bei Kombination der beiden Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab schienen sich die oben beschriebenen Effekte teilweise zu addieren. Inwieweit sich die Substanzen gegenseitig beeinflussen, konnte mit den vorhandenen Daten allerdings nicht geklärt werden. Insofern kann zwar postuliert werden, dass Celecoxib und Cetuximab in Kombination mit einer Bestrahlung über verschiedene Mechanismen unterschiedlich in den Zellzyklus eingreifen. Cetuximab scheint dabei im Wesentlichen den G0/G1-Arrest zu modulieren, während Celecoxib vor allem bei den A549-Zellen den strahleninduzierten G2/M-Arrest und bei den FaDu-Zellen auch den G0/G1-Arrest beeinflusst. Dennoch ist eine Wechselwirkung der beiden Wirkstoffe möglich, wie sich z. B. ansatzweise in der Abschwächung des strahleninduzierten G2/M-Arrests bei den FaDu-Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung unter der Wirkstoffkombination zeigte. In jedem Fall sorgte die Kombination der Substanzen nach einer Bestrahlung für eine Senkung des Anteils der Zellen in der S-Phase, und zwar unabhängig davon, wie die einzelnen Zelllinien primär auf die Bestrahlung reagierten. Dieser Effekt bei gleichzeitiger Applikation der Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

4.5 Direktive für eine Kombination der Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab

Das Hauptthema der vorliegenden Arbeit war der Einfluss der Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab auf die Strahlensensibilität der Tumorzelllinien A549 und FaDu.

Insofern kann als wichtigstes Ergebnis die signifikante Strahlensensibilisierung der A549-Zellen durch eine Kombination der beiden Substanzen angesehen werden. Dies war jedoch bei den FaDu-Zellen nicht nachweisbar. Mit verschiedenen Methoden wurde versucht, mögliche Ursachen für dieses unterschiedliche Verhalten zu finden. Sowohl in den Untersuchungen zur Reparaturkapazität für DSB als auch in den Zellzyklusanalysen konnten unterschiedliche Reaktionen der beiden Zelllinien auf eine Bestrahlung nachgewiesen werden. So zeigten die Zelllinien eine unterschiedliche zeitliche Dynamik in der DSB-Reparatur, die möglicherweise darauf schließen lässt, dass der Mechanismus der HR in den A549-Zellen ausgeprägter ist als in den FaDu-Zellen. Weiterhin wird der Anteil der Zellen in der S-Phase, in der im Wesentlichen die HR stattfindet, bei den A549-Zellen nach Bestrahlung durch die Wirkstoffkombination viel stärker reduziert, als in der Zelllinie FaDu. Sollte die Zelllinie A549 also unter Zugabe beider Substanzen ihre DSB-Reparatur nach einer Bestrahlung auf das fehlerbehaftete NHEJ umstellen, was so in der Zelllinie FaDu nicht stattfindet, so wäre dies eine mögliche Erklärung für die Strahlensensibilisierung der A549-Zellen durch eine Kombination der Medikamente Celecoxib und Cetuximab.

Um diese These zu untermauern wären im Ausblick weitere Untersuchungen notwendig, die sich mit der Fragestellung nach den Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der Zelllinien im Zellzyklus nach Bestrahlung und unter Zugabe der Wirkstoffe befassen. Hier würden sich z. B. Versuche zum Status des Proteins p53 anbieten, welches bekanntermaßen ein Schlüsselprotein in der Zellzykluskontrolle darstellt und auch aktuell Gegenstand von Untersuchungen zur Strahlensensibilität von Tumorzellen unter dem Einfluss von EGFR-Inhibitoren ist [121]. Zudem ist dieses Protein bei den FaDu-Zellen im Gegensatz zu den A549-Zellen mutiert. Weiterhin wären Experimente sinnvoll, die z. B. mit immunhistochemischen Methoden die Reparaturmechanismen nach Bestrahlung unterscheiden können und damit möglicherweise einen Nachweis für die Umstellung von der HR auf das NHEJ in der Zelllinie A549 erbringen.

Schlussendlich wäre es in jedem Fall interessant, ob sich der in der vorliegenden Arbeit beschriebene strahlensensibilisierende Effekt auch bei *in vivo* Modellen nachweisen lässt. Dies könnte bei positivem Ergebnis eine neue Therapieoption in

der Radioonkologie im Sinne einer Kombinationstherapie von Bestrahlung, COX-2- und EGFR-Inhibitor für maligne Tumore darstellen, die sich durch bestimmte molekularbiologische Eigenschaften (vielleicht p53-Wildtyp) auszeichnen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte von Celecoxib und Cetuximab auf die Tumorzelllinien A549 und FaDu näher charakterisiert werden. Zunächst wurden Experimente zum Zellwachstum und zum klonogenen Überleben der Tumorzellen unter dem Einfluss der Wirkstoffe durchgeführt. Anschließend erfolgten Zellzyklusanalysen und Untersuchungen zur Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen, um Hinweise auf die Wirkungsmechanismen der Substanzen, insbesondere in Kombination mit einer Bestrahlung, zu erhalten.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Das Wachstum beider Tumorzelllinien wurde durch Celecoxib dosisabhängig gehemmt. Cetuximab konnte tendenziell eine Wachstumsverzögerung verursachen, die jedoch unabhängig von der Wirkstoffdosis war.

2. Das klonogene Überleben der FaDu-Zellen nach einer Bestrahlung wurde durch die Wirkstoffe weder bei alleiniger Applikation der Substanzen noch bei ihrer Kombination signifikant beeinflusst. Bei den A549-Zellen konnte weder für Cetuximab noch für Celecoxib allein ein Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit gezeigt werden.

3. Die A549-Zellen reagierten auf eine alleinige Bestrahlung mit einem G2/M-Arrest, FaDu-Zellen mit einem verstärkten Übergang der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase. Der Wirkstoff Celecoxib konnte bei den bestrahlten A549-Zellen den G2/M-Arrest moderat verstärken, in der Zelllinie FaDu einen G0/G1-Arrest verursachen. Cetuximab erzeugte in beiden Zelllinien einen G0/G1-Arrest. Die Kombination der Wirkstoffe führte zu einer Verringerung der Anzahl der S-Phase-Zellen.

4. Durch die Bestrahlung induzierte DNA-Doppelstrangbrüche wurden von den Tumorzellen mit unterschiedlicher zeitlicher Dynamik repariert. Die Wirkstoffe Celecoxib und Cetuximab beeinflussten dieses Reparaturvermögen der Tumorzellen weder allein, noch in Kombination.

5. Für die A549-Zellen war ein synergistischer Effekt hinsichtlich der Strahlensensibilität bei einer kombinierten Anwendung von Celecoxib und Cetuximab zu beobachten. Bei den FaDu-Zellen zeigte sich dieser Einfluss hingegen nur in der Tendenz (nicht signifikant).

Anhand der erhaltenen Ergebnisse erscheint eine weitergehende Untersuchung der Strahlensensibilisierung von A549-Zellen bei einer kombinierten Applikation der Wirkstoffe sinnvoll. Möglicherweise ergeben sich dadurch neue therapeutische Optionen in der Radioonkologie.

Literaturverzeichnis

[1] Goldstraw P, Ball, Jett JR, LeChevalier T, Lim E, Nicholson AG, Shepherd FA, Non-small-cell lung cancer. Lancet 378: 1727-1740 (2011)

[2] Denaro N, Russi EG, Adamo V, Colantonio I, Postoperative therapy in head and neck cancer: state of the art, risk subset, prognosis and unsolved questions. Oncology 81: 21-29 (2011)

[3] Wardman P, Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy. Clin. Oncol. 19: 297-417 (2007)

[4] Niyazi M, Maihoefer C, Krause M, Rödel C, Budach W, Belka C, Radiotherapy and „new“ drugs – new side effects? Radiat. Oncol. 6: 177 (2011) doi:10.1186/1748-717X-6-177

[5] Vane JR, Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat. New Biol. 23: 232-235 (1971)

[6] Otto JC, Smith WL, J. Lipid. Mediat. (1995)

[7] Bolten WW, Scientific rationale for specific inhibition of COX-2. J. Rheumatol. Suppl. 51: 2-7 (1998)

[8] Meyer-Kirchrath J, Schrör K, Cyclooxygenase-2 inhibition and side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the gastrointestinal tract. Curr. Med. Chem. 7: 1121-1129 (2000)

[9] Milas L, Cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme inhibitors and radiotherapy – preclinical basis. Am. J. Clin. Oncol. 26: S66-S69 (2003)

[10] Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC, Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. Nature 384: 644-648 (1996)

[11] Hinz B, Brune K, Spezifische COX-2-Inhibitoren: Perspektiven einer Therapie mit neuen analgetischen und antiinflammatorischen Wirkstoffen. Wien. Klien. Wochenschr. 111: 103-112 (1999)

[12] Frolov RV, Ignatova II, Singh S, Inhibition of hERG potassium channels by Celecoxib and its mechanism. PLoS ONE 6(10): e26344 (2011)

[13] Koki AT, Masferrer JL, Celecoxib: a specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. Cancer Control. 9: 28-35 (2002)

[14] Young JL, Jazaeri AA, Darus DJ, Modesitt SC, Cyclooxygenase-2 in cervical neoplasia: a review. Gynecol. Oncol. 109: 140-145 (2008)

[15] Subbaramaiah K, Telang N, Bansal MB, Weksler BB, Dannenberg AJ, Cyclooxygenase-2 gene expression is upregulated in transformed mammary epithelial cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 29: 179-85 (1997)

[16] Ramsay RG, Friend A, Vizantios Y, Freeman R, Sicurella C, Hammett F, Armes J, Venter D. Cyclooxygenase-2, a colorectal cancer nonsteroidal anti-inflammatory drug target, is regulated by c-MYB. Cancer Res. 60: 1805-1809 (2000)

[17] Nathan CO, Leskov IL, Lin M, Abreo FW, Shi R, Hartman GH, Glass J, COX-2 expression in dysplasia of the head and neck – correlation with elF4E. Cancer 92: 1888-1895 (2001)

[18] Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J,. Kraeft SK, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carrol RS, Black PM, Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS398. Cancer Res. 60: 4926-4931 (2000)

[19] Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF, Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. Cancer Res. 61: 4375-4381 (2001)

[20] Li G, T Yang, Yan J, Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20: 886-90 (2002)

[21] Williams CS, Mann M, DuBois RN, The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Oncogene 18: 7908-7916 (1999)

[22] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K, Antiangiogenic and antitumor activities of Cyclooxygenase-2 inhibitors. Cancer Res. 60: 1306-1311 (2000)

[23] Ashida M, Bito T, Budiyanto A, Ichihashi M, Ueda M, Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinozytes after UVB. Exp. Dermatol. 12: 445-452 (2003)

[24] Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz LO, Sies H, Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxyhenase-2 expression in artificial epidermis. Photochem. Photobiol. Sci. 3: 257-262 (2004)

[25] Choy H, Milas L, Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? J. Natl. Cancer Inst. 95: 1440-1452 (2003)

[26] Kishi K, Petersen S, Petersen C, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ, Milas L, Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. Cancer Res. 60: 1326-1331 (2000)

[27] Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T, Sigiura T, Ogawa M, Takahashi T, Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. Clin. Cancer Res. 6: 2006-2011 (2000)

[28] Petersen C, Petersen S, Milas L, Lang FF, Tofilon PJ, Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. Clin. Cancer Res. 6: 2513-2520 (2000)

[29] Raju U, Nakata E, Yang P, Newman RA, Ang KK, Milas L, In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 54: 886-894 (2002)

[30] Davis TW, Hunter N, Trifan OC, Milas L, Masferrer JL, COX-2 inhibitors as radiosensitizing agents for cancer therapy. Am. J. Clin. Oncol. 26: S58-S61 (2003)

[31] Kardosh A, Blumenthal M, Wang WJ, Chen TC, Schonthal AH, Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. Cancer Biol. Ther. 3: 63-64 (2004)

[32] Nam DH, Park K, Park C, Im YH, Kim MH, Lee S, Hong SC, Shin HJ, Kim JH, Eoh W, McDonnall TJ, Oncol. Rep. 11, 263-268 (2004)

[33] Nakata E, Mason KA, Hunter N, Husain A, Raju U, Liao Z, Ang KK, Milas L, Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 58: 369-375 (2004)

[34] Liao Z, Milas L, Komaki R, Stevens C, Cox JD, Combination of a COX-2 inhibitor with radiotherapy or radiochemotherapy in the treatment of thoracic cancer. Am. J. Clin. Oncol. 26: S85-S91 (2003)

[35] Liao Z, Komaki R, Milas L, Yuan C, Kies M, Chang JY, Jeter M, Guerrero T, Blumenschien G, Smith CM, Fossella F, Brown B, Cox JD, A phase I clinical trial of thoracic radiotherapy and concurrent celecoxib for patients with unfavorable performance status inoperable/unresectable non-small cell lung cancer. Clin. Cancer Res. 11: 3342-3348 (2005)

[36] González-Cortijo L, Carballo N, González-Martin A, Corraliza V, Chiva LM, Sastre FL, García JGF, Sebastián AR, Hornedo J, Colomer R, Novel chemotherapy approaches in chemoradiation protocols. Gynecol. Oncol. 110: S45-S48 (2008)

[37] Malik I, Hussein F, Bush D, Alqaisi M, Bernal P, Byrd J, Garberoglio C, A phase I study of capecitabine, irenotecan, celecoxib, and radiation as neoadjuvant therapy of patients with locally advanced rectal cancer. Am. J. Clin. Oncol. 33: 242-245 (2010)

[38] Groen HJM, Sietsma H, Vincent A, Hochstenbag MMH, van Putten JWG, van den Berg A, Dalesio O, Biesma B, Smit HJM, Termeer A, Hiltermann TJN, van den Borne BEEM, Schramel FMNH, Randomized, placebo-controlled phase III study of docetaxel plus carboplatin with celecoxib and cyclooxygenase-2 expression as a biomarker for patients with advanced non-small-cell lung cancer: the NVALT-4 study. J. Clin. Oncol. 29: 4320-4326 (2011)

[39] Cherukuri DP, Nelson MA, Glioma growth inhibition by selective COX-2 inhibitors via cyclooxygenase independent pathways. Cancer Biol. Ther. 3: 63-64 (2004)

[40] Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G, Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. J. Natl. Cancer Inst. 98: 736-747 (2006)

[41] Kim YM, Shin YK, Jun HJ, Rha SY, Pyo H, Systematic analyses of genes associated with radiosensitizing effect by celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. J. Radiat. Res. 52: 752-765 (2011)

[42] Olayioye M, Neve R, Lane H, Hynes NE, The ErbB signalling network: Receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO J. 19: 3159-3167 (2000)

[43] Yarden Y, Sliwkowski M, Untangling the ErbB signalling network. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 127-137 (2001)

[44] Mendelsohn J, Baselga J, Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. Semin. Oncol. 33: 369-385 (2006)

[45] Brambilla E, Gazdar A, Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. Eur. Respir. J. 33: 1485-1497 (2009)

[46] Alroy I, Yarden Y, The ErbB signalling network in embryogenesis and oncogenesis: Signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Lett. 410: 83-86 (1997)

[47] Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG, Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv. Cancer Res. 74: 49-139 (1998)

[48] Blume-Jensen P, Hunter T, Oncogenic kinase signalling. Nature 411: 355-365 (2001)

[49] Chan T, Rittenhouse SE, Tsichlis PN, AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: Kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. Annu. Rev. Biochem. 68: 965-1014 (1999)

[50] Vivanco I, Sawyers CL, The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. Nat. Rev. Cancer 2: 489-501 (2002)

[51] Mendelsohn J, Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. J. Clin. Oncol. 20: 1s-13s (2002)

[52] Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G, The biological properties of cetuximab. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 68: 93-106 (2008)

[53] Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, Mendelsohn J, Growth stimulation of A431 cells by EGF: identification of high affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1337-1341 (1983)

[54] Sato JD, Kawamoto T, Le AD, Mendelsohn J, Polikoff J, Sato GH, Biological effect in vitro of monoclonal antibodies to human EGF-receptors. Mol. Biol. Med. 1: 511-529 (1983)

[55] Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, Le A, Sato JD, Masui H, McLeod C, Mendelsohn J, Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. J. Biol. Chem. 259: 7755-7760 (1984)

[56] Herbst RS, Shin DM, Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. Cancer 94: 1593-1611 (2002)

[57] Lurje G, Lenz HJ, EGFR signalling and drug discovery. Oncology 77: 400-410 (2009)

[58] Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J, Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. Clin. Cancer Res. 1: 1311-1318 (1995)

[59] Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O, Galluzzo S, Cetuximab: from bench to bedside. Curr. Cancer Drug Targets 10: 80-95 (2010)

[60] Milas L Fan Z, Andratschke NH, Ang KK, Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 58: 966-971 (2004)

[61] Nieder C, Pawinski A, Dalhaug A, Andtratschke N, A review of clinical trials of cetuximab combined with radiotherapy for non-small cell lung cancer. Radiat. Oncol. 7: 3 (2012) doi:10.1186/1748-717X-7-3

[62] Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer P Sj., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ, Phase II Trial of cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. 22: 1201-8 (2004)

[63] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E, Cetuximab monotherapy and Cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 351: 337-345 (2004)

[64] Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N. Engl. J. Med. 354: 567-578 (2006)

[65] BaselgaJ, Trigo JM, Bourhis J, Tortochaux J, Cortés-Funes H, Hitt R, Gascón P, Amellal N, Harstrick A, Eckardt A, Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody Cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. J. Clin. Oncol. 23: 5568-5577 (2005)

[66] Banerjee S, Flores-Rosaz H, Monoclonal antibodies for targeted therapy in colorectal cancer. Cancer Biol. Ther. 9, 563-571 (2010)

[67] Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelsen DP, Saltz LB, Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. J. Clin. Oncol. 23, 1803-1810 (2005)

[68] Vincenzi B, Santini D, Tonini G, New issues on Cetuximab mechanism of action in epidermal growth factor receptor-negative colorectal cancer: the role of vascular endothelial growth factor. J. Clin. Oncol. 24, 1957 (2006)

[69] Dittmann KH, Mayer C, Ohneseit PA, Raju U, Andratschke NH, Milas L, Rodemann HP, Celecoxib induced tumor cell radiosensitization by inhibiting radiation induced nuclear EGFR transport and DNA-repair: a Cox-2 independent mechanism. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 70: 203-212 (2008)

[70] Park JS, Jun HJ, Cho MJ, Cho KH, Lee JS, Zo JI, Pyo H, Radiosensitivity enhancement by combined treatment of celecoxib and gefitinib on human lung cancer cells. Clin. Cancer Res. 12: 4989-4999 (2006)

[71] Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN, Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacological targets for chemoprevention. J. Clin. Oncol. 23: 254-266 (2005)

[72] Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Inoue H, Dannenberg AJ, Retinoids suppress epidermal growth factor-induced transition of cyclooxygenase-2 in human oral squamous carcinoma cells. Cancer Res. 57: 2890-2895 (1997)

[73] Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS, Prostaglandin E2 trannsactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. Nat. Med. 8: 289-293 (2002)

[74] Buchanan FG, Wang D, Bargiacchi F, DuBois RN, Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 278: 35451-35457 (2003)

[75] Kim YM, Park SY, Pyo H, Cyclooxygenase-2 (COX-2) negatively regulates expression of epidermal growth factor receptor and causes resistance to gefitinib in COX-2-overexpressing cancer cells. Mol. Cancer Res. 7: 1367-1377 (2009)

[76] Douglas BG, Fowler JF, The effect of multiple small doses of Xrays on skin reactions in the mouse and a basic interpretation. Radiat. Res. 66: 401-426 (1976)

[77] Dale RG, The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. Br. J. Radiol. 58: 515-528 (1985)

[78] Fowler JF, The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. Br. J. Radiol. 62: 679-694 (1989)

[79] Brenner DJ, Hlatky LR, Hahnfeldt PJ, Huang Y, Sachs RK, The linear-quadratic model and most other common radiobiological models result in similar predictions of time-dose relationships. Radiat. Res. 150: 83-91 (1998)

[80] Liu W, Chen Y, Wang W, Keng P, Finkelstein J, Hu D, Liang L, Guo M, Fenton B, Okunieff P, Ding I, Combination of radiation and Celebrex (Celecoxib) reduce mammary and lung tumor growth. Am. J. Clin. Oncol. (CCT) 26 (4 Suppl 2): 103-109 (2003)

[81] LiuB, Wen JK, Li BH, Fang XM, Wang JJ, Zhang YP, Shi CJ, Zhang DQ, Han M, Celecoxib and acetylbritannilactone interact synergistically to suppress breast cancer cell growth via COX-2-dependent and -independent mechanisms. Cell death and disease 2: e185 (2011) doi:10.1038/cddis.2011.64

[82] Sun SY, Schroeder CP, Yue P, Lotan D, Hong WK, Lotan R, Enhanced growth inhibition and apoptosis induction in NSCLC cell lines by combination of Celecoxib and 4HPR at clinically relevant concentrations. Cancer Biol. Ther. 4: 407-413 (2005)

[83] Chen ZG, Zhang X, Li M, Wang Z, Wieand HS, Grandis JR, Shin DM, Simultaneously targeting epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and cyclooxygenase-2, an efficient approach to inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin. Cancer Res. 10: 5930-5939 (2004)

[84] Kundu N, Smyth MJ, Samsel L, Fulton AM, Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. Breast Cancer Res. Treat. 76: 57-64 (2002)

[85] Narayanan BA, Condon MS, Bosland MC, Narayanan NK, BS Reddy, Suppression of N-methyl-N-nitrosourea/testosterone-induced rat prostate cancer growth by Celecoxib: effects on cyclooxygenase-2, cell cycle regulation and apoptosis mechanism(s). Clin. Cancer Res. 9: 3503-3513 (2003)

[86] Williams CS, Watson AJM, Sheng H, Helou R, Shao J, DuBois RN, Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models, Cancer Res. 60: 6045-6051 (2000)

[87] Qiu R, Chen J, Sima J, Shen X, Liu D, ShenJ, NS398 induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 138: 119-124 (2012)

[88] Klenke FM, Gebhard MM, Ewerbeck V, Abdollahi A, Huber PE, Sckell A, The selective COX-2 inhibitor Celecoxib suppresses angiogenesis and growth of secondary bone tumors: an intravital microscopy study in mice. BMC Cancer 6: 9 (2006) doi:10.1186/1471-2407-6-9

[89] Schiffmann S, Maier TJ, Wobst I, Janssen A, Corban-Wilhelm H, Angioni C, Geisslinger G, Grösch S, The anti-proliferative potency of Celecoxib is not a class effect of coxibs. Biochem. Pharmacol. 76: 179-187 (2008)

[90] Zhang H, Yun S, Batuwangala TD, Steward M, Holmes SD, Pan L, Tighiouart M, Shin HJC, Koenig L, Park W, Rycroft D, Nannapaneni S, Wang Y, Chen Z, Shin DM, A dual-targeting antibody against EGFR-VEGF for lung and head and neck cancer treatment. Int. J. Cancer (2011) doi: 10.1002/ijc.26427

[91] Xu F, Tian Y, Huang Y, Zhang LL, Gou ZZ, Huang JJ, Lin TY, EGFR inhibitors sensitize non-small cell lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. Chin. J. Cancer 30: 701-711 (2011)

[92] Morelli MP, Cascone T, Troiani T, Tuccillo C, Bianco R, Normanno N, Romano M, Veneziani BM, Fontanini G, Eckhardt SG, De Pacido S, Tortora G, Ciardiello F, Anti-tumor activity of the combination of cetuximab, an anti-EGFR blocking monoclonal antibody and ZD6474, an inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinases. J. Cell. Physiol. 208: 344-353 (2006)

[93] Chen CC, Chen WC, Lu CH, Wang WW, Lin PY, Lee KD, Chen MF, Significance of interleukin-6 signaling in the resistance of pharyngeal cancer to irradiation and the epidermal growth factor receptor inhibitor. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 76: 1214-1224 (2010)

[94] Shin YK, Park JS, Kim HS, Jun HJ, Kim GE, Suh CO, Yun YS, Pyo H, Radiosensitivity enhancement by celecoxib, a cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor, via COX-2-dependent cell cycle regulation on human cancer cells expressing differential COX-2 levels. Cancer Res. 65: 9501-9509 (2005)

[95] Raju U, Ariga H, Dittmann K, Nakata E, Ang KK, Milas L, Inhibition of DNA repair as a mechanism enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 63: 520-528 (2005)

[96] Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP, Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. Radiother. Oncol. 76: 157-161 (2005)

[97] Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, Wang S, Chen J, DittmannK, Baumann M, Dikomey E, Rodemann HP, Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-ras mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. Clin. Cancer Res. 12: 4119-4126 (2006)

[98] Ochs JS, Rationale and clinical basis for combining gefitinib (Iressa, ZD1839) with radiation therapy for solid tumors. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 58: 941-949 (2004)

[99] Zhang Y, Wang J, Liu F, You Z, Yang R, Zhao Y, EGFR inhibitor C225 increases the radiosensitivity of human lung squamous cancer cells. Cancer Cell Int. 10: 39 (2010) doi:10.1186/1475-2867-10-39

[100] Karar J, Maity A, Modulating the tumor microenvironment to increase radiation responsiveness. Cancer Biol. Ther. 8: 1994-2001 (2009)

[101] Sartor CI, Mechanisms of Disease: radiosensitisation by epidermal growth factor receptor inhibitors. Nat. Clin. Pract. Oncol. 1: 80-87 (2004)

[102] Aziz K, Nowsheen S, Pantelias G, Iliakis G, Gorgoulis VG, Georgakilas AG, Targeting DNA damage and repair: embracing the pharmacological era for successful cancer therapy. Pharmacol. Ther. 133: 334-350 (2012)

[103] Jeggo PA, Geuting V, Löbrich M, The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. Radiother. Oncol. 101: 7-12 (2011)

[104] Shrivastav M, de Haro LP, Nickoloff JA, Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. Cell Res. 18: 134-147 (2008)

[105] Kriegs M, Kasten-Pisula U, Rieckmann T, Holst K, Saker J, Dahm-Daphi J, Dikomey E, The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. DNA Repair 9: 889-897 (2010)

[106] Nowsheen S, Bonner JA, LoBuglio AF, Trummel H, Whitley AC, Dobelbower MC, Yang ES, Cetuximab augments cytotoxicity with Poly (ADP-Ribose) Polymerase inhibition in head and neck cancer. PLoS One 6(8) (2011), doi:10.1371/journal.pone.0024148

[107] Wyman C, Knaar R, DNA double-strand break repair: all's well that ends well. Annu. Rev. Genet. 40: 363-386 (2006)

[108] O'Driscoll M, Jeggo PA, The role of double-strand break repair – insights from human genetics. Nat. Rev. Genet. 7: 45-54 (2006)

[109] Wyman C, Ristic D, Kanaar R, Homologous recombination-mediated double-strand break repair. DNA Repair 3: 827-833 (2004)

[110] Hall EJ, Giaccia AJ, Radiobiology for the radiologist. Chapter 4: Radiosensitivity and cell age in the mitotic cycle. 6th ed. 47-59 (2006)

[111] Fritz-Niggli H, Klinische Strahlenbiologie. Schweiz. Med. Wochenschr. Suppl. 25: 76-84 (1988)

[112] Pawlik TM, Keyomarsi K, Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 59: 928-942 (2004)

[113] Wilson GD, Radiation and cell cycle, revisited. Cancer Metastasis Rev. 23: 209-225 (2004)

[114] Kim MS, Li SL, Bertolami CN, Cherrick HM, Park NH, State of p53, Rb, DCC tumor suppressor genes in human oral cancer cell lines. Anticancer Res. 13: 1405-13 (1993)

[115] Jun HJ, Kim JM, Park SY, Park JS, Lee EJ, Choi SA, Pyo H, Modulation of ionizing radiation-induced G2 arrest by cyclooxygenase-2 and its inhibitor celecoxib. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 75: 225-234 (2009)

[116] Han C, Leng J, Demetris AJ, Wu T, Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. Cancer Res. 64: 1369-1376 (2004)

[117] Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J, Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. J. Clin. Invest. 95: 1897-1905 (1995)

[118] Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J, Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. Cancer Res. 56: 3666-3669 (1996)

[119] Wu X, Rubin M, Fan Z, DeBlasio T, Soos T, Koff A, Mendelsohn J, Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. Oncogene 12: 1397-1403 (1996)

[120] Kiyota A, Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Ueyama Y, Matsumura T, Tachikawa T, Wong DT, Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 upregulates p27(KIP1) and p15(INK4B) and induces G1 arrest in oral squamous carcinoma cell lines. Oncology 63: 92-98 (2002)

[121] Huang S, Benavente S, Armstrong EA, Li C, Wheeler DL, Harari PM, p53 modulates aquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. Cancer Res. 71: 7071-7079 (2011)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet oder an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung beantragt habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Rostock, 03. November 2012

Stephan Kriesen

Danksagung

Sehr viele Menschen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihnen allen schulde ich dafür Dank. Dennoch möchte ich einige Personen besonders hervorheben.

Herrn Prof. Dr. Rainer Fietkau möchte ich dafür danken, dass er mir eine Einarbeitung in die Strahlenbiologie vorgeschlagen und ermöglicht hat.

Frau Barbara Neitz danke ich für das geduldige Vermitteln der zellbiologischen Labormethodik.

Bei Herrn Prof. Dr. Guido Hildebrandt bedanke ich mich für die Vergabe des Themas und die hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterhin danke Frau Dr. Annegret Dörfler für die zahlreichen Hinweise und Ratschläge zur Arbeit mit den verwendeten Zelllinien und Wirkstoffen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Katrin Manda, die diese Arbeit mit viel Enthusiasmus und Kreativität betreut hat. Ohne ihre aufmunternden und manchmal auch strengen Worte wäre eine Fertigstellung dieser Arbeit kaum möglich gewesen.

Mein Dank richtet sich ebenfalls an die Mitarbeiter des Strahlenbiologischen Labors der Klinik für Strahlentherapie für deren helfende Hände und die vielen anregenden Diskussionen.

Schlussendlich geht mein größter Dank an meine liebe Frau Ursula, die mir die nötige Zeit verschafft hat und mir vor allem über meine Zweifel hinweghelfen konnte.