

**Aus der**  
**Universitätsmedizin Rostock**  
**Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie**

Direktor: Professor Dr. med. Guido Hildebrandt

Weiterführende Untersuchungen zur kombinierten  
Wirkung von Panitumumab und ionisierender Strahlung  
auf Tumorzellen

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
Aina Jannermann,  
aus Hamburg  
geb. am 04.03.1989 in Rostock

Rostock, 2014

Dekan: Prof. Dr. Emil Christian Reisinger

**Datum der Einreichung: 19.09.2014**

**Datum der Verteidigung: 24.02.2015**

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Hildebrandt  
Universitätsmedizin Rostock  
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
2. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Vollmar  
Universitätsmedizin Rostock  
Institut für Experimentelle Chirurgie  
Zentrale Versuchstierhaltung
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. F. Rödel  
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Klinik für Strahlentherapie und Onkologie

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 TUMORERKRANKUNGEN.....	1
1.2 THERAPIE VON TUMORERKRANKUNGEN .....	1
1.2.1 Radiotherapie.....	2
1.2.2 Antikörper-Therapie.....	2
1.3 DER EGF-REZEPTOR ALS TARGET IN DER TUMORTHERAPIE .....	2
1.4 SIGNALWEITERLEITUNG DURCH DEN EGF-REZEPTOR.....	3
1.5 PANITUMUMAB.....	4
1.5.1 KRAS-Status.....	5
1.6 GRUNDLAGEN DER STRAHLENBIOLOGIE .....	6
1.7 DER ZELLYKLUS .....	7
1.8 ZIELSTELLUNG .....	8
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>10</b>
2.1 TUMORZELLEN .....	10
2.2 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN.....	11
2.2.1 Ausfrieren der kryokonservierten Zellen.....	11
2.2.2 Zellkultivierung .....	11
2.2.3 Zellzahlbestimmung.....	12
2.3 WIRKSTOFFE .....	12
2.3.1 Panitumumab .....	12
2.3.2 Sorafenib .....	12
2.3.3 Nocodazol.....	12
2.4 BESTRAHLUNG DER ZELLEN.....	13
2.5 WACHSTUMSKURVEN.....	13
2.5.1 Allgemeine Durchführung .....	14
2.5.2 Wachstumsverhalten unter Einfluss von Panitumumab .....	14
2.6 ZELLYKLUSANALYSEN .....	14
2.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie.....	14
2.6.2 Versuchsaufbau.....	15
2.7 APOPTOSE-NEKROSE-MESSUNGEN .....	17
2.7.1 Versuchsaufbau.....	17
2.7.2 Auswertung.....	19
2.8 WESTERN BLOT ANALYSEN .....	19
2.8.1 Prinzip des Western Blots.....	19
2.8.2 Zelleinsaat und Bestrahlung.....	20
2.8.3 Lysatherstellung .....	20
2.8.4 Proteinbestimmung mittels Bradford-Test .....	21
2.8.5 Gelelektrophorese .....	21
2.8.6 Blotten .....	22
2.8.7 Farbreaktion .....	23
2.8.8 Auswertung.....	23
2.9 GERÄTE UND MATERIALIEN .....	23
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
3.1 WACHSTUMSKURVEN.....	27
3.1.1 Wachstumskurven der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab.....	27
3.1.2 Wachstumskurven der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab.....	29

3.1.3	Wachstumskurven der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und Sorafenib .....	30
3.2	ZELLZYKLUSANALYSEN .....	32
3.2.1	Zellfixierung 12 Stunden nach Bestrahlung .....	32
3.2.2	Zellfixierung 24 Stunden nach Bestrahlung .....	34
3.2.3	Zellfixierung 48 Stunden nach Bestrahlung .....	35
3.3	APOPTOSE-NEKROSE MESSUNGEN .....	36
3.4	WESTERN BLOT ANALYSEN .....	38
3.4.1	Expression von EGFR .....	38
3.4.2	Expression von Stat-1 .....	39
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>41</b>
4.1	WACHSTUM DER ZELLEN .....	41
4.1.1	Natives Wachstum der A549-Zellen und der HT-29-Zellen .....	41
4.1.2	Wachstum der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab .....	42
4.1.3	Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab .....	43
4.1.4	Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und Sorafenib .....	44
4.2	ZELLZYKLUS DER A549-ZELLEN .....	45
4.3	APOPTOSE-NEKROSE-INDUKTION UNTER EINFLUSS VON PANITUMUMAB .....	46
4.4	EXPRESSIONSANALYSEN DER A549-ZELLEN .....	48
4.4.1	Expression von EGFR .....	48
4.4.2	Expression von Stat-1 .....	49
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>A</b>
6.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	A
6.2	TABELLENVERZEICHNIS .....	B

## LITERATURVERZEICHNIS

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
A. bidest.	Aqua bidestillata
ABX-EGF	Panitumumab
AKT	Gruppe von Genen bzw. Enzymen der Proteinkinase B
BP	Bindepuffer
BRAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma, Isoform B
CD	Cluster of Differentiation
C-Met	Proto-Onkogen, welches für Hepatocyte growth factor receptor (HGFR) kodiert
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	Doppelstrang-RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ErbB	Synonym für HER (human epidermal receptor)
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FOLFIRI	Therapieschema zur adjuvanten Chemotherapie bestehend aus Folinsäure, Fluoruracil und Irinotecan
FOLFOX	Therapieschema zur adjuvanten Chemotherapie bestehend aus Oxaliplatin, Folinsäure und Fluoruracil
FSC	Forward scatter
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
Hb-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	Human epidermal receptor
HRP	Horse radish peroxidase
IGFR	Insulin-like growth factor receptor

IgG	Immunglobulin G
JAK	Januskinase
keV	Kiloelektronenvolt
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
LET	Linearer Energietransfer
mAb	Monoclonal Antibody
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Synonym für MAPK
MeV	Megaelektronenvolt
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MW	Mittelwert
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
nEGFR	Nuclear EGFR
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nM	Nanomolar
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMT	Photomultiplier
P/S	Penicillin/Streptomycin
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleinsäure
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SISH	Silber- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
SL	Stammlösung
SSC	Side scatter
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBS	Tris buffered saline
T/E	Trypsin/EDTA
TGF-α	Transforming growth factor alpha
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TTBS	Tris-Tween buffered saline
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
ZKS	Zellkulturschale

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorerkrankungen

Maligne Tumorerkrankungen sind nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache bei Frauen und Männern in Deutschland (GESUNDHEITSBERICHTERSTATTUNG DES BUNDES, 2008). Dabei ist das Prostatakarzinom der häufigste Tumor des Mannes und das Mammakarzinom der häufigste Tumor der Frau (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2012).

Kolorektale Karzinome sind die zweithäufigsten Tumoren in Deutschland und bilden gleichzeitig die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern bzw. die dritthäufigste bei Frauen (KAATSCH *et al.*, 2013). Risikofaktoren für eine Erkrankung an Darmkrebs sind ein hohes Lebensalter (Erkrankungsgipfel  $> 70$ . Lebensjahr), sowie Bewegungsmangel, Übergewicht und fettreiche Ernährung (ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN, 2012). Zu den genetischen Risikofaktoren gehören die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa (LOHR *et al.*, 2007).

Die dritthäufigste Krebserkrankung der Männer und Frauen bildet die Gruppe der Bronchialkarzinome, wobei insgesamt prozentual mehr Männer betroffen sind. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren und als stärkster Risikofaktor gilt der Nikotinabusus (ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN, 2012).

In Anbetracht der hohen Inzidenzraten der genannten Tumorerkrankungen und der zum Teil schlechten Prognosen liegt es im Interesse der Forschung und der Patienten, bestmögliche Therapien zu entwickeln.

## 1.2 Therapie von Tumorerkrankungen

Bei der Therapie von malignen Tumorerkrankungen wird generell zwischen der kurativen, heilenden und palliativen, unterstützenden Therapie unterschieden. Bei der Entscheidungsfindung der passenden Therapie spielen Tumorentität, Lokalisation und Ausdehnung, sowie der allgemeine Gesundheitszustand eines Patienten wichtige Rollen. Zu den möglichen Herangehensweisen in der Tumorthherapie gehören operative Verfahren, Hormon-, Antikörper- und Chemotherapie, sowie die Strahlentherapie. Darüber hinaus sind Kombinationen von Therapieansätzen möglich und bei vielen Tumorentitäten mittlerweile Standard.

In einer palliativen Situation wird versucht, Patienten mit infauster Prognose bestmöglich zu unterstützen und die Symptome und Folgen einer Tumorerkrankung zu lindern. Wichtig sind

neben der Schmerztherapie und psychologischen Betreuung Verfahren wie Chemo- und Strahlentherapie.

### *1.2.1 Radiotherapie*

Die Strahlentherapie bildet eine wichtige Säule der onkologischen Behandlungsmethoden. Ausschlaggebend für die Indikationsstellung sind neben den unter 1.2 genannten Punkten u. a. die Strahlensensibilität eines Tumors sowie die Strahlentoleranz der anatomischen Umgebungsstrukturen. Als hoch strahlensensibel gelten z. B. lymphatische Leukämien und maligne Lymphome. Hingegen sind Chondrosarkome und Glioblastome eher strahlenresistent (SAUER, 2010). Strahlenbiologischen Grundlagen werden in Kap. 1.6 näher erläutert.

Radiotherapie kann in unterschiedlichen Regimen angewendet werden. Bei der simultanen Radiochemotherapie z. B. werden ausgewählte Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung simultan, d.h. parallel, verabreicht mit dem Ziel, eine synergistische Wirkung beider Therapien im Tumorgewebe zu bewirken. Weiterhin besteht die Möglichkeit, Chemo- und Strahlentherapie im Wechsel (alternierend) oder vor bzw. nach einer Operation einzusetzen (neoadjuvant bzw. adjuvant). Die simultane Radiochemotherapie gilt derzeit als am erfolgversprechendsten (SAUER, 2010) und wird in dieser Arbeit in experimenteller Form eingesetzt.

### *1.2.2 Antikörper-Therapie*

Die Therapie von Tumoren mittels Antikörpern stellt im weitesten Sinne, wie die Chemotherapie, eine systemische Therapie dar, die Zellen des ganzen Körpers betrifft. Die spezifisch auf ein Antigen ausgerichteten Antikörper, die zunächst murine Anteile trugen, bereiteten den Patienten noch erhebliche Nebenwirkung, weil das Medikament selbst als körperfremd erkannt wird. Durch die Entwicklung humaner monoklonaler Antikörper, welche keine Mausbestandteile mehr besitzen, konnte die Verträglichkeit der Medikamente deutlich verbessert werden.

Die Zielstrukturen der Antikörper sind unterschiedlicher Natur. Dazu gehören u. a. Oberflächenmerkmale von Zellen (Cluster of Differentiation, CD), Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , sowie membranständige Rezeptoren.

## 1.3 Der EGF-Rezeptor als Target in der Tumorthherapie

Für das gezielte Angreifen am Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (engl. Epidermal growth factor receptor; EGFR) als Anwendung in der Anti-Tumorthherapie bestehen mehrere Gründe.



Für viele humane epitheliale Tumorentitäten wurde eine Überexpression von EGFR beschrieben (CARTENI *et al.*, 2007). Außerdem scheint die gesteigerte Expression des Rezeptors mit einer schlechteren klinischen Prognose der Erkrankung einherzugehen. Weiterhin gibt es die Meinung, dass die Überexpression des EGFR mit einer gesteigerten Ligandenproduktion in derselben Tumorzelle korreliert und es so zu einer autokrinen Stimulierung kommt (CARTENI *et al.*, 2007). Eine Möglichkeit, den EGFR zu blockieren, besteht mit den intrazellulär wirkenden Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z. B. Gefitinib. Des Weiteren können monoklonale Antikörper extrazellulär an den Rezeptor binden und ihn inaktivieren. Neben Panitumumab gehört zu dieser Gruppe auch der chimäre Antikörper Cetuximab (Erbitux<sup>®</sup>).

### 1.4 Signalweiterleitung durch den EGF-Rezeptor

Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ist ein transmembraner Tyrosinkinase-Rezeptor, der in den meisten epithelialen Geweben vorkommt (KRIEKEN *et al.*, 2008). Der EGF-Rezeptor gehört zur Familie der humanen epidermalen Rezeptoren (HER), welche aus vier strukturverwandten Proteinen besteht: EGFR (HER1/ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4; KRIEKEN *et al.*, 2008). Bindet einer der zahlreichen Liganden (z. B. EGF, TGF- $\alpha$ , Amphiregulin) an EGFR, bilden sich Homo- bzw. Heterodimere aus und es kommt zur Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasen (RUDE VOLDBORG *et al.*, 1997; Abb. 1).

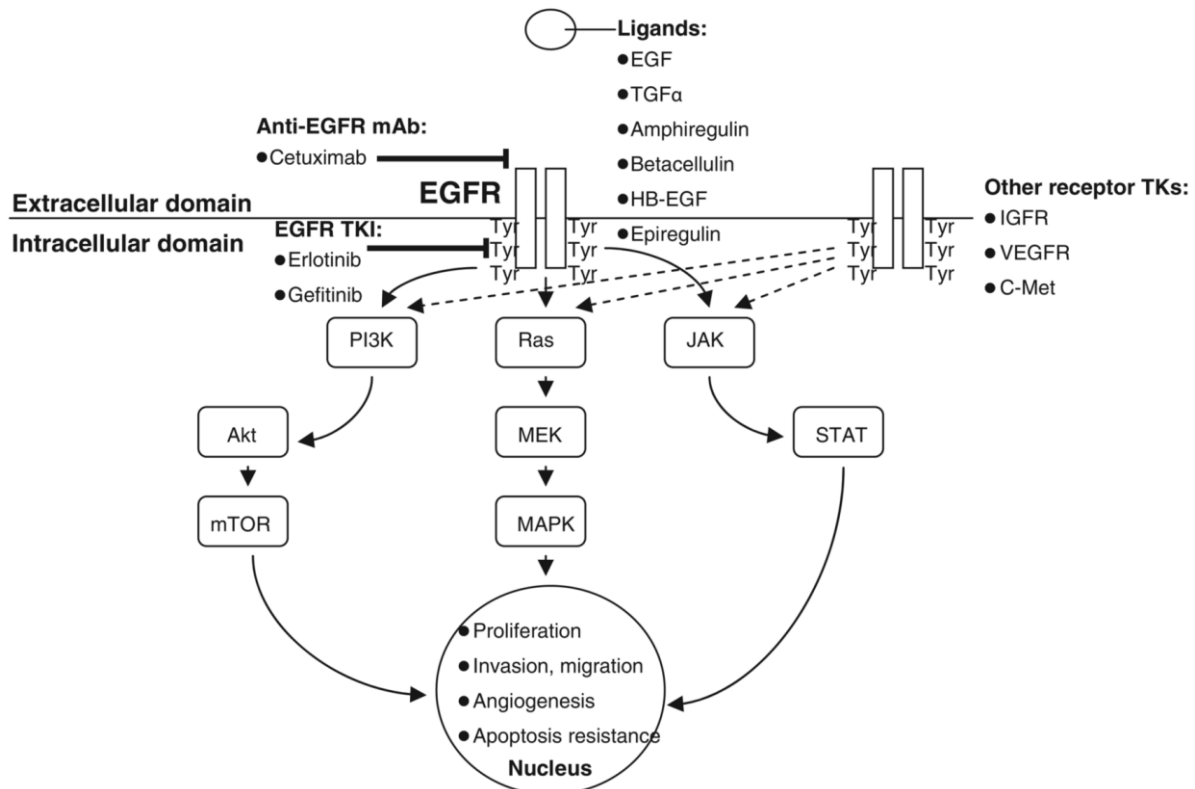


Abb. 1: Signalweiterleitung durch den EGFR und therapeutische Angriffspunkte; aus (GERBER, 2008).

Nachfolgend werden drei Hauptsignalwege im Zellinneren unterschieden (LURJE *et al.*, 2009): Der Ras-Raf-MAPK-(mitogenaktivierende Proteinkinase)-Signalweg ist für die intranukleäre Regulation von Transkriptionsfaktoren zuständig, die für die Zellmigration und -proliferation wichtig sind. Ein weiterer Signalweg, der vom EGFR ausgeht, ist der PI3K/Akt-(Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Signalweg. Durch diesen werden u. a. Zellwachstum, Apoptose und Tumorwachstum gesteuert. Die dritte große Signalkaskade wird durch Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) vermittelt. Die Familie der STAT-Proteine entspricht cytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren, die auf eine Reihe von Mechanismen Einfluss nehmen. So spielt STAT-1 sowohl in der Regulation von Zellproliferation und Zelltod sowie bei der Antwort und Modulierung von inflammatorischen Reizen eine wichtige Rolle (KIM *et al.*, 2007; HAN *et al.*, 2012a). Die Aktivierung von EGFR steigert somit Prozesse des Tumorwachstums, der Angiogenese, der Tumordinvasion, sowie der Hemmung von Apoptose (BASELGA, 2002).

EGFR ist damit in den letzten Jahren immer mehr zu einem wirksamen Ziel der Antitumortherapie geworden. Monoklonale Antikörper, die spezifisch gegen EGFR gerichtet sind, bieten neue Möglichkeiten, in das Tumorwachstum einzugreifen und Patienten auf gut verträgliche Weise eine Therapie zu ermöglichen.

### 1.5 Panitumumab

Panitumumab (ABX-EGF) ist der erste, vollständig humane, monoklonale Antikörper der Klasse IgG2 gegen den EGF-Rezeptor, welcher auch unter dem Handelsnamen Vectibix<sup>®</sup> bekannt ist. Dieser Antikörper richtet sich gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors und hemmt kompetitiv die Rezeptor-Autophosphorylierung und damit die Signalweiterleitung ins Zellinnere. Mit einer Dissoziationskonstanten von  $K_D = 5 \times 10^{-11}$  M hat Panitumumab eine hohe Affinität zu EGFR (YANG *et al.*, 1999).

Seit 2007 ist Panitumumab als Monotherapie bei Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen bei nicht-mutiertem *KRAS*-Gen (humanes Homolog des Kirsten rat sarcoma-2 Virus Onkogen) zugelassen, wenn die herkömmliche Chemotherapie mit Fluoropyrimidin, Oxaliplatin und Irinotecan versagt hat. Hinzugekommen ist nun auch die Zulassung in der Erstlinientherapie in Kombination mit einem Therapieschema zur adjuvanten Chemotherapie bestehend aus Oxaliplatin, Folinsäure und Fluoruracil (FOLFOX) und in der Zweitlinientherapie zusammen mit einer kombinierten adjuvanten Chemotherapie bestehend aus Folinsäure, Fluoruracil und Irinotecan (FOLFIRI) bei Patienten, die in der

Erstlinientherapie Fluoropyrimidin-haltige Chemotherapie erhalten haben (EUROPÄISCHE ARZNEIMITTELAGENTUR, 2013).

In mehreren randomisierten Phase-3-Studien wurde gezeigt, dass Panitumumab in Kombination mit Chemotherapie sowohl in der „first-line“- als auch in der „second-line“-Therapie das progressionsfreie Überleben signifikant verlängern kann, vorausgesetzt es liegt ein *KRAS*-Wildtyp vor (PEETERS *et al.*, 2010; DOUILLARD *et al.*, 2010). Aber auch als Monotherapie zeigte Panitumumab bei Wildtyp-*KRAS*-Tumoren ein verlängertes progressionsfreies Überleben und ein längeres allgemeines Überleben (AMADO *et al.*, 2008). Jedoch ist hinzuzufügen, dass nur ein Teil der Wildtyp-*KRAS*-Tumoren auf eine Therapie mit Panitumumab ansprach (AMADO *et al.*, 2008). Das bedeutet, dass nur 30 - 40 % der Patienten, die auf eine solche Therapie nicht ansprachen, eine *KRAS*-Mutation trugen (SARTORE-BIANCHI *et al.*, 2009). Daraus lässt sich schließen, dass es noch weitere Mechanismen der Resistenz gegenüber monoklonalen Antikörpern wie Panitumumab geben muss.

Als häufigste Nebenwirkung bei der Therapie mit Panitumumab wurde in Phase-III-Studien ein Hautausschlag beobachtet, der in Korrelation zum Ansprechen der Therapie auftrat (DOUILLARD *et al.*, 2010; POTTHOFF *et al.*, 2011).

### 1.5.1 *KRAS*-Status

Wie bereits angedeutet, ist der *KRAS*-Gen-Status der Tumoren der Patienten hinweisend auf die Prognose einer Therapie mit Panitumumab. Deswegen werden Proben der Patienten in der klinischen Anwendung vor Beginn der Therapie daraufhin mittels Real-Time-PCR untersucht. *KRAS* ist ein kleines Guanosintriphosphat-(GTP)-bindendes Protein, welches in die Signalkaskade des EGF-Rezeptors involviert ist. Ist *KRAS* mutiert, ist es unabhängig von EGFR in einem daueraktiven Zustand und leitet kontinuierlich Signale weiter (SOULIÈRES *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Aktivierung von EGFR und *KRAS* mit einer erhöhten Tumorprogression einhergeht (WICKI *et al.*, 2010).

30 - 50% der kolorektalen und 30 - 40 % der Lungen-Tumoren tragen eine *KRAS*-Mutation in sich (AMADO *et al.*, 2008; WICKI *et al.*, 2010).

Auch für die präklinischen *In-vitro*-Studien ist der *KRAS*-Status der Tumorzellen deshalb von Bedeutung. Aus diesem Grund und in Anlehnung an Ergebnisse der Arbeit TIEMANN *et al.* (2011) wurden für die vorliegende Arbeit zwei Zelllinien ausgewählt, wovon die Bronchialkarzinomzellen *KRAS*-mutiert sind und die Kolonkarzinomzellen den *KRAS*-Wildtyp besitzen. In der o. g. Publikation konnte gezeigt werden, dass jedoch auch andere Faktoren für das Ansprechen auf Panitumumab verantwortlich sein müssen. Bei den A549-Zellen konnte

trotz der beschriebenen KRAS-Mutation ein konzentrationsabhängiger, wachstumshemmender Effekt durch Panitumumab beobachtet werden, wohingegen die HT-29-Zellen keinerlei Beeinflussbarkeit durch den EGFR-Antagonisten zeigten (TIEMANN *et al.*, 2012).

Neben Faktoren wie dem Genstatus der Tumorzellen, die für die Effektivität einer Antikörpertherapie entscheidend sind, sind auch verschiedene Einflussgrößen in der Strahlentherapie zu beachten. Strahlenarten und die unterschiedlichen Wechselwirkungen von Strahlung und Materie sollen im folgenden Abschnitt näher beleuchtet werden.

## 1.6 Grundlagen der Strahlenbiologie

Es werden direkt ionisierende Strahlen, ausgehend von geladenen Teilchen, und indirekt ionisierende Strahlen unterschieden. Zu letzteren gehören neben Neutronen auch Photonen, welche ungeladen sind, jedoch geladene Sekundärteilchen erzeugen können, die dann wiederum direkt ionisierend wirken. Ionisation beschreibt den Verlust eines oder mehrerer Elektronen aus einem Atom oder einem Molekül, sodass eine positive Ladungsbilanz entsteht (WANNENMACHER *et al.*, 2013).

Photonen, die auch in der vorliegenden Arbeit zur Bestrahlung von Zellen verwendet wurden, werden beim Durchqueren von Materie durch Wechselwirkungen (Absorption und Streuung) mit derselben abgeschwächt durch hauptsächlich drei Prozesse: den photoelektrischen Effekt, den Compton-Effekt sowie die Paarbildung. Sekundär erzeugte Elektronen erzeugen in der Materie sog. Bremsstrahlung. Mit diesem Begriff hängt auch der des Linearen Energietransfers (LET) eng zusammen. Mit Hilfe des LET soll die Strahlenqualität charakterisiert werden, indem die pro zurückgelegter Strecke abgegebene Energie eines Teilchens in keV/ $\mu\text{m}$  angegeben wird (WANNENMACHER *et al.*, 2013).

Der Effekt der Strahlung auf Moleküle bzw. Zellverbände kann grundsätzlich in eine physikalische, chemische sowie biologische Phase eingeteilt werden. Dabei spielen Faktoren wie Hypoxie, Reoxygenierung und DNA-Reparaturmechanismen entscheidende Rollen. Eine der wichtigen Zielstrukturen in der Radiotherapie ist die DNA, welche durch ionisierende Strahlen geschädigt wird. An bestimmten Kontrollpunkten, sog. Check points, des Zellzyklus arretieren Zellen, um mit Hilfe von DNA-Reparaturmechanismen Doppelstrangbrüche oder andere Fehler zu korrigieren. Eine Folge von fehlerhaften oder fehlenden Reparaturen des Erbgutes kann z.B. programmierter Zelltod, Apoptose, sein (JOINER *et al.*, 2010).

## 1.7 Der Zellzyklus

Die Zellteilung läuft in sich immer wiederholenden Phasen ab, dem sog. Zellzyklus. Er setzt sich aus der Mitose-Phase und der Interphase zusammen (Abb. 2).

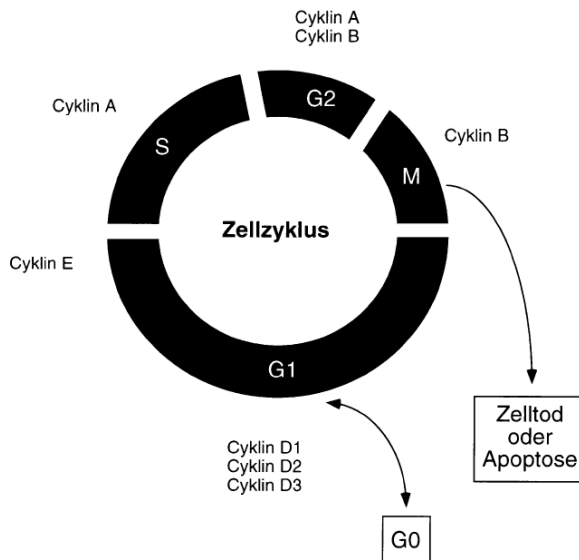


Abb. 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus, aus (ROYER *et al.*, 1999).

Die Interphase lässt sich noch weiter unterteilen. Die sich direkt der Mitose anschließende G1-Phase umfasst Wachstumsvorgänge der diploiden Zelle. Es werden Zellorganellen neu gebildet und die Synthesephase vorbereitet. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Zellen aus der G1-Phase in eine Ruhephase, die sog. G0-Phase, wechseln. Sie können darin verweilen oder nach einer gewissen Zeit wieder in den Zyklus eintreten. In der Synthesephase, oder auch S-Phase, findet die Replikation der DNA statt bevor sich die Zelle dann in der G2-Phase auf die Mitose vorbereitet, in der die gleichmäßige Verteilung der replizierten Chromosomen auf die späteren Tochterzellen erfolgt.

Zu Beginn der Mitose wird in der Prophase das Chromatin der Zellen kondensiert. Anschließend löst sich die Kernhülle in der Prometaphase auf, damit sich dann in der Metaphase die Chromosomen in der sog. Äquatorialebene anordnen können. Durch den Spindelapparat werden die Schwesterchromatiden getrennt und zu den gegenüberliegenden Zellpolen gezogen. Die Telophase beschreibt die sich anschließende Entspiralisierung der Chromosomen und die Neubildung von Kernhüllen. Die Zellorganellen werden auf beide Tochterzellen verteilt, die einen identischen Chromosomensatz besitzen (KLEINIG *et al.*, 1999). Der Zellzyklus spielt eine wichtige Rolle bei der Wirkung von ionisierender Strahlung auf Zellen, denn die Strahlensensibilität hängt stark von der Zellzyklusphase ab. So sind Zellen in

der M- und G2-Phase am empfindlichsten, während Zellen der S-Phase am meisten strahlenresistent sind (PAWLIK *et al.*, 2004).

Die verschiedenen Eigenschaften der Phasen des Zellzyklus, in der sich eine Zelle befinden kann, haben demnach Einfluss auf die Effektivität einer Strahlentherapie. Können Kontrollpunkte zwischen den Phasen aufgrund von beispielsweise mangelnder DNA-Reparaturmechanismen nicht passiert werden, können Zellen daraufhin in den programmierten Zelltod übergehen.

In Hinblick auf die Weiterentwicklung der Tumorthherapie ist daher von Bedeutung, welcher Einfluss jeweils von Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung auf die malignen Zellen ausgeht. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich deshalb mit der Auswirkung von dem EGFR-Antagonisten und ionisierender Strahlung auf zwei verschiedene Tumorzellen mit unterschiedlichem *KRAS*-Status. Die Tumorzelllinien A-549 und HT-29 entsprechen *in-vivo* Tumorentitäten, welche besonders im metastasierten Stadium mit einer schlechten Prognose einhergehen. Patienten mit metastasiertem Kolonadenokarzinom werden bereits unter bestimmten Voraussetzungen (s. Kap. 1.5) einer Therapie mit Panitumumab zugeführt und profitieren davon. Ein möglicher synergistischer Effekt durch die gleichzeitige Bestrahlung dieser Tumoren (repräsentiert durch die HT-29-Zellen) bietet möglicherweise neue Ansätze in der Radioonkologie und sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Für Tumoren mit *KRAS*-Mutation, wie z. B. Lungenadenokarzinome, welche hier durch die A-549-Zellen repräsentiert werden, könnten sich bei positiven Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ebenfalls zukünftig neue Therapieoptionen ergeben; denn *KRAS*-Mutanten waren von einer Therapie mit dem EGFR-Antagonisten bisher ausgeschlossen.

## 1.8 Zielstellung

Im Laufe der Jahre hat sich das Spektrum der Zulassungen für Panitumumab bereits gewandelt – von der strikten Monotherapie hin zur Kombination mit anderen Chemotherapeutika. In der klinischen Anwendung spielt dabei der *KRAS*-Status der Tumorzellen eine entscheidende Rolle. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, in weiterführenden *In-vitro*-Experimenten die Kombinationsbehandlung von Panitumumab und ionisierender Strahlung an humanen Tumorzellen mit unterschiedlichem *KRAS*-Status zu untersuchen. Dabei lag die Aufmerksamkeit insbesondere auf *KRAS*-mutierten Zellen, welche in der Klinik bisher keiner Therapie mit Panitumumab zugänglich gemacht wurden, in Vorversuchen jedoch auf den Wirkstoff ansprachen (TIEMANN *et al.*, 2012).

Folgende Fragestellungen sollten in der vorliegenden Arbeit weiterführend bearbeitet werden:

- 1.) Kann der bereits beschriebene Einfluss des EGFR-Antagonisten auf das Zellwachstum von malignen Zellen mit unterschiedlichem *KRAS*-Status aus der Arbeit TIEMANN *et al.*, 2012 reproduziert werden?
- 2.) Wird der Zellzyklus bei *KRAS*-mutierten Zellen durch Panitumumab in Kombination mit ionisierender Bestrahlung verändert?
- 3.) Kann der Wirkstoff verschiedene Zelltodmechanismen, wie Apoptose oder Nekrose, in den Zellen auslösen?
- 4.) Beeinflussen Panitumumab und Bestrahlung die Signalweiterleitung ausgehend vom EGF-Rezeptor?

Alle Untersuchungen sollten anhand der *KRAS*-mutierten Zelllinie A-549 erfolgen. Bei den geplanten Versuchen zur Zellzyklusverteilung, Apoptose- und Nekroseinduktion, sowie den Western Blot Analysen sollten jeweils Untersuchungen zum alleinigen Effekt des Antikörpers Panitumumab sowie zur Kombination mit Bestrahlung durchgeführt werden, um Aussagen über mögliche synergistische Wirkungen der potentiellen Therapien treffen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tumorzellen

Für die *In-vitro*-Versuche wurden die Zelllinien A549 und HT-29 verwendet, die aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig stammen (Abb. 3). Die A549-Zellen wurden 1972 aus einem humanen Lungen-Adenokarzinom eines 58-jährigen kaukasischen Mannes isoliert. Sie sind durch eine *KRAS*-Mutation gekennzeichnet. Aus einem humanen Kolon-Adenokarzinom einer 44-jährigen kaukasischen Frau stammen die HT-29-Zellen. Sie wurden 1964 isoliert und besitzen ein nicht mutiertes *KRAS*-Gen (*KRAS*-Wildtyp). Im Gegensatz zu den A549-Zellen weisen sie allerdings eine Mutation des *BRAF V600E* Gens auf (DI NICOLANTONIO *et al.*, 2008). *KRAS* und *BRAF* Mutationen schließen sich gegenseitig aus, d. h. sie können nicht gleichzeitig in einer Zelllinie vorkommen (DI NICOLANTONIO *et al.*, 2008). Sowohl für die Zelllinie A549 als auch für die HT-29-Zellen ist eine Überexpression des EGFR beschrieben (RAY *et al.*, 2009). Weiterhin besitzen beide Zelllinien die Eigenschaften, adhärent zu wachsen und Zell-Monolayer auszubilden. Durch die herabgesetzte Kontaktinhibition der Tumorzellen kann es jedoch auch zur Ausbildung von Multilayern kommen. Um eine vollständige Konfluenz der Zellen zu vermeiden und ein exponentielles Wachstum der Tumorzellen zu gewährleisten, wurden sie regelmäßig alle 4 bis 5 Tage passagiert.

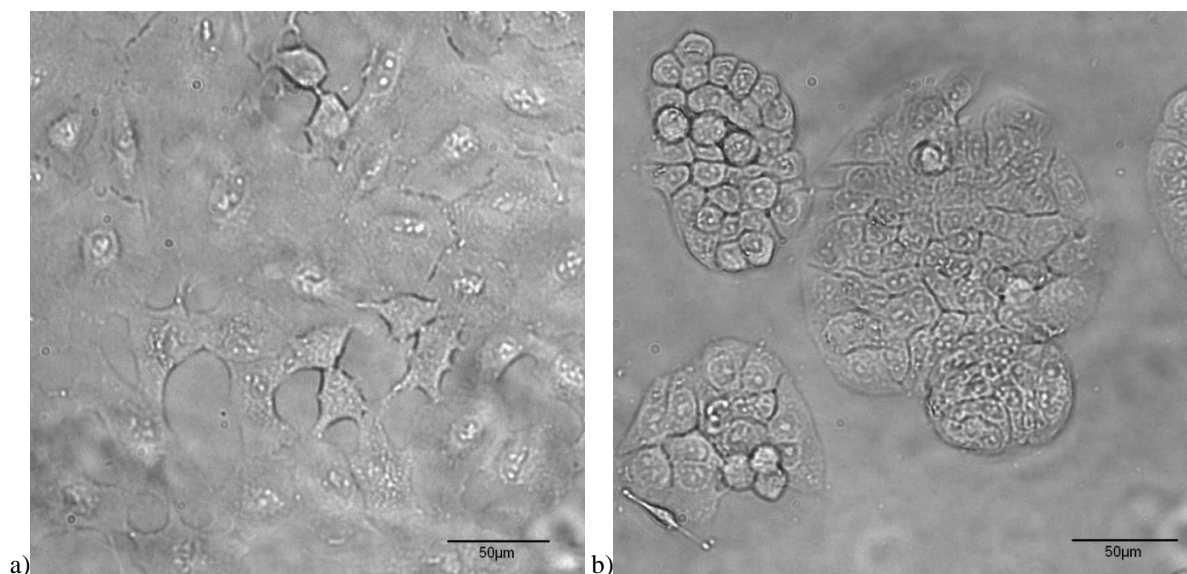


Abb. 3: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der a) A549- und b) HT-29-Zellen; beide Zelllinien subkultiviert in Zellkulturflaschen (T25), Medium entfernt, mit PBS befeuchtet, 400-fache Vergrößerung.



## 2.2 Zellbiologische Arbeitstechniken

### 2.2.1 *Ausfrieren der kryokonservierten Zellen*

Die Zellen wurden in einem Kryomedium, bestehend aus 70 % Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 20 % Fetalem Kälberserum (FBS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), geliefert und bei -152 °C in einer Kühltruhe gelagert. Das Lösungsmittel DMSO verhinderte die Eiskristallbildung und somit die Zerstörung von Zellorganellen.

Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurde das Kryoröhrchen mit den Zellen im Wärmebad bei 37 °C zügig aufgetaut und in ein Falconröhrchen überführt. Anschließend wurden 5 ml temperiertes Medium vorsichtig zu den Zellen hinzugegeben und die Zellsuspension dann auf drei T<sub>25</sub>-Zellkulturflaschen mit insgesamt 5 ml Medium verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C erfolgte ein Medienwechsel, um alle toten Zellen und DMSO-Rückstände zu entfernen.

### 2.2.2 *Zellkultivierung*

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherter Luft in einer Nährlösung aus DMEM mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S).

Zur Subkultivierung wurden die Zellen zunächst zweimal mit 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült, um tote Zellen und Zellreste zu entfernen und anschließend mit 0,05%igen Trypsin/EDTA (T/E) trypsinisiert. Trypsin gehört zu den Serinproteasen und löst sowohl die interzellulären als auch die Zell-Flaschen Kontakte, sodass die Zellen vereinzelt werden. Ethylendiamintetraacetat (EDTA), welches als Komplexbildner zweiwertige Kationen wie Ca<sup>2+</sup> bindet, unterstützt das Enzym in seiner Wirksamkeit. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank und die Zellablösung wurde lichtmikroskopisch überprüft. Anschließend wurde die Reaktion mit serumhaltigem DMEM abgestoppt. Nachdem die Zellsuspension für 5 Minuten bei 250 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellzahl bestimmt wurde, wurden die Zellen in neue T<sub>25</sub>-Flaschen eingesät und in 5 ml DMEM suspendiert. Danach wurden sie sofort in den Brutschrank gestellt. Die gewählten Einsaatdichten variierten, je nachdem welche Zellzahl für die Versuche benötigt wurde.

Für die Versuche wurden je nach Bedarf an Zellen verschieden große Zellkulturgefäße mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> – 150 cm<sup>2</sup> verwendet.

### 2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde mit dem Coulter Counter der Firma Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Das Coulter-Prinzip der Zählung und Größenbestimmung basiert auf der Detektion und Messung einer Widerstandsänderung, die ein Partikel oder eine Zelle auslöst, wenn sie in einer elektrisch leitfähigen Flüssigkeit (Isoton-Lösung) suspendiert wird und durch eine kleine Kapillaröffnung tritt (Benutzerhandbuch Beckman Coulter Z-Serie). Dazu wurden 0,2 ml Zellsuspension gut suspendiert und zu 9,8 ml Isoton-II-Flüssigkeit gegeben. Die zu messende Partikelgröße wurde in Hinblick auf die Tumorzellgröße manuell auf einen Durchmesser von 8 - 30  $\mu\text{m}$  eingestellt. Nach Hochrechnungen des Gerätes erfolgte die Angabe in Zellen pro ml.

## 2.3 Wirkstoffe

### 2.3.1 Panitumumab

Der monoklonale Antikörper Panitumumab wird von der Firma Amgen GmbH (München, Deutschland) produziert und unter dem Handelsnamen Vectibix® vertrieben. Geliefert wurde Panitumumab in durchsichtigen 20 ml Injektionsflaschen, die eine farblose, sterile Flüssigkeit enthielt. Die Lagerung erfolgte nach Herstelleranweisung bei 2 – 8 °C im Dunkeln. Weiterhin enthielten die Injektionsflaschen Natriumchlorid, Natriumacetat-Trihydrat, Essigsäure (Eisessig, zur pH-Wert-Einstellung) und Wasser für Injektionszwecke.

Die in den Injektionsflaschen befindliche Konzentration von Panitumumab von 138,6  $\mu\text{M}$  wurde als Stammlösung betrachtet und zu den jeweiligen Versuchen kurz vorher mit Medium bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

### 2.3.2 Sorafenib

Die Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib trägt den Handelsnamen Nexavar® und wurde von der Firma Campro Scientific (Berlin, Deutschland) als Feststoff geliefert. Die Stammlösung mit einer Konzentration von 10,8 mmol/l wurde mit Methanol nach Anleitung des Herstellers angesetzt. Die Stammlösung wurde aliquotiert bei -20 °C gelagert.

### 2.3.3 Nocodazol

Nocodazol wurde von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) als weißes Pulver geliefert. Die Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mmol/l wurde mit DMSO hergestellt und anschließend aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Nocodazol ist ein Spindelgift, welches die Polymerisation von Mikrotubuli und somit Ausbildung des Spindelapparates während der Metaphase hemmt (JORDAN *et al.*, 1998; BRABANDER *et al.*, 1976). Durch den so verzögerten Aufenthalt der Zelle in der Mitose wird der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet (CHOI *et al.*, 2012).

## 2.4 Bestrahlung der Zellen

Die Zellen wurden in den Kulturflaschen bzw. -schalen bei Raumtemperatur und Raumluftbedingungen mit dem Linearbeschleuniger Siemens Oncor Expression (Healthcare Sector Siemens AG, Erlangen, Deutschland) bestrahlt, der Photonen mit einer maximalen Energie von 6 MeV erzeugt. Die Zellkulturgefäße wurden auf einer 40 cm x 40 cm großen, auf dem Bestrahlungstisch befestigten Plexiglasscheibe so angeordnet, dass die Zellen einer Dosisleistung von 3,75 Gy/min ausgesetzt waren. Die Strahlungsquelle befand sich dabei in einem Abstand von 1 m zur Plexiglasscheibe unter dem Bestrahlungstisch. Die Zellen wurden für die verschiedenen Untersuchungen mit 0 Gy (Kontrolle) bzw. 8 Gy bestrahlt. Um mögliche Einflüsse des Transportes auf das Zellwachstum für alle Proben gleich zu halten, wurden sie gemeinsam transportiert und nur die zu bestrahlenden Zellen der Strahlung ausgesetzt (Scheinbestrahlung der Kontrollen).

## 2.5 Wachstumskurven

Mit Hilfe von Wachstumskurven lässt sich das Wachstumsverhalten von Zellkulturen beschreiben und beispielsweise die Zellpopulationsverdopplungszeit berechnen. Dafür ist die Kenntnis der verschiedenen Wachstumsphasen wichtig. Nach der Einsaat der Zellen in neue Zellkulturflaschen müssen sie sich an die neue Umgebung anpassen und sich erneut an den Flaschenboden anheften. Dieser Vorgang wird als Lag-Phase bezeichnet, welche in der Regel nach einem Tag abgeschlossen ist. In dieser Zeit sollte für eine höhere Aussagekraft keine Wirkstoffzugabe erfolgen. Die sich nun anschließende Log-Phase beschreibt das exponentielle Wachstum der Zellen unter optimalen Bedingungen der Nährstoffversorgung. In dieser Phase lässt sich mittels linearem Fit an die Daten die Populationsverdopplungszeit bestimmen. Vermindert sich die Konzentration der Nährstoffe und akkumulieren die stoffwechselhemmenden Produkte, kommt es zur stationären Phase. Dazu kommt es entweder, weil keine Zellteilung mehr stattfindet oder weil sich die Absterberate und die Teilungsrate ausgleichen. Der Faktor der Kontaktinhibition spielte im Falle der genutzten Tumorzellen keine wesentliche Rolle.

### 2.5.1 Allgemeine Durchführung

Für die Wachstumsversuche wurden Zellkulturen verwendet, die mikroskopisch eine geringere Konfluenz als 80 % aufwiesen. Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens beider Zelllinien wurden sie in 24er-Wellplatten eingesät. Die Wachstumsfläche eines Wells betrug 1,9 cm<sup>2</sup> und das Gesamtvolumen pro Well betrug jeweils 1 ml.

Die Zellen wurden aus den Zellkulturflaschen trypsiniert, deren Zellzahl bestimmt (s. Kap. 2.2.3.) und anschließend, je nach Versuchsreihe, entweder 1 x 10<sup>3</sup> oder 1 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Well eingesät. Die Zellzahlbestimmung erfolgte alle 24 Stunden in einer Dreifachmessung für insgesamt weitere 6 Tage. Dazu wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit 0,3 ml T/E (0,25 %) trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Ein Mediumwechsel erfolgte während des Verlaufs der Experimente nicht.

Die rechnerische sowie grafische Auswertung erfolgte bei diesen sowie in allen folgenden Versuchen mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2007 (Microsoft, Redmond, USA). Die statistischen Auswertungen wurden mittels Student's T-Test durchgeführt.

### 2.5.2 Wachstumsverhalten unter Einfluss von Panitumumab

Um den Einfluss von Panitumumab auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurden, wie oben beschrieben, die Zellen in 24er Wellplatten eingesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde Panitumumab in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM bzw. 50 nM zu den Zellen hinzugegeben. Vorher wurde jedoch bereits die Zellzahl bestimmt, welche dann als Ausgangswert für alle Proben galt. Im Weiteren wurde dann täglich die Zellzahl als Triplikat bestimmt und der Durchschnitt berechnet. Die maximale Inkubationszeit des Wirkstoffes betrug fünf Tage. Ein Medienwechsel erfolgte nicht.

## 2.6 Zellzyklusanalysen

### 2.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Zellzyklusanalysen wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers durchgeführt. Mit dem auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzen basierenden Prinzip können Zellgröße und -granularität gleichzeitig detektiert werden. Die Messung erfolgt immer dann, wenn eine Zelle einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laserstrahl passiert. Dazu lagen die Zellen als Einzelzellen in Suspension vor. Mit einer Geschwindigkeit von 200 – 2000 events/min werden Zellen zwischen 0,2 µm - 20 µm in einem Hüllstrom am Fokus des Lasers vorbeigeführt. Es wird unterschieden zwischen der Seitwärtslichtstreuung (side scatter, SSC), dem Licht, das in 90° zum Laserstrahl durch die Zelle abgelenkt wird, und dem

Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC). Letzteres ist das in einem kleinen Winkel zum Laserstrahl durch die Zelle abgelenkte Licht, welches ein (unscharfes) Maß der Zellgröße darstellt. Hingegen ist der side scatter ein Maß für die Zellgranularität bzw. Zellinnenstruktur. Die optischen Signale werden durch Photomultiplier (PMT) verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt. Diese lassen sich graphisch in sog. Histogrammen darstellen. Histogramme beschreiben eine Häufigkeitsverteilung, in diesem Falle von Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus.

Mit Hilfe von „Gates“ wurden Teilmengen der Zellen in einer frei wählbaren Region bestimmt, um genauere Analysen zu machen.

Die Messergebnisse wurden mit dem Programm „Multicycle for Windows“ (Version 3.0, Phoenix Flow Systems) ausgewertet. Die Gesamtzahl der gezählten Zellen wurde auf 100 % normiert.

Die Messparameter für den Detektor waren für Vorwärtsstreulicht (FSC) 890 Volt und Seitwärtsstreulicht (SSC) 450 Volt. Die Kanäle wurden auf FL1 424 Volt, FL2 337 Volt, FL3 355 Volt, FL4 450 Volt und für FL5 577 Volt eingestellt.

### 2.6.2 Versuchsaufbau

Im Rahmen der Vorversuche für die durchflusszytometrischen Untersuchungen der A549-Zellen wurden die verschiedenen Parameter (Einsaatdichte, Inkubationszeit, Zeitpunkt der Fixierung, u. a.) von Ansatz zu Ansatz variiert, um die besten Versuchsbedingungen zu ermitteln. Ein Versuchsansatz umfasste vier verschiedene Proben von Zellen, wovon zwei ohne und zwei mit Panitimumab behandelt wurden. Je eine Probe wurde später mit einer Dosis von 8 Gy bestrahlt. Allen Versuchsansätzen war gleich, dass die Zellen zunächst durch Konfluenz synchronisiert wurden, bevor sie in neue Kulturflaschen eingesät wurden. Die Einsaatdichte betrug  $2 \times 10^5$  Zellen pro T<sub>75</sub>-Flasche in insgesamt 10 ml Medium. Die Zugabe des Wirkstoffes Panitimumab erfolgte stets 24 Stunden nach der Einsaat. Hierfür wurde Panitimumab mit DMEM bis zur gewünschten Konzentration verdünnt und das entsprechende Volumen an Medium vor der Zugabe aus den Kulturflaschen entnommen. Weitere 72 Stunden nach der Wirkstoffzugabe fand die Bestrahlung statt (Abb. 4).

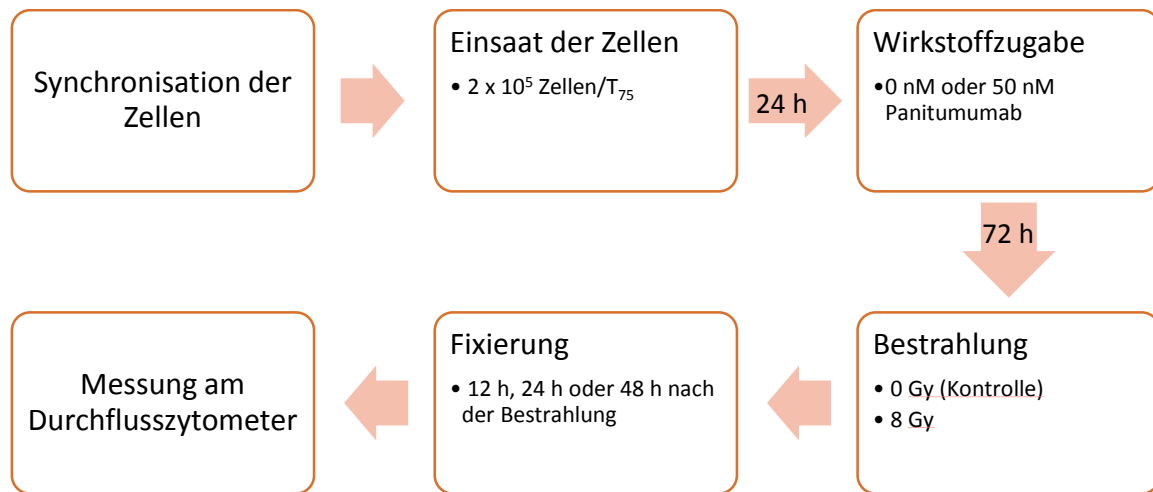


Abb. 4: Schema zum Versuchsaufbau der Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie.

Anschließend wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert. Dabei wurde zunächst der Überstand aus den Zellkulturflaschen abpipettiert und anschließend die Zellen zweimal mit 10 ml auf 37 °C erwärmter PBS gewaschen. Mit T/E (0,05 %) wurden die Zellen für acht Minuten im Brutschrank trypsinisiert und dann vorsichtig in 10 ml Medium resuspendiert. Im Folgenden wurde die Zellsuspension zu den bereits gesammelten Überständen aus den vorherigen Arbeitsschritten hinzugefügt. Um die Zellen von dieser gesamten Lösung zu trennen, wurde sie nun bei 4 °C bei 250 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 10 ml PBS vorsichtig resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde die Zellzahl mit Hilfe des Coulter Counters bestimmt, um dann 1 x 10<sup>6</sup> Zellen je Probe in ein extra Falconröhrchen zu überführen und nochmals bei o. g. Bedingungen zu zentrifugieren. Das Zellpellet wurde anschließend in 100 µl PBS aufgenommen, vorsichtig resuspendiert bis es sich vollständig gelöst hatte und dann in 2 ml - 20 °C kalten Ethanol (70 %, unvergällt) getropft. Bei diesem Schritt wurden die Zellen vereinzelt und fixiert, sodass eine Lagerung bei - 20 °C bis zu zwei Jahren möglich ist.

Um die Zellen der verschiedenen Proben mit dem Durchflusszytometer analysieren zu können, wurden sie mit RNase behandelt und anschließend mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. PI interkaliert mit doppelsträngigen (ds) Nukleinsäuren, d. h. dsDNA und dsRNA. Da die dsRNA die Ergebnisse und damit auch die Histogramme je nach Zellzyklusstand verfälscht, wird sie vorher mit der RNase verdaut (SACK *et al.*, 2007). Die in Ethanol fixierten und gefrorenen Zellen (- 20 °C) wurden währenddessen bei 4° C und 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet einmal mit 1 ml PBS gewaschen und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 1 ml der 37 °C warmen RNase gut resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Wasserbad (37 °C) wurden die Proben bei Raumtemperatur und 300 x g für

fünf Minuten zentrifugiert. Das sich nun bildende Zellpellet wurde in 500 µl einer PI-Verdünnung gelöst. PI wurde mittels HBS-Puffer zu einer Arbeitslösung von 50 µg/ml verdünnt. Die Zellen wurden über Nacht im Kühlschrank (8 °C) gelagert und am nächsten Tag am Durchflusszytometer unter den o. g. Einstellungen gemessen.

## 2.7 Apoptose-Nekrose-Messungen

Mit Hilfe der im Folgenden beschriebenen Methode wurde die Wirkung von Panitumumab auf die Tumorzellen hinsichtlich der Apoptoseinduktion untersucht. Die Messungen der Proben erfolgten am Durchflusszytometer. Die Probenvorbereitung erfolgte mit Hilfe des Annexin V-FITC/7-AAD-Kits, welches aufgrund der Eigenschaften seiner Inhaltsstoffe als Apoptosedetektions-Kit bezeichnet wird. Nekrotische Zellen wurden mittels 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) angefärbt, welches in die DNA zwischen Cytosin-Guanin-Basenpaaren interkaliert (MIKHAILOV *et al.*, 1981). Da diese Substanz eine intakte Zellmembran nicht durchdringen kann, muss die Zelle bereits zerfallen sein, damit das 7-AAD binden kann. Frühapoptotische Zellen lassen sich spezifisch mit Annexin V-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) anfärben (MARTIN *et al.*, 1995). Es besitzt die Eigenschaft, an Phosphatidylserin zu binden, das sich in einer intakten Zelldoppelmembran auf der cytosolischen Seite befindet. Wird die Integrität der Zelle gestört, wird Phosphatidylserin in der frühen Phase der Apoptose auch an der extrazellulären Seite exponiert, wobei die Zellmembran an sich noch intakt ist (KOOPMAN *et al.*, 1994). Annexin V-FITC kann jedoch so bereits an das nach außen gelagerte Phosphatidylserin binden.

### 2.7.1 Versuchsaufbau

Bis zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe unterschied sich der Ablauf der Apoptose-Nekrose-Messungen nicht von dem der Zellzyklusanalysen (Abb. 5).

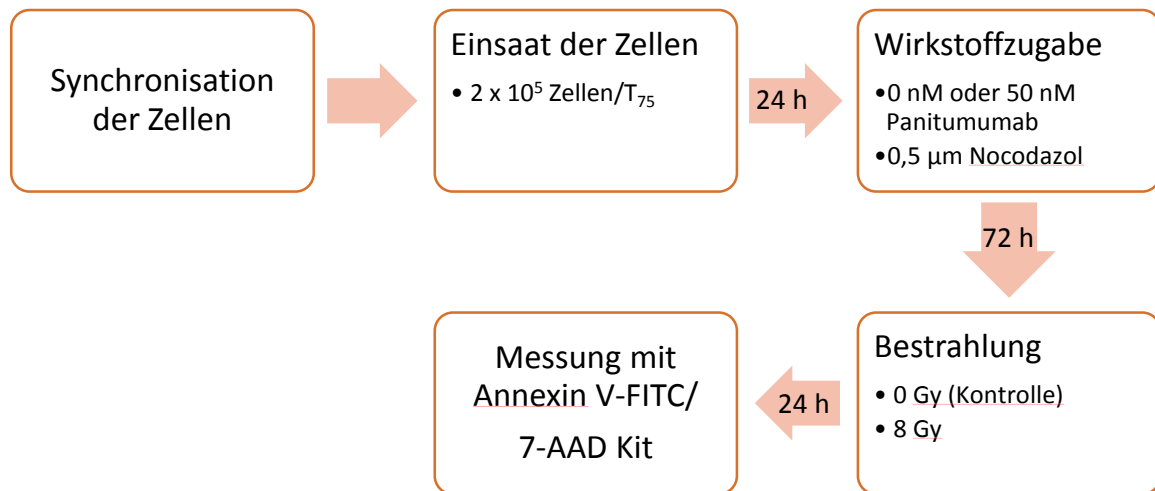


Abb. 5: Schema zum Versuchsaufbau der Apoptose-Nekrose-Messungen mittels Durchflusszytometrie.

Panitumumab wurde 24 Stunden nach Zelleinsaat in einer Konzentration von 50 nM zu den entsprechenden Proben hinzugegeben. Einigen Proben wurde der Wirkstoff Nocodazol in einer Konzentration von 0,5 µM hinzugefügt. Nocodazol diente im Sinne eines Apoptoseinduktors als Positivkontrolle (s. Kap. 2.3.3). Nach 72 Stunden wurden die Zellen der jeweiligen Proben mit 0 Gy (Kontrollen) bzw. 8 Gy bestrahlt. Weitere 24 Stunden später erfolgten die Messungen am Durchflusszytometer.

Ein nennenswerter Unterschied zu den vorher geschilderten Zellzyklusanalysen ist, dass eine Fixierung der Zellen entfiel. Die Proben wurden stattdessen wie folgt aufbereitet:

Die Zellen wurden in den Zellkulturflaschen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, wobei der Überstand als auch das PBS gesammelt wurden. Danach wurden die Zellen mittels 5 ml 0,05%igen T/E trypsiniert und anschließend in kaltem DMEM resuspendiert. Es erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 300 x g und 4° C. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml kalter PBS vorsichtig gelöst und dann die Zellzahl bestimmt (s. Kap 2.2.3). Von den jeweiligen Proben wurden  $5 \times 10^6$  Zellen entnommen und in einem neuen Falconröhrchen für fünf Minuten bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml einfachem Bindepuffer (1x BP) vorsichtig resuspendiert. Ab diesem Arbeitsschritt wurden alle Proben während der Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Aus jeder Probe wurden nun 100 µl in die jeweils entsprechende Anzahl an Eppendorfgefäße überführt und mit den Zusätzen des Annexin V-FITC/7-AAD Kits versetzt (Tab. 1).



Tab. 1: Schema zur Probenaufbereitung der Apoptose-Nekrose-Messung

Probennummer	<i>Positivkontrolle mit 0,5 <math>\mu</math>M Nocodazol 0 Gy</i>				<i>0 nM Panitumumab 0 Gy (nativ)</i>				<i>0 nM Panitumumab 8 Gy</i>	<i>50 nM Panitumumab 0 Gy 8 Gy</i>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Keine Färbung	x				x						
Annexin V-FITC 10 $\mu$ l		x		x		x		x	x		x
7-AAD 20 $\mu$ l			x	x			x	x	x		x

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln wurden alle Proben schnellstmöglich am Durchflusszytometer gemessen. Alle Messungen erfolgten nach demselben Protokoll. Die Messparameter für den Detektor waren für Vorwärtsstreulicht (FSC) 700 Volt und Seitwärtsstreulicht (SSC) 75 Volt. Die Kanäle wurden auf FL1 362 Volt, FL2 348 Volt, FL3 358 Volt, FL4 377 Volt und für FL5 417 Volt eingestellt.

### 2.7.2 Auswertung

Für die Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm Cytometry List Mode Data Acquisition & Analysis Software (2006) der Firma Beckman Coulter herangezogen. Die ungegateden Histogramme der einzelnen Proben wurden darin weiter bearbeitet, sodass am Ende eine prozentuale Angabe zur Zellverteilung möglich war. Die statistische und grafische Auswertung erfolgte anschließend mit Microsoft Excel (2007).

## 2.8 Western Blot Analysen

### 2.8.1 Prinzip des Western Blots

Der Western Blot ist eine Methode, um Proteine aus einer Lösung auf eine Trägermembran zu übertragen (engl. *blotting*) und sie dann durch unterschiedliche biochemische Reaktionen nachzuweisen. Die Übertragung der Proteine erfolgte in diesem Fall mittels Elektrophorese. Der grundlegende Aufbau des Experimentes ist in Abb. 6 dargestellt.

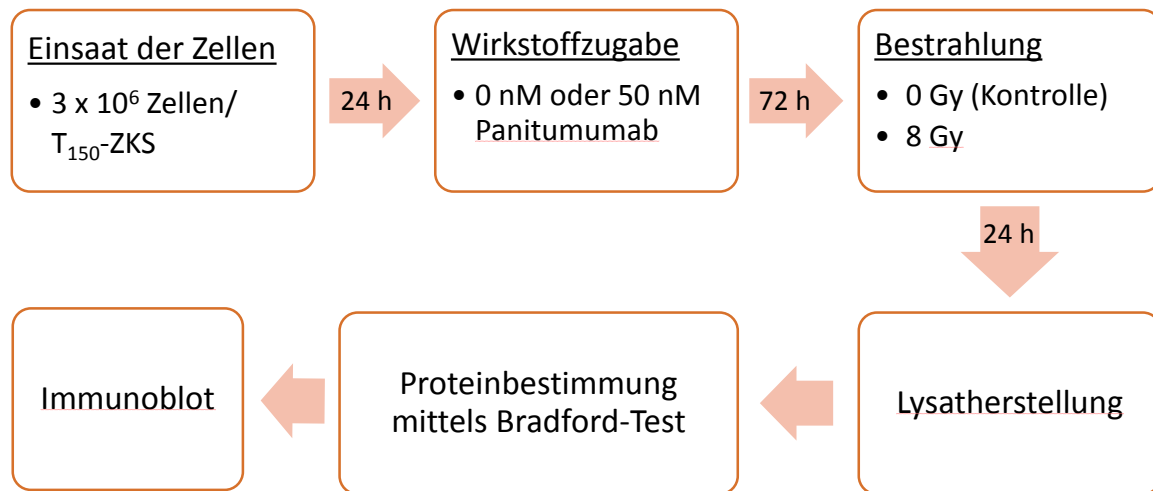


Abb. 6: Schema zum Versuchsaufbau des Western Blots; ZKS: Zellkulturschale

### 2.8.2 Zelleinsaat und Bestrahlung

Wie aus Abb. 6 ersichtlich, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Einsaat mit Panitumumab behandelt. Nach weiteren drei Tagen im Brutschrank wurden die Proben mit 0 Gy (Kontrollen) bzw. 8 Gy bestrahlt. Die unbestrahlten Kontrollen wurden, wie oben beschrieben, auf dem Transport zum Bestrahlungsgerät mitgeführt, jedoch keiner Strahlung ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen nochmals 24 Stunden inkubiert, um dann aus ihnen das Lysat für die Western Blot Analyse herzustellen.

### 2.8.3 Lysatherstellung

Dafür wurde das Medium aus den Zellkulturschalen entnommen und in einem Falconröhrchen gesammelt. Dann wurden 10 ml kalter PBS-Lösung zu den Zellen gegeben, um sie mit einem Zellschaber vorsichtig zu lösen. Die sich nun bildende Zellsuspension wurde dann in das zugehörige Falconröhrchen gegeben. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, damit sich annähernd alle Zellen von der Gefäßwand lösten. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 4 °C und 250 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in 300 µl Lysispuffer vorsichtig gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Auf Eis gelagert, wurde diese Suspension nun für drei Minuten mit dem Dispergiergerät auf der mittleren Stufe homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend bei 1 °C und 20800 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Davon wurden nochmals 10 µl entnommen und für die Proteinbestimmung bei - 80 °C eingefroren. Die restliche Probe wurde dann im Verhältnis 5:1 mit Laemmli-Puffer gemischt und zur Proteindenaturierung für fünf Minuten bei 98 °C im

Thermomixer inkubiert. Die Proben konnten dann bei - 20 °C im Tiefkühlschrank gelagert werden.

#### 2.8.4 Proteinbestimmung mittels Bradford-Test

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte mit dem Qick Start™ Bradford Protein Assay der Firma Bio Rad (München, Deutschland). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250, wenn es an Proteine bindet. Diese Verschiebung findet bei einer Wellenlänge von 470 nm nach 595 nm nach Proteinbindung im sauren Milieu statt, welche photometrisch gemessen werden kann (BRADFORD, 1976). Dazu wurde vor den Messungen am Photometer eine Kalibrierungsgerade erstellt, die zur Berechnung der Proteinmenge in den Proben diente.

Ziel war es, den Proteingehalt einer jeden Probe zu bestimmen, um dann die Taschen der Western Blot Gele immer mit der annähernd gleichen Proteinmenge zu befüllen. Die bei der Lysatherstellung extra abgefüllten Eppendorfgefäße, welche bei - 80 °C gelagert wurden, wurden aufgetaut und 1:10 mit A. bidest. verdünnt. Von der Verdünnung wurden wiederum je zweimal 20 µl in neue Eppendorfgefäße überführt. Nachdem zu jeder Probe 100 µl 1x Qick Start™ Bradford Dye Reagent hinzugegeben wurde, wurden sie für 6 Minuten im Dunkeln inkubiert, danach gut gemischt und in eine Einmal-Messküvette überführt. Jede Probe wurde nun zweifach gemessen und anschließend ein Mittelwert errechnet. Die Blank-Probe setzte sich aus 20 µl A. bidest. und 100 µl 1x Dye Reagent zusammen und wurde als erste Probe gemessen. Aus den gewonnenen Daten ließ sich das Volumen berechnen, welches 100 µg Protein entsprach. Dieser Wert wurde für jede Probe berechnet und war die Grundlage für die Gelelektrophorese.

#### 2.8.5 Gelelektrophorese

Nach dem die Proteinmenge der einzelnen Proben bestimmt war, erfolgte die Gelelektrophorese. Dazu wurden die Fertiggele (Mini-Protean® TGX™ Precastgels) in die dafür vorgesehene Vorrichtung (Mini Protean® Tetra Cell) eingesetzt und der Elektrophoresepuffer (A. bidest. und 10x Tris/Glycin/SDS-Puffer) bis zum Eichstrich eingefüllt. Nun wurden die Taschen der Gele so befüllt, dass die Probenmenge in etwa einer Proteinmenge von 100 µg entsprach. In die erste Tasche der Gele wurde der Proteinmarker (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc.) gefüllt. Am

Ende wurden alle noch leeren Geltaschen mit Laemmli-Puffer befüllt. Bei geschlossenem Stromkreis betrug die Spannung 200 V und die Stromstärke 40 mA.

### 2.8.6 *Blotten*

Bevor die Gele nun geblottet werden konnten, wurde der Blotting-Puffer (700 ml A. bidest., 100 ml 10x Tris/Glycine Puffer, 200 ml Methanol) angesetzt und darin die Nitrocellulosemembranen, Filterpapiere und die aus der Halterung gelösten Gele für 20 Minuten quellen gelassen. Nach Anleitung des Herstellers wurden dann die Blot-Kassetten zusammengesetzt, der Puffer eingefüllt sowie ein Kühlakku hinzugegeben. Anschließend wurde die Blotkammer an die Stromversorgung angeschlossen. Die Spannung betrug dabei 100 V und die Stromstärke 350 mA.

Die Proteinbanden auf den Membranen ließen sich dann mit Ponceau S anfärben, sodass sie vorsichtig geschnitten werden konnten für den weiteren Ablauf. Außerdem wurden die Membranen durch eine kleine Einkerbung markiert, damit später die richtige Orientierung gewährleistet war. Mit A. bidest. wurden die Rückstände des Ponceau S abgespült.

#### 2.8.6.1 *Immunoblot*

Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden auf dem Schüttler durchgeführt, der für eine gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeiten auf den Membranen sorgte.

Die Membranabschnitte wurde in beschriftete Petrischalen gelegt und dreimal mit 5-10 ml „tris-buffered saline“ (TBS) gewaschen. Anschließend wurden sie 30 Minuten in Blocking Solution (3 % Gelatine in TBS) und dann mit „tris-tween-buffered saline“ (TTBS) weitere 10 Minuten inkubiert. In dieser Zeit wurde die gewünschte Verdünnung des Primärantikörpers hergestellt (Tab. 2).

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper und den verwendeten Konzentrationen für die Western Blot Analysen

	Stammlösung (SL)	Verdünnung SL : Antikörper Puffer	Pipettiertes Volumen
<b>Primärantikörper</b>			
Anti-Stat1 Purified mouse Mouse IgG1	250 µg/ml	1:250	6 ml
Anti-EGFR Purified mouse Mouse IgG1	250 µg/ml	1:250	6 ml
Anti-β-Actin	2,9 mg/ml	1:300	6 ml
<b>Sekundärantikörper</b>			
Goat anti-mouse IgG Horseradish peroxidase	0,9 mg/ml	1:1600	6 ml

Die Petrischalen wurden mit Parafilm luftdicht verschlossen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen zweimal 5 Minuten mit TTBS gewaschen und dann der Sekundäntikörper hinzugegeben (s. Tab. 2).

Die Petrischalen wurden erneut luftdicht verschlossen und nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden zweimal 5 Minuten mit TTBS und einmal 5 Minuten mit TBS gewaschen.

### 2.8.7 Farbreaktion

Mit dem nächsten Schritt wurden die Proteine, die durch den Primäntikörper gebunden wurden, sichtbar gemacht. Dazu wurden 2 ml 10x HRP Color Development Buffer, 4 ml HRP Color Reagent A und 120 µl HRP Color Reagent B zu 18 ml A. bidest. gegeben, jeweils 6 ml der Lösung auf die Membranen pipettiert und diese anschließend für maximal 45 Minuten im Dunkeln inkubiert.

### 2.8.8 Auswertung

Die Membranen wurden anschließend feucht eingescannt bzw. abfotografiert. Eine quantitative Auswertung gestaltete sich schwierig, da die Qualität der digitalen Dateien teilweise nicht ausreichend war. Die Auswertung erfolgte deshalb qualitativ durch den manuellen Vergleich der entsprechenden Proteinbanden untereinander.

Weiterhin für die Auswertung wichtig war das Protein  $\beta$ -Actin, welches als sog. Housekeeping-Protein fungiert. Es ist in den Zellen immer nachweisbar und in seiner Ausprägung nicht abhängig von den äußeren Versuchsbedingungen. Außerdem dient es als Kontrolle für eine fehlerfreie Versuchsdurchführung.

## 2.9 Geräte und Materialien

Die verwendeten Materialien und Geräte sind in der folgenden Tabelle nach Methoden sortiert aufgelistet (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte nach Methoden sortiert.

<i>Chemikalien, Materialien und Geräte</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Zellkultivierung:</i>	
Gewebekulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> (T25), 75 cm <sup>2</sup> (T75)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High	
Glucose, 4,5 g/l Glukose	

phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)  
 Fetales Kälberserum (FBS)  
 Penicillin/Streptomycin (P/S)  
 Trypsin/EDTA (T/E) 0,05%

Sicherheitswerkbank  
 Begasungsbrutschrank I  
 Begasungsbrutschrank II

Zapf Instruments (Sarstedt,  
 Deutschland)

Varolab® GmbH (Gießen,  
 Deutschland)

### ***Wachstumskurven:***

24er Wellplatten

SPL Life Sciences (Pocheon,  
 Südkorea)

Trypsin/EDTA (T/E) 0,25%

Biochrom AG seromed® (Berlin,  
 Deutschland)

Coulter Isoton II Diluent (isotone Spülflüssigkeit)

Beckman Coulter GmbH (Krefeld,  
 Deutschland)

### ***Zellzyklusanalysen:***

Coulter Isoton II Diluent (isotone Spülflüssigkeit)  
 Beads für Flow-Check  
 Probenröhrchen  
 IsoFlow Sheath Fluid

Beckman Coulter GmbH (Krefeld,  
 Deutschland)

Gewebekulturflaschen 150 cm<sup>2</sup> (T150)

TPP Techno Plastic Products AG  
 (Trasadingen, Schweiz)

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-  
 ethansulfonsäure-(HEPES)-Pufferlösung

PAA Laboratories GmbH (Pasching,  
 Österreich)

Natriumchlorid (NaCl) zur Herstellung des HBS-Puffers

J.T. Baker (Deventer, Niederlande)

RNAse A aus Rinderpankreas  
 Propidiumiodid (PI; SL 1 mg/ml in HBS)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH  
 (Steinheim, Deutschland)

Ethanol (70%), unvergällt

Zentralapotheke der Universitätsklinik  
 Rostock

Durchflusszytometer: Cytomics FC 500

Beckman Coulter GmbH (Krefeld,  
 Deutschland)

---

### ***Apoptose-Nekrose-Messung:***

Coulter Isoton II Diluent (isotone Spülflüssigkeit)  
 Beads für Flow-Check  
 Probenröhrchen  
 Annexin V-FITC/ 7-AAD Kit

Beckman Coulter GmbH (Krefeld,  
 Deutschland)

Durchflusszytometer: Cytomics FC 500

Beckman Coulter GmbH (Krefeld,  
 Deutschland)

---

### ***Western Blot Analysen:***

Zellkulturschalen 150 cm<sup>2</sup>

TPP Techno Plastic Products AG  
 (Trasadingen, Schweiz)

Goat Anti-Mouse HRP, IgG	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Trans-Blot® Transfer Medium (Nitrocellulose Membran)	
HRP Color Reagent A und B	
HRP Color Development Buffer 10x	
10x Tris/Glycin/SDS-Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH
5x Tris/Glycine Buffer	(München, Deutschland)
10x Tris Buffered Saline	
Laemmli-Puffer	
Mini-Protean® TGX™ Precastgels	
Goat Anti-Mouse HRP, IgG	
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Methanol	J. T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ponceau S solution (0,1 % PonceauS in 5 % acetic acid)	
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Gelatine weiß, Blattform	(Steinheim, Deutschland)
Monoclonal Anti-β-Actin	
Purified mouse Anti-EGFR, mouse IgG1	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Purified mouse Anti-Stat1, mouse IgG1	
Akku-Schüttler KM 2	Edmund Bühler GmbH (Tübingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Electronicrührer Monotherm	Variomag (Daytona Beach, USA)
Dispergiergerät Ultra-Turrax	IKA (Staufen, Deutschland)
Mini Protean® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Power Pac 300	(München, Deutschland)
<hr/>	
<b>Bradford Test:</b>	
Einmal-Küvetten	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Qick Start™ Bradford Dye Reagent 1x	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
BioPhotometer plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
<hr/>	

---

**Wirkstoffe:**

Panitumumab (Vectibix®)	Amgen GmbH (München, Deutschland)
Sorafenib	Campro Scientific GmbH (Berlin, Deutschland)
Nocodazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

---

**Allgemeine Materialien und Geräte:**

Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Coulter Counter Z2	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Zentrifugen: Rotina 420 R, Mikro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, Deutschland)
Linearbeschleuniger: Oncor Expression	Siemens (München, Deutschland)
Phasenkontrast-Mikroskop Eclipse	Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH (Isernhagen, Deutschland)
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries (Bohemia, USA)



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wachstumskurven

Anhand der Wachstumskurven der beiden Tumorzelllinien ließen sich zum einen das native Wachstumsverhalten nachvollziehen und Zellpopulationsverdopplungszeiten berechnen, zum anderen der Einfluss von Panitumumab auf die Zellen beobachten.

Neben der Kontrolle (nativ) wurden drei Konzentrationen des Antikörpers gewählt: 1 nM, 10 nM und 50 nM. Der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib wurde in den Konzentrationen 4  $\mu$ M und 8  $\mu$ M eingesetzt.

##### 3.1.1 Wachstumskurven der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

Für die Wachstumsversuche der A549-Zellen wurden zwei Einsaatdichten, ( $1 \times 10^3$  sowie  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well) gewählt, um in Abhängigkeit von Panitumumab das Zellproliferationsverhalten beurteilen zu können. Die grafische Darstellung aus den Mittelwerten der Ergebnisse ist in den Abb. 7 und Abb. 8 zu sehen.

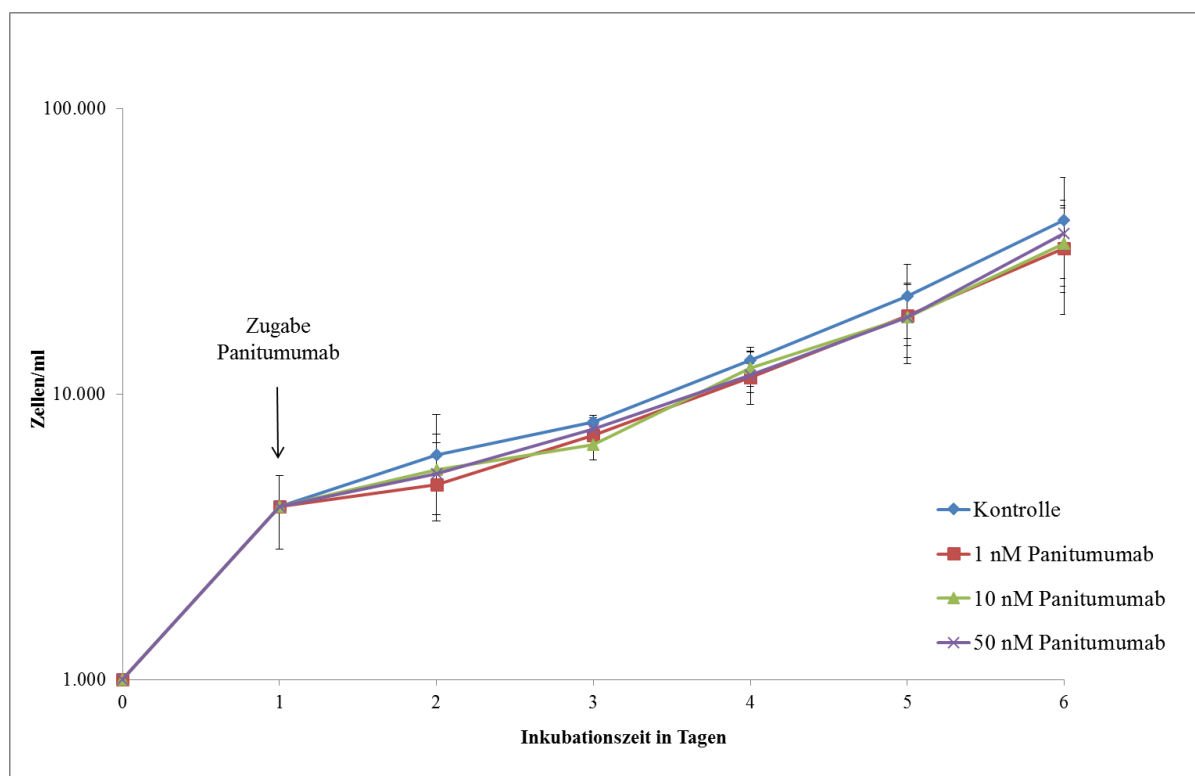


Abb. 7: Wachstumskurve der A549-Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Panitumumab-Konzentrationen; Einsaatdichte  $1 \times 10^3$  Zellen/Well; Wirkstoffzugabe 24 h nach Einsaat; dargestellt sind MW  $\pm$  SD (n=3)

In Abb. 8 ist die Zellzahl in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und drei Konzentrationen des Antikörpers Panitumumab dargestellt. Bereits einen Tag nach der Einsaat wuchsen die Zellen annähernd exponentiell. Eine stationäre Phase des Zellwachstums wurde nicht erreicht. Im Vergleich zur Kontrolle lagen die Zellzahlen der behandelten Zellen knapp darunter, wobei die Differenzen zum Teil der einfachen Standardabweichung entsprachen, der Unterschied also nicht signifikant war. Auch die Zellpopulationsverdopplungszeiten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Wirkstoffkonzentrationen ließ sich ebenfalls nicht erkennen. Aus diesen drei Versuchsansätzen ließ sich lediglich eine Tendenz der zeitabhängigen Wachstumshemmung durch Panitumumab erkennen.

Im weiteren Vorgehen wurde die Einsaatdichte auf  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well erhöht, um eine größere Population an A549-Zellen unter den o. g. Bedingungen zu untersuchen. Dieser Ansatz wurde nur einmalig durchgeführt (s. Abb. 8), da sich bereits bekannte Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe (TIEMANN *et al.*, 2011) damit reproduzieren ließen.

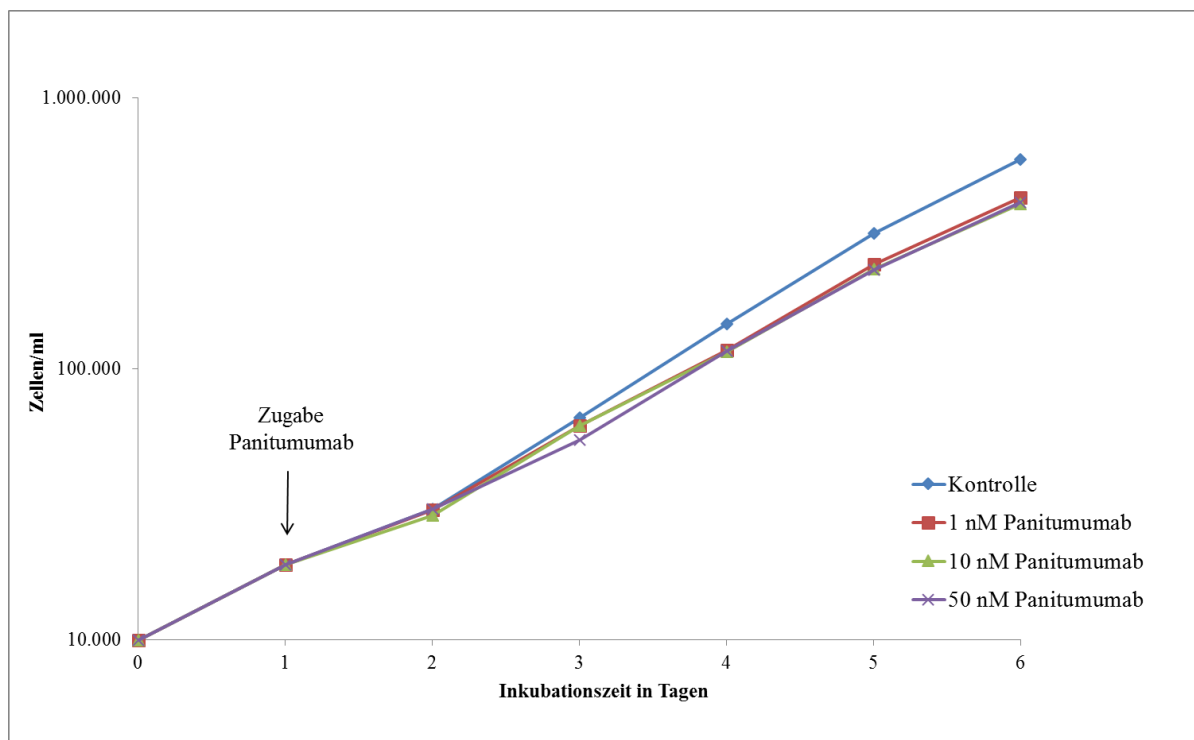


Abb. 8: Wachstumskurve der A549-Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Panitumumab-Konzentrationen; Einsaatdichte  $1 \times 10^4$  Zellen/Well; Wirkstoffzugabe 24 h nach Einsaat; (n=1).

Nach Einsaat haben sich die Zellen schnell adaptiert und konnten proliferieren. Das größte Zellwachstum war ab Tag 2 bis 6 zu erkennen. Die stationäre Phase des Zellwachstums wurde

wiederum nicht erreicht. Der Einfluss von Panitumumab auf die A549-Zellen konnte in der Wachstumshemmung ab dem 3. Tag im Vergleich zu Kontrolle beobachtet werden. Mit zunehmender Inkubationszeit wurde die Differenz der absoluten Zellzahlen zwischen Kontrolle und den Ansätzen mit Panitumumab größer. Die Zellpopulation war im Durchschnitt am 6. Tag in Anwesenheit von Panitumumab auf 70 % der nativen Kontrolle gesunken. Eine vollständige Stagnierung des Wachstums unter Einfluss des Antikörpers ließ sich nicht beobachten. Der beschriebene zeitabhängige Effekt des Wirkstoffes war in allen drei Konzentrationen ab einer Inkubationszeit von 72 Stunden deutlich zu erkennen. Ein konzentrationsabhängiger Effekt ließ sich nicht nachweisen. Wie beschrieben ließen sich so Ergebnisse aus TIEMANN *et al.* (2011) reproduzieren.

### 3.1.2 Wachstumskurven der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

Für die Wachstumsversuche der HT-29-Zellen wurde eine Einsaatdichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well gewählt. Die Versuchsreihe wurde ebenfalls insgesamt ein Mal durchgeführt, um die Ergebnisse der bereits publizierten Daten (TIEMANN *et al.*, 2011) zu reproduzieren. Die Auswertung der Daten ist in Abb. 9 dargestellt.

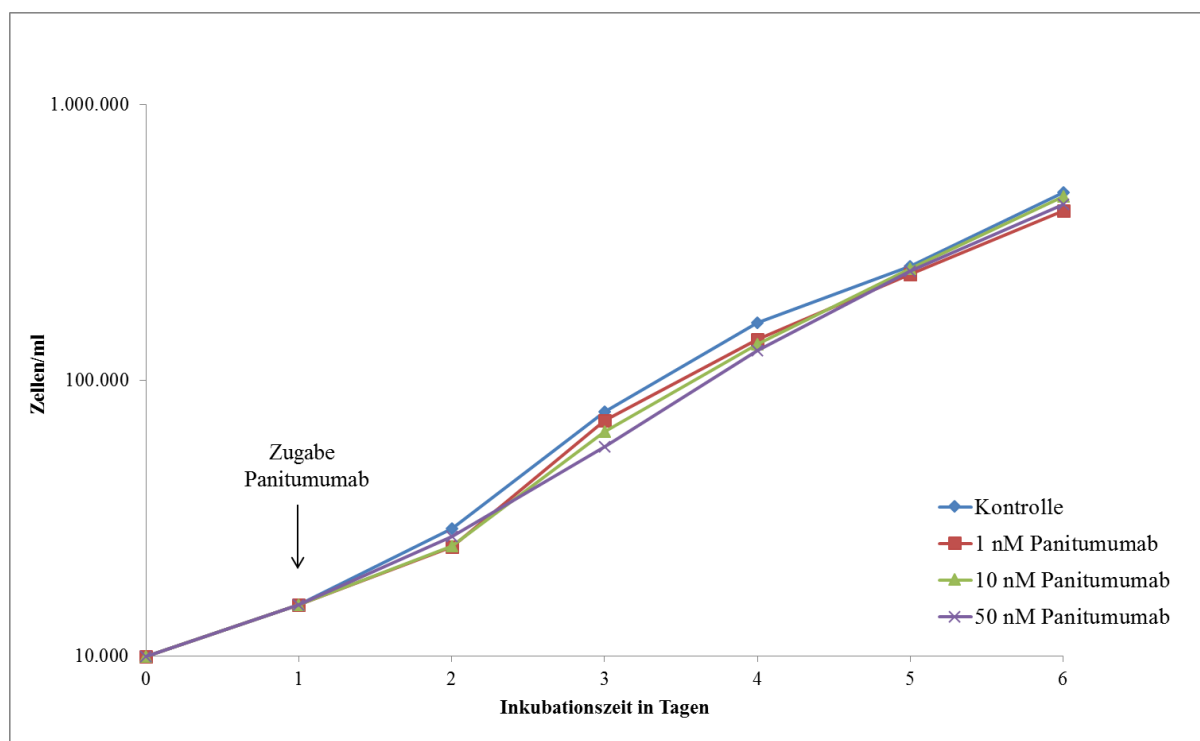


Abb. 9: Wachstumskurve der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab; Einsaatdichte  $1 \times 10^4$  Zellen/Well; Wirkstoffzugabe 24 h nach Einsaat; dargestellt ist  $n=1$ .

Die stationäre Phase wurde, wie in den vorangegangenen Versuchen mit den A549-Zellen nicht erreicht. Es deutete sich jedoch eine beginnende Plateau-Phase an. Dies konnte auch den berechneten Zellpopulationsverdopplungszeiten entnommen werden (Tab. 4), welche durch linearen Fit an die Daten ermittelt wurden.

Tab. 4: Zellpopulationsverdopplungszeiten der HT-29-Zellen in Stunden

	Zellpopulationsverdopplungszeit in Stunden						
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	MW 1.-6. Tag
Kontrolle	38,8	26,1	17,0	22,3	35,6	26,8	27,8
1 nM	38,8	34,3	16,2	24,7	30,6	31,2	29,3
10 nM	38,8	34,5	17,6	24,7	30,6	27,6	29,0
50 nM	38,8	29,4	22,2	21,0	25,0	30,0	27,7

Im Vergleich der drei Ansätze mit Wirkstoff und der Kontrolle zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Wachstum. Es konnte also kein wachstumshemmender Effekt von Panitumumab auf die HT-29-Zellen festgestellt werden. Das Wachstumsverhalten der HT-29-Zellen ließ sich durch die Zugabe von Panitumumab unter den genannten Bedingungen somit nicht beeinflussen. Damit wurden die Ergebnisse von TIEMANN *et. al.* (2011) bestätigt und der Versuch nicht nochmals wiederholt.

### 3.1.3 Wachstumskurven der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und Sorafenib

Da Panitumumab auf das Wachstum der HT-29-Zellen keinen Einfluss zu haben schien, wurde der in der Literatur beschriebene Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib eingesetzt. Er sollte die Tumorzellen für den Antikörper sensibilisieren, indem er die ligandenunabhängig-daueraktivierte Raf-Kinase blockiert und der EGFR-Antagonist so wirken kann. Hierzu wurden den Zellen 4  $\mu$ M bzw. 8  $\mu$ M Sorafenib in Kombination mit 50 nM Panitumumab hinzugefügt. Um den alleinigen Einfluss von Sorafenib differenzieren zu können, gab es auch Ansätze nur mit Sorafenib in den genannten Konzentrationen. Die Einsaatdichte betrug 1 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Well. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abb. 10 dargestellt.

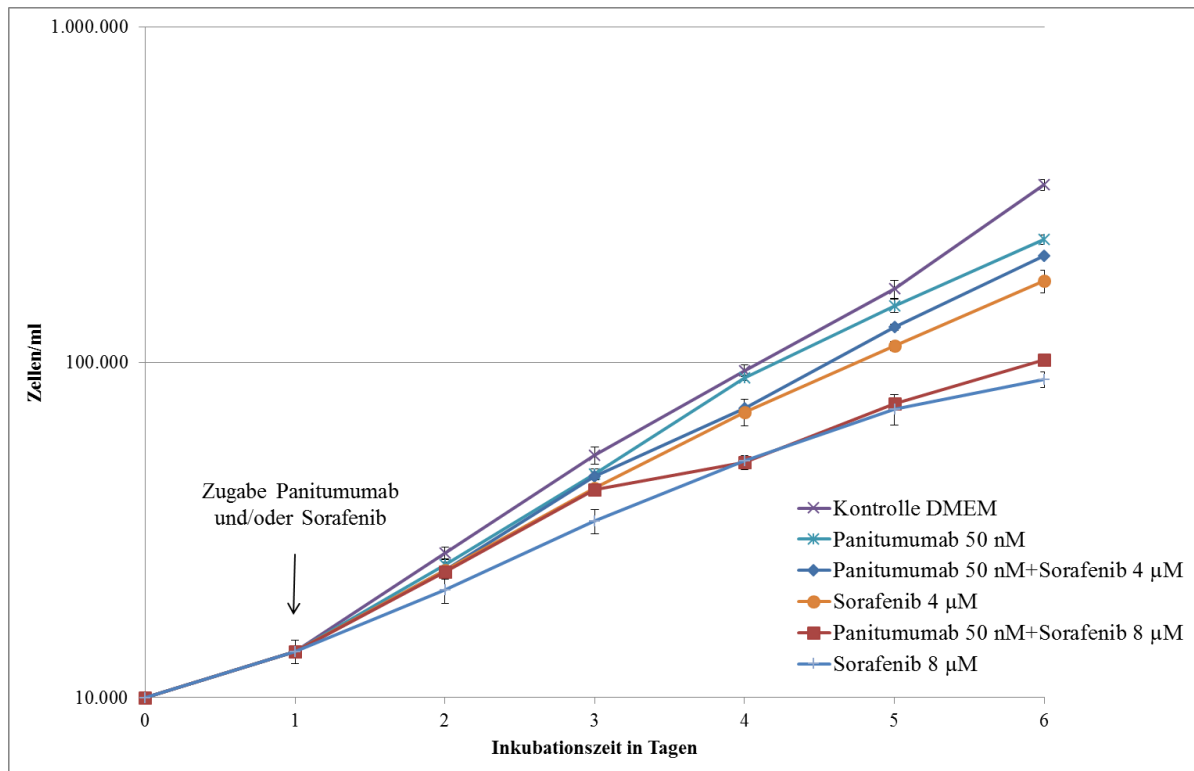


Abb. 10: Wachstumskurve der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab (1 nM- 50 nM) und/oder Sorafenib (4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M) und der Inkubationszeit; Einsaatdichte  $1 \times 10^4$  Zellen/Well; Wirkstoffzugabe 24 h nach Einsaat; dargestellt sind MW (n=1)

Wie aus Abb. 10 ersichtlich, war das Wachstum der unbehandelten HT-29-Zellen (Kontrolle DMEM) sowie der mit 50 nM Panitumumab behandelten Zellen mit denen aus der bereits durchgeführten Wachstumskurve vergleichbar (vgl. Abb. 9).

4  $\mu$ M des Multi-Kinase-Inhibitors verursachten ab dem 2. Tag eine Abnahme der Gesamtzellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, welche bis zum 6. Tag weiterhin zunahm und eine Zellzahlreduktion auf 52 % im Vergleich zur Kontrolle ausmachte. Die Zellpopulationsverdopplungszeit betrug im Mittel vom 1. bis 6. Tag 36,5 Stunden.

In Anwesenheit von Panitumumab und 4  $\mu$ M Sorafenib sank die absolute Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle an Tag 6 auf 61,5 % ab. Diese relative Abnahme der Zellzahl setzte, im Vergleich zur Kontrolle bereits ab dem 2. Tag ein. Der zusätzliche Effekt von Sorafenib machte sich ab dem 4. Tag bemerkbar, da sich hier bei den Zellpopulationsverdopplungszeiten des Ansatzes mit 50 nM Panitumumab und dem der kombinierten Behandlung mit Sorafenib (4  $\mu$ M) eine Differenz von 11,1 Stunden ergab. Anschließend nahm diese Differenz wieder ab. Jedoch lag am 6. Tag unter dem gemeinsamen Einfluss von Panitumumab und Sorafenib (4  $\mu$ M) eine Reduzierung der absoluten Zellzahl um 10 % im Vergleich zur Probe mit Panitumumab vor.

Die Kombination aus Panitumumab und 8  $\mu\text{M}$  Sorafenib bewirkte bei den HT-29-Zellen ebenfalls ab dem 2. Tag eine Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle. Die absolute Zellzahl sank am 6. Tag auf 30 % der Kontrolle, und lag somit deutlich unter der Zellzahl der Ansätze mit Panitumumab und 4  $\mu\text{M}$  Sorafenib.

Analog zur Wirkung von 4  $\mu\text{M}$  Sorafenib sank die Proliferation der HT-29-Zellen und dem Einfluss von 8  $\mu\text{M}$  desselben Wirkstoffes weiterhin ab. Die Zellpopulationsverdopplungszeit betrug im Mittel vom 1. bis 6. Tag 49,3 Stunden.

Bei Vergleich der alleinigen Sorafenib-Gabe mit der kombinierten Wirkung von Panitumumab und Sorafenib wurde deutlich, dass Sorafenib allein (in der jeweiligen Konzentration) eine stärkere Wachstumshemmung bewirkt als bei kombinierter Gabe mit dem Antikörper. Die Vermutung, der Multi-Kinase-Inhibitor könnte den Einfluss des EGFR-Antagonisten auf die HT-29-Zellen positiv beeinflussen, ließ sich damit nicht bestätigen. Denn, wie aus Abb. 10 zu erkennen ist, hat eine kombinierte Therapie zwar einen höheren Effekt als Panitumumab allein, jedoch ist diese Wirkung durch die Sorafenib-Gabe bedingt.

Da sich in den vorangegangenen Experimenten zeigte, dass die HT-29-Zellen kein Ansprechen auf die Antikörpertherapie zeigten und dies sowohl mit den Ergebnissen von TIEMANN *et al.* als auch mit der aktuellen Literatur übereinstimmt, wurde im Weiteren der Fokus auf die Bronchialkarzinomzellen A549 gelegt.

### 3.2 Zellzyklusanalysen

Es sollte untersucht werden, welche Effekte die Behandlung der Zellen mit Panitumumab, die Bestrahlung oder deren Kombination auf den Zellzyklus hat. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde deshalb für die A549-Zellen an drei ausgewählten Zeitpunkten (12, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung) die Verteilung der Zyklusphasen innerhalb einer Zellpopulation analysiert. In den Abb. 11 - 13 ist jeweils der Anteil (in %) der Zellen, die sich in den jeweiligen Phasen des Zyklus befanden, gemessen an der Gesamtheit aller Zellen (100 %) der Probe, graphisch dargestellt.

#### 3.2.1 Zellfixierung 12 Stunden nach Bestrahlung

In diesem Ansatz wurden die Zellen 12 Stunden nach der Bestrahlung fixiert (Abb. 11).

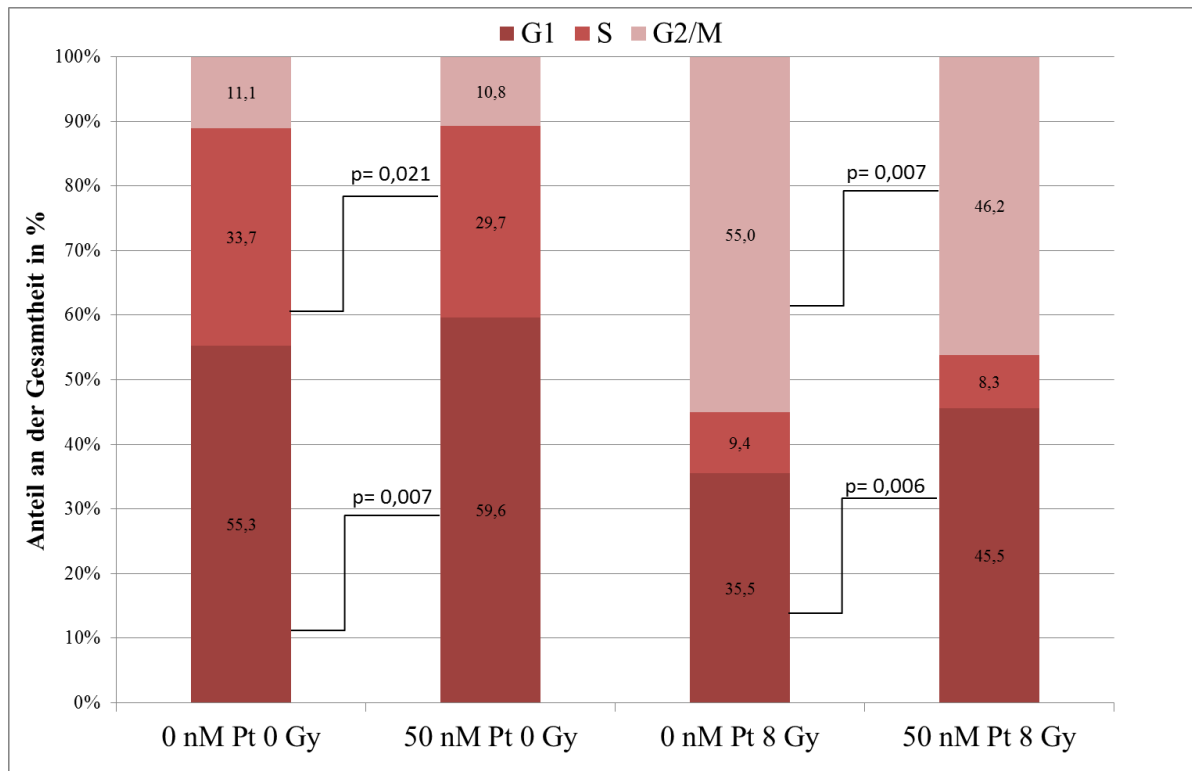


Abb. 11: Zellzyklusanalysen der A549-Zellen bei Inkubation mit Panitumumab und/oder Bestrahlung, Fixierungszeitpunkt 12 h nach Bestrahlung; dargestellt sind MW (n=4), p = Signifikanz, Pt = Panitumumab.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 nM Panitumumab, 0 Gy) ließ sich in der nur mit Wirkstoff behandelten Probe eine Zunahme der G1-Phase-Zellen erkennen, wohingegen der Anteil der Zellen in der S-Phase abnahm. Beide Unterschiede waren gering aber signifikant (G1-Phase:  $p = 0,007$ ; S-Phase:  $p = 0,021$ ). Der Anteil der G2/M-Phase-Zellen wies durch den Einfluss von Panitumumab keinen signifikanten Unterschied auf.

Nach alleiniger Bestrahlung (ohne Panitumumab-Zugabe) nahm der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase deutlich auf Kosten der anderen Phasen zu; er wurde etwa verfünffacht ( $p < 0,001$ ). Durch die Bestrahlung nahm der Anteil der Zellen in der S- und G1-Phase signifikant ab ( $p < 0,001$ ). Bei zusätzlicher Behandlung der bestrahlten Zellen mit Panitumumab war durch den Einfluss des Antikörpers wiederum ein höherer Anteil der Zellen in der G1- und ein geringerer Anteil der Zellen in der G2/M-Phase zu erkennen, der mit  $p = 0,006$  (G1-Phase) bzw.  $p = 0,007$  (G2/M-Phase) signifikant war. Im Vergleich der nativen Probe (0 nM Panitumumab, 0 Gy), zur kombiniert behandelten Probe (50 nM Panitumumab, 8 Gy) waren in der Verteilung der Zellen in den Zyklusphasen ebenfalls deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Zellen in der G2/M-Phase nahmen in ihrem Anteil signifikant ( $p < 0,001$ ) zu, wohingegen die Zellen der anderen Phasen anteilig signifikant weniger wurden ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.2 Zellfixierung 24 Stunden nach Bestrahlung

Um den zeitlichen Verlauf des Einflusses von Bestrahlung und Antikörpertherapie beurteilen zu können, wurden weitere Untersuchungszeitpunkte gewählt. Die Ergebnisse der nach 24 Stunden fixierten Zellen sind in Abb. 12 dargestellt.

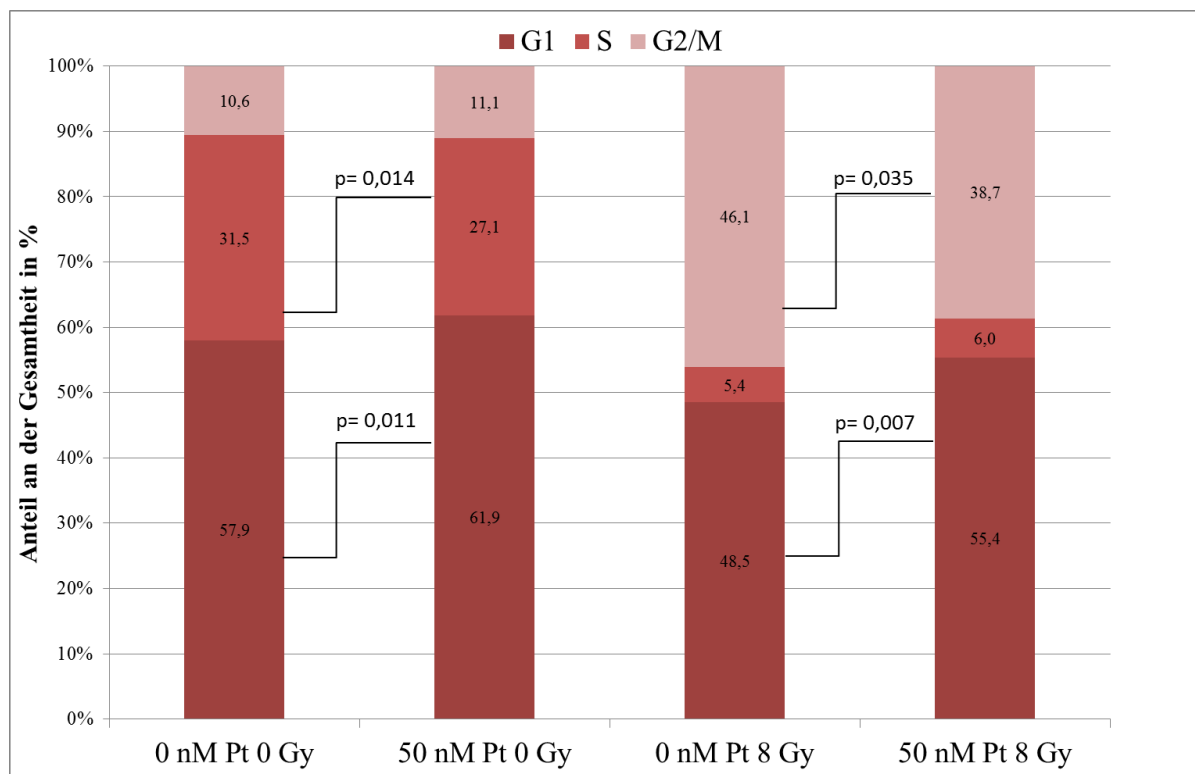


Abb. 12: Zellzyklusanalysen der A549-Zellen bei Inkubation mit Panitumumab und/oder Bestrahlung; Fixierungszeitpunkt 24 h nach Bestrahlung; dargestellt sind MW (n=4), p = Signifikanz, Pt = Panitumumab.

Auch 24 Stunden nach der Bestrahlung hatte Panitumumab einen signifikanten Einfluss auf die Zellzyklusphasen. Im Vergleich der mit Panitumumab (0 Gy) behandelten Probe mit der Kontrolle (0 nM Panitumumab, 0 Gy) nahm der Anteil der Zellen der G1-Phase signifikant zu, hingegen nahmen die S-Phase-Zellen signifikant ab (G1-Phase:  $p = 0,011$ ; S-Phase:  $p = 0,014$ ). Ein signifikanter Unterschied der Anzahl der Zellen in der G2/M-Phase ließ sich hier unter Einfluss von Panitumumab nicht nachweisen.

Weiterhin konnte durch die zusätzlich zur Bestrahlung (0 nM Panitumumab, 8 Gy) angewandte Therapie mittels Antikörper (50 nM Panitumumab, 8 Gy) eine signifikante Zunahme der Zellen in der G1- ( $p = 0,007$ ) und eine signifikante Abnahme der Zellen in der G2/M- ( $p = 0,035$ ) Phase nachgewiesen werden. Die S-Phase-Zellen nahmen nur geringfügig zu.



Im Vergleich der Kontrolle (0 nM Panitumumab, 0 Gy) und der Probe, die sowohl bestrahlt als auch mit dem EGFR-Antagonisten behandelt wurde, wird der kombinierte Effekt der Therapie deutlich. Die G2/M-Phase-Zellen nahmen signifikant zu ( $p < 0,001$ ) während die S-Phase-Zellen signifikant ( $p < 0,001$ ) abnahmen. Ein signifikanter Unterschied im Anteil der Zellen in der G1-Phase ließ sich mit  $p = 0,057$  nicht feststellen, jedoch die Tendenz zur Abnahme durch die simultane Therapie.

### 3.2.3 Zellfixierung 48 Stunden nach Bestrahlung

In der folgenden Abb. 13 sind die Ergebnisse zum dritten Fixierungszeitpunkt dargestellt.

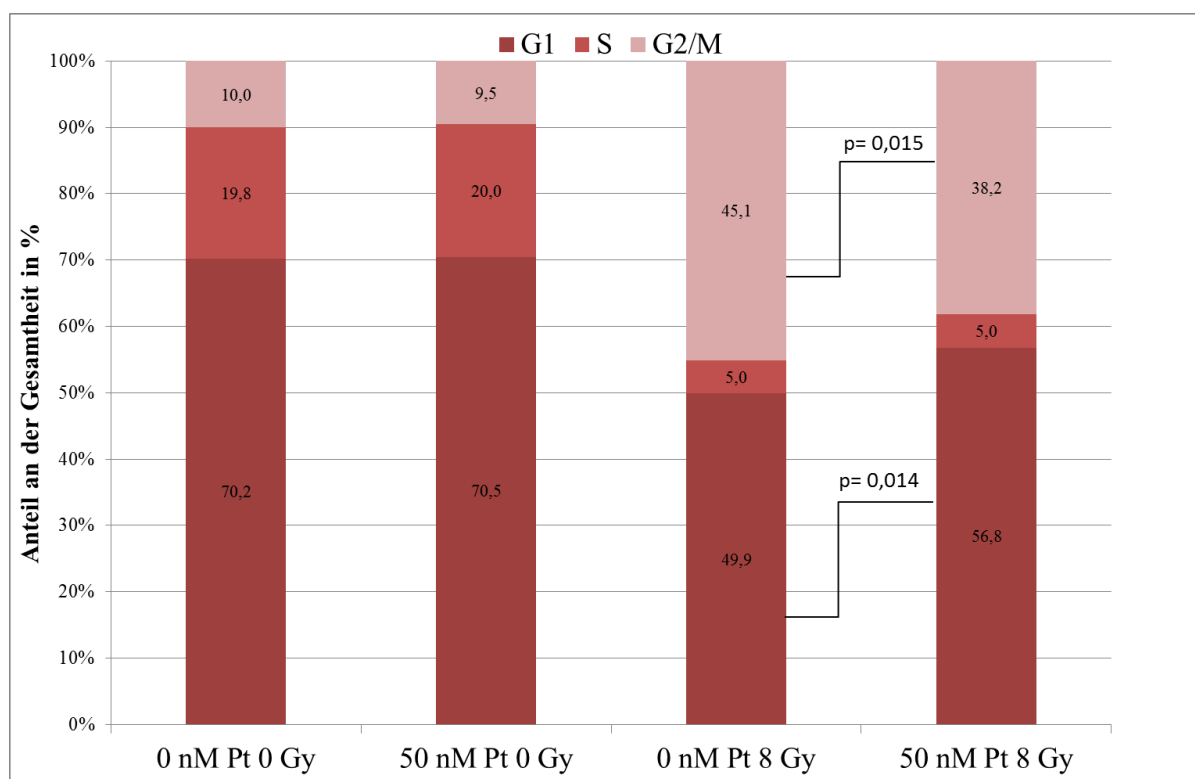


Abb. 13: Zellzyklusanalysen der A549-Zellen bei Inkubation mit Panitumumab und/oder Bestrahlung; Fixierungszeitpunkt 48 h nach Bestrahlung; dargestellt sind MW (n=4), p = Signifikanz, Pt = Panitumumab.

Zum Zeitpunkt von 48 Stunden nach der Bestrahlung fiel auf, dass durch den Einfluss von Panitumumab alleine (50 nM Panitumumab, 0 Gy) im Vergleich zur Kontrolle (0 nM Panitumumab, 0 Gy) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verteilung der Zyklusphasen zu verzeichnen waren.

Hingegen zeigte die Kombinationstherapie (50 nM Panitumumab, 8 Gy) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (0 nM Panitumumab, 8 Gy), deutliche Unterschiede auf. Unter Einfluss

von Panitumumab stieg der Anteil der Zellen in der G1-Phase signifikant an, wohingegen die Zellen in der G2/M-Phase anteilig abnahmen (G1-Phase:  $p = 0,014$ ; G2/M-Phase:  $p = 0,015$ ). Auf den Anteil der Zellen, welche sich in der S-Phase befanden, hatte die Behandlung keinen Einfluss.

Im Vergleich der Kontrolle (0 nM Panitumumab, 0 Gy) und der sowohl bestrahlten als auch mit Wirkstoff behandelten Probe (50 nM Panitumumab, 8 Gy) waren ebenfalls signifikante Unterschiede zu verzeichnen. So nahmen unter der Behandlung die G2/M-Phase-Zellen zu ( $p < 0,001$ ), während die S-Phase-Zellen ( $p < 0,001$ ) und die G1-Phase-Zellen ( $p < 0,001$ ) abnahmen.

### 3.3 Apoptose-Nekrose Messungen

Diese Methode wurde angewandt, um zu prüfen, ob es durch Panitumumab oder die kombinierte Behandlung mit ionisierender Strahlung bei den A549-Zellen zu einer Apoptose- bzw. Nekroseinduktion kommt.

Beispielhaft für die Dot Plots der einzelnen durchflusszytometrischen Messungen ist in Abb. 14 das Dot Plot einer Probe mit 50 nM Panitumumab, 8 Gy dargestellt.

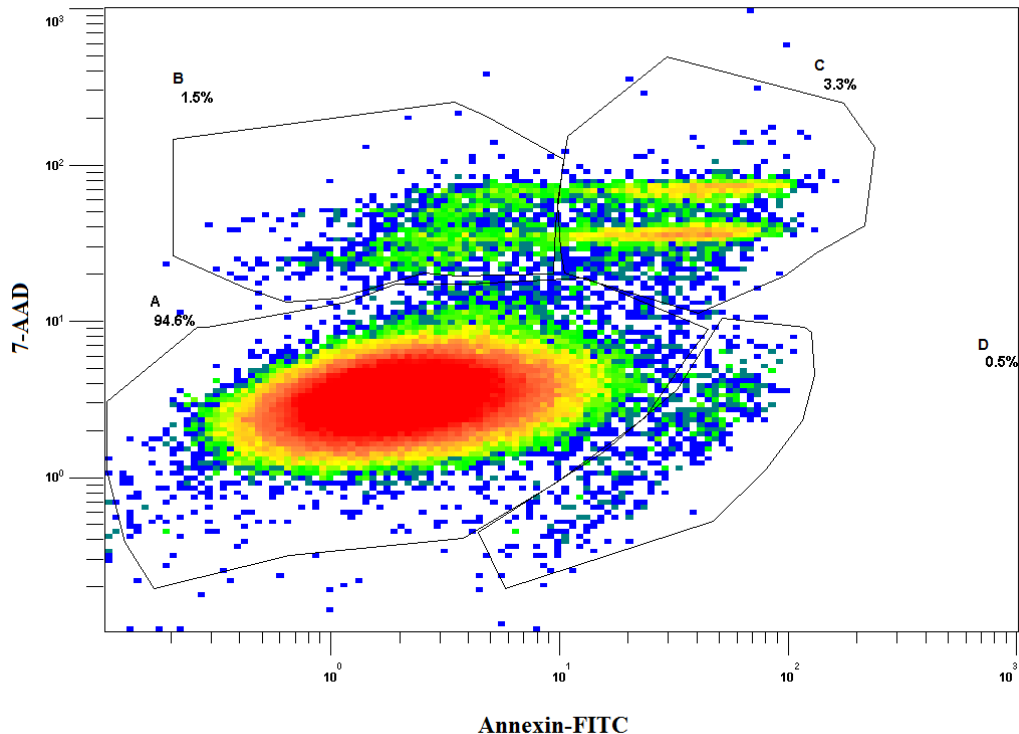


Abb. 14: Dot Plot einer Apoptose-Nekrose-Messung der A549-Zellen behandelt mit 50 nM Panitumumab und 8 Gy, Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und 7-AAD; gated, A= vitale Zellen, ungefärbt, B= Nekrose, Färbung durch 7-AAD, C= Zellkernfragmente, Doppelfärbung, D= Apoptose, Färbung durch Annexin V-FITC, Angaben anteilig an der Gesamtpopulation in Prozent.

Die Ergebnisse der in der Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen erlangten Daten sind in der nachfolgenden Abb. 15 grafisch dargestellt.

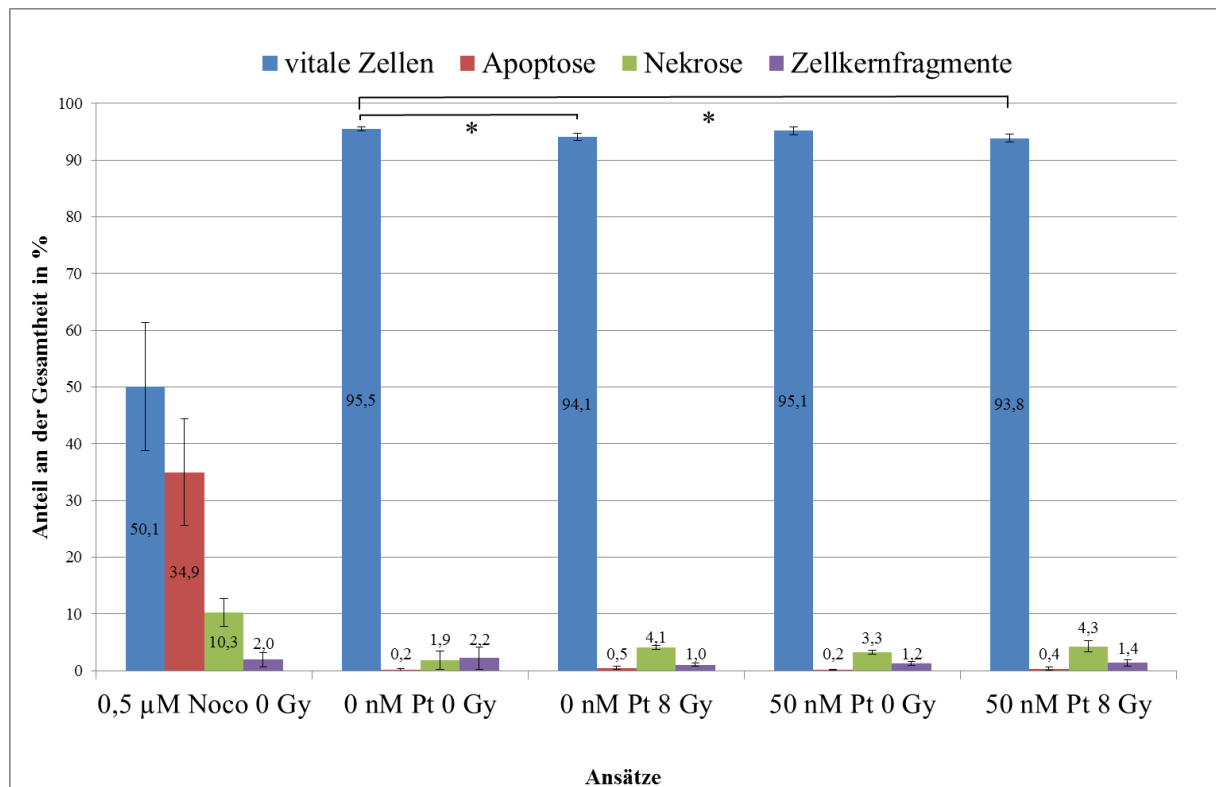


Abb. 15: Ergebnisse der Apoptose-Nekrose Messungen der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab 50 nM und/ oder ionisierender Strahlung (8 Gy); Wirkstoffzugabe 72 h vor Bestrahlung; Fixierungszeitpunkt 24 h nach Bestrahlung; dargestellt sind MW  $\pm$  SD (n=3); Noco: Nocodazol; Pt: Panitumumab; \*:  $p \leq 0,05$ .

Anteilig zur jeweiligen Gesamtpopulation der Probe ist in Abb. 15 die Verteilung der einzelnen Fraktionen dargestellt. So wurden vitale von apoptotischen und von bereits nekrotischen Zellen unterschieden. Hinzu kam der Nachweis von Zellkernfragmenten.

Die mit Nocodazol behandelten Positivkontrollen bestanden zum gewählten Zeitpunkt im Durchschnitt zur Hälfte aus vitalen Zellen. Die apoptotischen Zellen machten 35 %, die toten Zellen 10 % aus. Nocodazol konnte somit bei den A549-Zellen Apoptose induzieren sowie den Anteil an nekrotischen Zellen steigern. Diese Effekte waren im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant mit  $p = 0,002$  für die vitalen Zellen,  $p = 0,003$  für apoptotische Zellen und  $p = 0,007$  für nekrotische Zellen.

Die vier weiteren Proben wiesen dahingegen untereinander ein sehr ähnliches Verteilungsmuster auf. Den größten Anteil bei allen Proben bildeten die vitalen Zellen mit ca. 95 %. Der Anteil der apoptotischen Zellen betrug nie mehr als 0,5 %. Die beiden bestrahlten Proben hatten einen, wenn auch kleinen absoluten, signifikant ( $p \leq 0,05$ ) geringeren Anteil an

vitalen Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Fraktion der nekrotischen Zellen der bestrahlten Probe nahm im Vergleich zur Kontrolle zu (0 Gy: 1,9 %; 8 Gy: 4,1 %). Dies war jedoch im Rahmen der Standardabweichungen nicht signifikant.

Eine Induktion von Apoptose und Nekrose der A549-Zellen durch Panitumumab konnte nicht festgestellt werden. Allein der Einfluss der ionisierenden Strahlung konnte den Anteil der vitalen Zellen reduzieren.

### 3.4 Western Blot Analysen

Mit Hilfe dieser Methode konnten gezielt Proteine aus der Signalkaskade des EGFR nachgewiesen werden. So ließen sich Rückschlüsse über den Einfluss von Panitumumab und ionisierender Strahlung auf die Genexpression und andere intrazellulär ablaufende Prozesse ziehen. Für die Versuche wurden zwei Proteine gewählt. Zum einen der EGF- Rezeptor in seiner nichtphosphorylierten Form und zum anderen das Protein Stat-1, welches in der Signalkaskade des EGFR eine wichtige Rolle spielt.

In einer Reihe von Vorversuchen wurden die geeigneten Konzentrationen der Antikörper bestimmt. Die Auswertungen beruhen auf jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

#### 3.4.1 Expression von EGFR

Für die Ergebnisse zur Detektion von EGFR ist in Abb. 16 ein repräsentatives Beispiel dargestellt. Als Kontrolle diente das Housekeeping Protein  $\beta$ -Actin. In allen Proben zeigten sich kräftige und gleichmäßig konfigurierte Banden, welche der Proteingröße von  $\beta$ -Actin, 42 kDa, entsprachen.

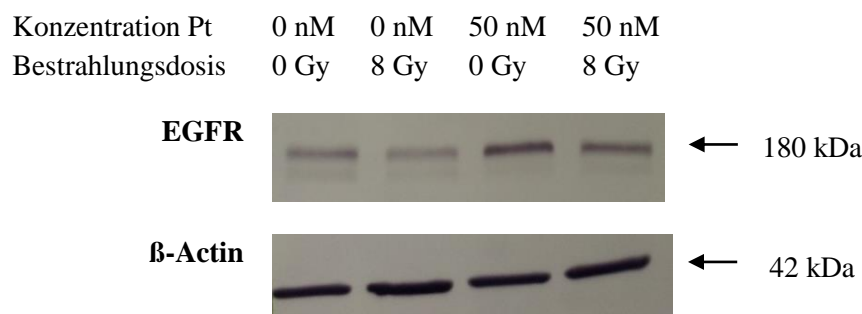


Abb. 16: Western Blot der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab 50 nM und/oder Bestrahlung (8 Gy); dargestellt ist ein repräsentatives Bsp. aus n=3; Pt: Panitumumab.

Der EGF-Rezeptor hat eine Größe von 180 kDa. Er konnte in allen vier Proben detektiert werden, was bedeutet, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen ein Nachweis des Proteins möglich war. Die Intensität der Banden korreliert dabei mit der Proteinmenge der jeweiligen Probe. Durch die alleinige Bestrahlung ließ sich im Vergleich zur Kontrolle eine weniger intensiv gefärbte Proteinbande nachweisen, was für eine verminderte Anzahl an EGFR in den Zellen spricht. Hingegen ließ sich durch Panitumumab (50 nM Panitumumab, 0 Gy) im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich stärkere Proteinbande nachweisen. Dies wiederum spricht für eine Zunahme an EGFR in den A549-Zellen unter Einfluss des EGFR-Antagonisten. Durch die zusätzliche Bestrahlung (50 nM Panitumumab, 8 Gy) zeigte sich allerdings eine Abnahme der Proteinmenge, was sich in der weniger intensiv gefärbten Proteinbande widerspiegelte. Ionisierende Strahlung hatte den erlangten Ergebnissen zufolge also eine negative Wirkung auf die Menge an EGFR in den A549-Zellen, wohingegen Panitumumab zu einer Zunahme desselben führte.

### 3.4.2 Expression von Stat-1

Zusätzlich zum EGFR wurde ein Protein aus der Signalkaskade des Rezeptors, Stat-1, nachgewiesen. Aus den Ergebnissen zur Detektion von Stat-1 ist in Abb. 17 ein repräsentatives Beispiel dargestellt.

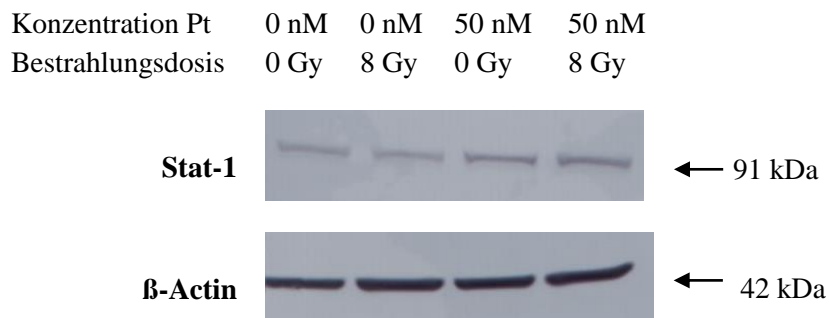


Abb. 17: Western Blot der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab 50 nM und/oder Bestrahlung (8 Gy); dargestellt ist ein repräsentatives Bsp. aus n=3; Pt: Panitumumab.

Das Housekeeping Protein  $\beta$ -Actin diente auch hier als Kontrolle über den Versuchsablauf und wurde in allen Proben in etwa gleicher Konzentration nachgewiesen.

Der Nachweis des Proteins Stat-1, welches 91 kDa groß ist, gelang ebenfalls in allen Proben, welches bestätigte, dass das Protein unter den gewählten Versuchsbedingungen zu detektieren war. Der Einfluss von Panitumumab zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (0 nM Panitumumab, 0 Gy) in einer stärker ausgeprägten Proteinbande, die mit einer höheren Menge

des Proteins einhergeht. Durch die alleinige Bestrahlung der Zellen kam es in den Versuchen zu keiner eindeutigen Zunahme der Bandenintensität. Die Probe mit kombinierter Behandlung aus Antikörper und ionisierender Strahlung (50 nM Panitumumab, 8 Gy) zeigte im Vergleich mit allen übrigen Proben die stärkste Proteinbande für Stat-1, sodass davon auszugehen ist, dass in dieser Probe die höchste Proteinmenge vorhanden war.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit sollten Untersuchungen zur zytotoxischen und strahlensensibilisierenden Wirkung von Panitumumab, einem monoklonalen Antikörper, auf ausgewählte Tumorzelllinien fortgeführt werden. Dabei spielte u. a. der unterschiedliche *KRAS*-Status der gewählten Zelllinien eine entscheidende Rolle.

### 4.1 Wachstum der Zellen

Durch Wachstumskurven ließen sich sowohl das native Verhalten der beiden humanen Tumorzelllinien, als auch der Einfluss der Wirkstoffe auf das Zellwachstum beschreiben. Grundsätzlich war bei der Auswertung zu beachten, dass mit dem Coulter Counter der Firma Beckman die Größe der zu zählenden Zellen festgelegt, nicht jedoch zwischen vitalen und toten Zellen unterschieden werden konnte. So gibt die gemessene Zellzahl orientierende Werte unter der Annahme, dass die Fragmente abgestorbener Zellen im angegebenen Messspektrum nicht mehr erfasst wurden.

#### 4.1.1 Natives Wachstum der A549-Zellen und der HT-29-Zellen

In den nativen Wachstumskurven der beiden Tumorzelllinien konnte ein erster Eindruck vom Wachstumsverhalten gewonnen werden. Weiterhin konnte mittels linearer Regressionsanalyse im Abschnitt des exponentiellen Wachstums die Zellpopulationsverdopplungszeit berechnet werden.

Für die A549-Zellen ließ sich eine Zellpopulationsverdopplungszeit im Mittelwert von 21,3 Stunden und für die HT-29-Zellen von durchschnittlich 19,7 Stunden berechnen. Verglichen mit den Angaben der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) wichen die in dieser Arbeit ermittelten Verdopplungszeiten ab. Für die A549-Zellen liegt die berechnete Verdopplungszeit mit einer Differenz von ca. 19 Stunden unter der Angabe des DSMZ von rund 40 Stunden. Ähnlich verhielt es sich mit den HT-29-Zellen. Mit der berechneten Verdopplungszeit von durchschnittlich 19,7 Stunden lag der Wert deutlich unter den von der DSMZ angegebenen 40-60 Stunden. Den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zeiten, konnten jedoch bereits ähnliche Werte festgestellt werden. TIEMANN *et al.* (2011) berechnete für die Zelllinie A549 eine Zellpopulationsverdopplungszeit von 20,2 Stunden, während die HT-29-Zellen 19,9 Stunden zur Verdopplung ihrer Population benötigten, sodass hier ein Bezug zur Literatur hergestellt werden konnte.

Gründe für die Differenzen der in dieser Arbeit ermittelten Zeiten und denen der DSMZ können unterschiedliche Zusammensetzungen der Kulturmedien, insbesondere der fetalen Kälberseren sein. Weiterhin zu beachten ist, dass die verschiedenen Passagen der Zellen individuelle Wachstumspotenziale aufweisen können.

#### 4.1.2 Wachstum der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

Bei der zunächst gewählten Einsaatdichte von  $1 \times 10^3$  Zellen/Well ließ sich bei den A549-Zellen kein Effekt durch den EGFR-Antagonisten Panitumumab auf das Zellwachstum feststellen. In Anlehnung an eine Arbeit aus der Arbeitsgruppe (TIEMANN *et al.*, 2012), wurde die Einsaatdichte auf  $1 \times 10^4$  Zellen/Well erhöht. Dabei war eine Wachstumshemmung ab einer Wirkstoffinkubation von 72 Stunden zu erkennen, die nicht konzentrationsabhängig war. Am 6. Tag wurde die Zellpopulation durch Panitumumab auf 70 % der nativen Kontrolle reduziert. Damit konnten die Ergebnisse aus der o. g. Arbeit reproduziert werden und wurden deshalb nicht wiederholt. Für die Tatsache, dass erst ab einer bestimmten Einsaatdichte signifikante Aussagen über die Wirksamkeit des Antikörpers zu treffen waren, könnte die Anzahl der EGFR insgesamt pro Probe verantwortlich sein. In einer größeren Zellpopulation war es möglich, auch unter Berücksichtigung der Standardabweichungen, die Auswirkungen von Panitumumab auf die Tumorzellen darzustellen.

Die konzentrationsunabhängige Wachstumshemmung ist typisch für monoklonale Antikörper. Sind die Bindungsstellen der Rezeptoren durch den Antikörper vollständig belegt, hat eine weitere Konzentrationserhöhung keinen zusätzlichen Einfluss mehr auf die Zellen. Demnach war eine  $IC_{50}$ -Berechnung im verwendeten Konzentrationsbereich nicht möglich. Interessant zu erwähnen ist, dass es trotz der beschriebenen *KRAS*-Mutation der A549-Zellen zu einer EGFR abhängigen Hemmung des Wachstums kam. Denn *KRAS* befindet sich in den A549-Zellen in einem daueraktiven Zustand, was bedeutet, dass eine permanente, von übergeordneten Aktivatoren unabhängige Signalweiterleitung davon ausgeht. Der genaue Mechanismus, der diesem Phänomen zu Grunde liegt, ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings konnte in einer Studie gezeigt werden, dass ein kleiner Anteil von weniger als 1 % von Patienten, die eine *KRAS*-Mutation trugen, auf eine Anti-EGFR-Therapie angesprochen haben (BARDELLI *et al.*, 2010). Dies könnte auf eine spezifische Mutation von *KRAS* zurückzuführen sein.

Möglicherweise spielt auch der EGFR-Ligand Amphiregulin dabei eine entscheidende Rolle. Er wird vermehrt von humanen, *KRAS*-mutierten Tumorzelllinien, wie A549 und auch MDA-MB-231, produziert und aktiviert permanent die EGFR-Signalweiterleitung (TOULANY *et al.*,



2005b). Kommt es durch Panitumumab zur Rezeptorblockade, fällt der Effekt durch Amphiregulin weg.

Nicht nur für die A549-Zellen, sondern auch für andere *KRAS*-Mutanten, wie zum Beispiel DLD-1-Zellen (Kolonadenokarzinomzellen), ist ebenfalls eine reduzierte Zellproliferation durch den Einfluss von Panitumumab beschrieben (GIANNOPOULOU *et al.*, 2009). In der genannten Arbeit wurde Panitumumab in den Konzentrationen 20, 40, 80, 100 und 200 µg/ml eingesetzt und eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung der DLD-1-Zellen durch 80 µg/ml nach 48 Stunden beobachtet.

Unter dem Einfluss des chimären Antikörpers Cetuximab, welcher ebenso wie Panitumumab den EGF-Rezeptor blockiert, kam es zu einer tendenziellen Wachstumshemmung der A549- und FaDu-Zellen, die jedoch nicht signifikant war (KRIESEN, 2013). FaDu-Zellen sind Tumorzellen aus einem Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx und weisen den *KRAS*-Wildtyp auf (MINJGEE *et al.*, 2011). Cetuximab wurde in der o.g. Arbeit von KRIESEN in ähnlichen Konzentrationen (30 nM, 60 nM und 120 nM) verwendet wie Panitumumab in der vorliegenden Arbeit. Da Panitumumab und Cetuximab die gleiche Bindungsstelle am EGFR blockieren, nämlich Domäne III des extrazellulären Anteils des Rezeptors (SNYDER *et al.*, 2005), müssen weitere Faktoren Einfluss auf die Wirkung der Antikörper haben.

#### 4.1.3 Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

Für die Wachstumsversuche der HT-29-Zellen wurde von Anfang an die höhere Einsaatdichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Well gewählt. Obwohl es sich bei dieser Zelllinie um einen *KRAS*-Wildtyp handelt (DI NICOLANTONIO *et al.*, 2008), konnte kein Einfluss von Panitumumab auf das Wachstum der Tumorzellen beschrieben werden. Dieses Ergebnis deckte sich ebenfalls mit denen der Arbeit von TIEMANN *et al.* (2012), sodass weitere Wiederholungen nicht durchgeführt wurden. In einer anderen Studie konnte ebenfalls kein Einfluss auf das Wachstumsverhalten der HT-29- und einer anderen *KRAS*-Wildtyp-Zelllinie, Caco-2 (kolorektale Adenokarzinomzellen), durch Panitumumab erreicht werden (GIANNOPOULOU *et al.*, 2009). Eine mögliche Erklärung für das Nichtansprechen der *KRAS*-Wildtyp-Zelllinien auf den Antikörper kann die Mutation des *BRAF*-Gens sein. Denn die HT-29-Zellen besitzen das *BRAF* V600E Allel, welches in einer retrospektiven klinischen Studie bei 11 von 79 (= 14 %) der eingeschlossenen Patienten mit Wildtyp-*KRAS* gefunden wurde. Diese 11 Patienten sprachen nicht auf eine Therapie mit Panitumumab bzw. Cetuximab an. Wiederum konnte bei keinem der Therapie-Responder eine *BRAF*- Mutation festgestellt werden (DI NICOLANTONIO *et al.*,

2008). Die *BRAF*- Mutation in kolorektalen Karzinomen wird mit einer Häufigkeit von etwa 10 % beziffert (BARDELLI *et al.*, 2010).

Die A549-Zellen besitzen keine *BRAF*- Mutation. In mehreren Publikationen wurde beschrieben, dass Mutationen von *KRAS* und *BRAF* sich gegenseitig ausschließen und somit nicht gleichzeitig in einer Zelle vorkommen können (DI NICOLANTONIO *et al.*, 2008; RAJAGOPALAN *et al.*, 2002).

#### 4.1.4 Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und Sorafenib

Die o. g. Mutation von *BRAF* hat zu Folge, dass die Serin-Threonin-Kinase B-Raf ein erhöhtes Aktivitätslevel hat und demnach der MAP-Kinase-Signalweg mehr aktiviert ist als beim entsprechenden Wildtyp. In der Arbeit von DI NICOLANTONIO *et al.* (2008) wurde der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib eingesetzt, um BRAF in seiner Daueraktivität zu unterbrechen und so eine Wirksamkeit der EGFR-Antagonisten (Panitumumab und Cetuximab) zu erreichen. Für einen möglichen Erklärungsversuch der Resistenz der HT-29-Zellen gegenüber Panitumumab, wurde ein ähnlicher Versuch durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Konzentrationen von Sorafenib getestet, 4  $\mu\text{M}$  und 8  $\mu\text{M}$ . Im Wachstumsversuch der HT-29-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Therapie aus Panitumumab und Sorafenib das Zellwachstum deutlich hemmen konnte. Jedoch war für diesen Effekt der Multi-Kinase-Hemmer Sorafenib maßgebend. Denn Sorafenib als Monotherapie verursachte jeweils eine stärkere Wachstumshemmung als die entsprechende kombinierte Behandlung.

In der Arbeit von DI NICOLANTONIO *et al.* (2008) wurde, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit statt mit Panitumumab, mit Cetuximab und Sorafenib in Kombination experimentiert, wobei hier eine signifikante Proliferationshemmung der HT-29-Zellen zu verzeichnen war. Sorafenib allein hatte keinen Einfluss auf das Zellwachstum.

Die HT-29-Zellen wurden in einer weiteren Arbeit ebenfalls dem Wirkstoff Sorafenib ausgesetzt. Hierbei zeigten sich nach einer Inkubationszeit auf Soft-Agar von 10 – 14 Tagen ein Reduzierung der Zellkolonien auf etwa 40 % der Kontrolle. Sorafenib wurde in Konzentrationen von 0,01 – 5  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt (MARTINELLI *et al.*, 2010). Dieser wachstumshemmende Effekt konnte auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden.

Zusammenfassend waren an dieser Stelle die eigenen Ergebnisse, sowie die aus TIEMANN *et al.* nicht wegweisend, dass auf weitere Wiederholungen und Ausbau des Experimentes verzichtet wurde. Die Gründe für die unterschiedliche Wirkung von Sorafenib konnten nicht endgültig

geklärt werden. Im Weiteren Fokus der Arbeit lagen nun die A549-Zellen, die trotz ihrer *KRAS*-Mutation auf den EGFR-Antagonisten Panitumumab ansprachen.

## 4.2 Zellzyklus der A549-Zellen

Die Analysen des Zellzyklus wurden ausschließlich mit den A549-Zellen durchgeführt, da die HT-29-Zellen in den Wachstumskurven analog zur Arbeit von TIEMANN *et al.* (2011) kein Ansprechen auf Panitumumab zeigten und eine Kombinationstherapie mit Sorafenib ebenso nicht erfolgsversprechend war.

Mit Hilfe der Zellzyklusanalysen lassen sich Rückschlüsse auf den Effekt des Antikörpers und der kombinierten Therapie mit ionisierender Strahlung auf den Zellzyklus treffen. Daraus lassen sich wiederum indirekt Aussagen zur Empfindlichkeit bzw. Resistenz der Zellen in den entsprechenden Phasen des Zyklus gegenüber ionisierender Strahlung machen.

Wie vorab erwartet, arretierten die A549-Zellen durch die alleinige Bestrahlung in der G2/M-Phase, wie bspw. auch in den Versuchen von KRIESEN *et al.* 2013. Dies entspricht ebenfalls der aktuellen Literatur, in der ein durch Strahlung verursachter G2/M-Arrest beschrieben wird, welcher bereits bei kleineren Strahlendosen ( $< 1$  Gy) eintritt (MAITY *et al.*, 1994).

Die Ergebnisse der Messungen am Durchflusszytometer zeigten, dass Panitumumab allein zum Zeitpunkt von 12 und 24 Stunden nach der Zellbestrahlung eine signifikante Zunahme an Zellen in der G1- sowie eine Abnahme der Zellen in der S-Phase bewirkte. Zu allen drei Messzeitpunkten (12, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung) konnte weiterhin ein signifikanter G1-Arrest der A549-Zellen durch die Kombination aus ionisierender Strahlung (8 Gy) und Panitumumab (50 nM) im Vergleich zu Proben, die nur bestrahlt worden sind (0 nM Panitumumab, 8 Gy), nachgewiesen werden. Die kombinierte Behandlung der Tumorzellen verursachte auch 48 Stunden nach Bestrahlung einen Zellzyklusarrest und scheint damit der Monotherapie mit Panitumumab überlegen. Folge des Zellzyklusarrestes der Tumorzellen ist die Unfähigkeit der Zellen, in die nächste Phase überzugehen, woraus dann eine Proliferationshemmung resultiert. Der durch den EGFR-Antagonisten hervorgerufene Effekt des G1-Arrestes wurde bereits in der Literatur beschrieben. Bei der Zelllinie DU145 eines humanen Prostataadenokarzinoms konnte mittels Durchflusszytometer ein G1-Arrest nach 24 Stunden Inkubationszeit mit 40 nM Panitumumab festgestellt werden (PENG *et al.*, 1996). Bei der Zelllinie DiFi aus einem humanen Kolonadenokarzinom konnte ebenfalls ein G1-Arrest beobachtet werden, jedoch wurde hier der EGFR-Antikörper Cetuximab (10 nM, 24 Stunden Inkubation) eingesetzt (WU *et al.*, 1996).

Ein weiterer positiver Effekt, in Hinblick auf die Tumorkontrolle, ist die Wirkung der Strahlentherapie zusammen mit Panitumumab auf die A549-Zellen. Sie bewirkt eine deutliche Abnahme der Zellen in der S-Phase zu allen o. g. Messzeitpunkten, wohingegen die G1- und G2/M-Phase-Zellen zusammen über 90 % der Zellpopulationen ausmachten. Die klinische Relevanz resultiert hierbei aus der Strahlensensibilität der Tumorzellen. Wie eingangs beschrieben, sind Zellen, die sich in der S-Phase befinden am strahlenresistentesten. Da es sich in der klinischen Anwendung der Strahlentherapie meist um eine fraktionierte Tumorbestrahlung handelt, würde dies bedeuten, dass sich im Verlauf einer Radiotherapie nach mehrmaliger Bestrahlung noch mehr Zellen in strahlensensiblen Phasen befinden.

Ein weiterer theoretischer Aspekt für die Grundlage einer kombinierten Radiochemotherapie, ergibt sich daraus, dass der EGF-Rezeptor auch Liganden-unabhängig, nämlich durch ionisierende Strahlung, aktiviert werden kann. So können in Tumorzellen, die EGFR überexprimieren, durch Strahlung Überlebens- und Proliferationsmechanismen via PI3K-AKT- und RAS-MAPK-Signalweg aktiviert werden (TOULANY, 2006). Diese Form der Strahlenresistenz kann durch die gleichzeitige Gabe des EGFR-Antikörpers eingeschränkt werden, da Panitumumab durch die Rezeptorblockade die strahleninduzierte Autophosphorylierung verhindert bzw. eingrenzt (TOULANY *et al.*, 2005a).

Ein ähnlicher Effekt wurde auch für den chimären monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab (C225, Erbitux®) beschrieben. HUANG *et al.* (2000) stellten mittels Zellzyklusanalysen am Durchflusszytometer fest, dass es unter einer kombinierten Therapie aus Cetuximab und ionisierender Strahlung zu einer Akkumulation der Zellen in den radiosensibleren Phasen (G1 und G2/M) kommt. Die dazu verwendete Zelllinie SCC-13Y (aus einem squamösen Zellkarzinom) überexprimierte nachweislich den EGF-Rezeptor (HUANG *et al.*, 2000).

In einem, zu dem der vorliegenden Arbeit ähnlichen, Versuchsaufbau wurden A549-Zellen mit dem Antikörper Cetuximab behandelt und hinsichtlich des Zellzyklus untersucht. Dabei arretierten die Tumorzellen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden (30 µM Cetuximab) in der G0/G1-Phase (KRIESEN, 2013).

Die erlangten Ergebnisse der durchgeführten Versuchsreihen ließen sich also in den Kontext der Literatur einfügen und bestätigten diese.

### 4.3 Apoptose-Nekrose-Induktion unter Einfluss von Panitumumab

Da unter Einfluss von Panitumumab ab dem 3. Tag im Vergleich zur Kontrolle eine Hemmung des Wachstums beobachtet werden konnte (vgl. Kap. 3.1.1), sollte mit dieser Methode differenziert werden, ob Panitumumab möglicherweise eine Induktion der Apoptose bzw.

Nekrose bei den A549-Zellen bewirkt. In den drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen konnte eine signifikante Abnahme des Anteils an vitalen Zellen durch alleinige Bestrahlung und die kombinierte Therapie mit Panitumumab im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung und einer Wirkstoffinkubation von insgesamt 96 Stunden konnte hingegen keine signifikante Apoptoseinduktion durch den Antikörper festgestellt werden. Der Anteil an apoptotischen Zellen blieb in allen Proben (ausgenommen der Positivkontrolle)  $\leq 0,5\%$ . Eine Tendenz zur Zunahme der nekrotischen Zellanteile ließ sich sowohl bei alleiniger Bestrahlung und alleiniger Antikörpertherapie als auch bei der kombinierten Behandlung beobachten. Die beobachteten Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Als Positivkontrolle der Versuche diente Nocodazol (vgl. Kap. 2.7.1). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle waren signifikant mehr apoptotische Zellen vorhanden. Dies gab gleichzeitig Auskunft darüber, dass die A549-Zellen in der Lage waren, durch Apoptose zu sterben. Ebenso waren signifikant mehr nekrotische Zellen und weniger vitale Zellen in der Positivkontrolle vorhanden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die allgemein in der Literatur formulierte Apoptoseinduktion durch Panitumumab (TOFFOLI *et al.*, 2007) konnte in der vorliegenden Arbeit unter den genannten Bedingungen für die A549-Zellen nicht bestätigt werden. Die erlangten Ergebnisse gehen jedoch konform mit anderen bereits in der Literatur beschriebenen Daten. GIANOPOULOU *et al.* (2009) beschrieb den Effekt von Panitumumab auf die Zelllinien DLD-1, Caco-2 sowie HT-29, welche alle aus Kolonadenokarzinomen stammen und wovon lediglich die DLD-1-Zellen *KRAS*-mutiert sind. Nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden mit 80  $\mu\text{g/ml}$  des Antikörpers konnte ebenfalls für keine der drei Zelllinien eine Induktion von Apoptose, Nekrose oder eines Zellzyklusarrestes festgestellt werden, unabhängig vom jeweiligen *KRAS*-Status.

In *In-vivo*-Experimenten, bei denen Nacktmäusen verschiedene Tumorzelllinien subkutan injiziert und anschließend zweimal wöchentlich mit 1 mg Panitumumab (intraperitoneal) für insgesamt drei Wochen behandelt wurden, konnte ein Anti-Tumor-Effekt auf den EGFR-Antikörper zurückgeführt werden. Dafür wurde die Tumorgöße der Mäuse zweimal wöchentlich gemessen, wobei auffiel, dass der Effekt abhängig von der EGF-Rezeptor-Anzahl pro Zelle war. Ab einer Anzahl von 17.000 EGFR/Zelle, wie sie z.B. in den HS766T-Zellen (Pankreaskarzinom) zu finden waren, ließ sich eine signifikante Reduktion der Tumorgöße im Vergleich zu Kontrollen feststellen. Hingegen hatte Panitumumab keinen Einfluss auf die Tumorgöße der HT-29-Zellen, für welche eine EGFR-Anzahl von 9.000/Zelle bestimmt wurde (YANG *et al.*, 2001).

Für Cetuximab, einen weiteren EGFR-Antikörper (s. o.), welcher die gleiche Bindungsstelle am EGF-Rezeptor blockiert wie Panitumumab, konnte in *In-vitro*-Experimenten an DiFi-Zellen eine Zunahme der Apoptose beobachtet werden bei einer Konzentration von 10 nM (WU *et al.*, 1995).

Der EGF-Rezeptor und die von ihm ausgehenden Signalkaskaden haben Einfluss auf wichtige Prozesse wie bspw. Angiogenese, Zellwachstum sowie den Schutz vor Apoptose (vgl. Kap. 1.3). Aus der Blockade des EGFR durch einen spezifischen Antikörper wie Panitumumab lassen sich also Anti-Tumor-Effekte wie Apoptoseinduktion oder Zellproliferationshemmung ableiten, welche für die klinische Anwendung in Hinblick auf die Tumorkontrolle von entscheidender Bedeutung sind.

Unter den genannten Bedingungen konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Induktion von Apoptose durch Panitumumab bei den A549-Zellen beobachtet werden.

#### 4.4 Expressionsanalysen der A549-Zellen

Um den Mechanismus von Panitumumab auf zellulärer Ebene weiter zu untersuchen, wurde mittels Western Blot Analyse gezielt die Expression des EGF-Rezeptors und Stat-1, eines Proteins der Signalkaskade, analysiert.

##### 4.4.1 *Expression von EGFR*

Durch den Einfluss der Antikörpertherapie ließ sich in den A549-Zellen ein vermehrter EGFR-Anteil nachweisen. Auch durch die Kombinationsbehandlung von Panitumumab und Bestrahlung zeigte sich eine stärkere Proteinbande im Vergleich zur Kontrolle.

Ausgehend davon, dass die Intensität der Bandenfärbung im Western Blot mit der Menge des nachzuweisenden Proteins korreliert, entspricht die Proteinbande in Abb. 16 nach kombinierter Behandlung mit dem Antikörper und Bestrahlung der größten Menge an EGFR.

Die weniger intensiven Proteinbanden der beiden bestrahlten Proben gehen mit Ergebnissen einer Arbeit von DITTMANN *et al.* (2005) einher, in welcher gezeigt werden konnte, dass durch Bestrahlung der A549-Zellen die Phosphorylierungsrate des EGFR zunahm. Denn durch den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primärantikörper gegen EGFR wurden nur nicht-phosphorylierte Rezeptoren detektiert. Dies bedeutet, dass in Panitumumab behandelten Proben nicht mehr EGF-Rezeptoren expremiert wurden, sondern verhältnismäßig mehr nicht-phosphorylierte Rezeptoren im Vergleich zu bestrahlten Proben in der Zelle vorhanden waren. FREEMAN *et al.* (2009) untersuchten mittels Western Blot, inwiefern Panitumumab die Liganden-induzierte Phosphorylierung des EGFR *in-vitro* an Wildtyp-EGFR und EGFR-

mutierten Zellen aus Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (engl: NSCLC) beeinflussen kann. Dazu wurden u. a. auch A-549 Zellen (EGFR-Wildtyp) verwendet. Es konnte festgestellt werden, dass Panitumumab sowohl in Wildtyp-EGFR Zellen (A549) als auch in EGFR-mutierten Zellen (NCH-H1975) die Liganden-induzierte Phosphorylierung des Rezeptors hemmt (FREEMAN *et al.*, 2009). Diese Erkenntnis passt zu den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen, dass in Zellen, die mit Panitumumab inkubierten, der verhältnismäßig größte Anteil an EGFR (nicht-phosphoryliert) nachgewiesen werden konnte.

Ein für den klinischen Gebrauch übliches Verfahren zur Bestimmung der Anzahl der EGFR-Genkopien ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), welche auch für die Studien verwandt wurde (z. B. SARTORE-BIANCHI *et al.*, 2007). Mit ihrer Hilfe sollte bereits vor der Therapie eines metastasierten Kolorektalen Karzinoms vom *KRAS*-Wildtyp ein Ansprechen auf Panitumumab hervorgesagt werden. ÅLGARS *et al.* (2011) sahen in dieser Technik jedoch den Nachteil in der Auswertung der Ergebnisse, welche erschwert sein könnte und bestimmte stattdessen die Genkopieanzahl von EGFR mit Silber-*in-situ*-Hybridisierung (SISH). Die SISH wurde vollautomatisch durchgeführt und hatte den Vorteil, dass das Chromogen stabiler als das der FISH war (ÅLGARS *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass *KRAS*-Wildtyp-Tumoren mit einer gesteigerten Genanzahl für EGFR zu 82 % auf die Anti-EGFR-Therapie ansprachen (ÅLGARS *et al.*, 2011).

#### 4.4.2 Expression von Stat-1

Die Familie der *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) greift auf Ebene der Genexpression in eine Reihe von Prozessen ein, wie z.B. Zellproliferation, Zellüberleben und Apoptose (KIM *et al.*, 2007).

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung der A549-Zellen mit Panitumumab eine höhere Menge an Stat-1-Protein in den Zellen nachweisbar war. Durch zusätzliche Bestrahlung zeigte sich eine noch intensivere Proteinbande, was mit einer weiteren Mengenzunahme von Stat-1 vereinbar ist.

STAT-1 hat u. a. die Rolle eines Tumorsuppressors und besitzt die Fähigkeiten, Apoptose zu fördern und das Zellwachstum zu hemmen. Dabei kann es als Koaktivator von p53, einem Schlüsselprotein der Apoptose, dienen oder aber auch direkt mit p53 interagieren (TOWNSEND, 2003). Weiterhin vermittelt Stat-1 Signale als Transkriptionsfaktor auf Genexpressionsebene und kann direkt das antiapoptotische Protein NF- $\kappa$ B hemmen (BATTLE *et al.*, 2002). Ein Anti-Tumor-Effekt von Stat-1 konnte im Tierexperiment nachgewiesen werden. So litten Mäuse, denen dieses Protein fehlte, unter einer höheren Rate an spontan auftretenden Tumoren und

einer schnelleren Wachstumsgeschwindigkeit der Neoplasien im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (BATTLE *et al.*, 2002).

Eine mögliche Erklärung, wie es zu der vermehrten Konzentration von Stat-1 in den A549-Zellen kommen konnte, besteht in der Beobachtung, dass nukleäre Ansammlungen von EGFR (nuclear EGFR, nEGFR) in Zusammenarbeit mit Stat-3 die Genexpression von Stat-1 aktiviert (HAN *et al.*, 2012a). Zu einer Zunahme von nEGFR kommt es z. B. durch ionisierende Strahlung, welche die Translokalisierung von perinukleär vorhanden EGFR in den Zellkern bewirkt (DITTMANN *et al.*, 2005), oder durch eine gegen den EGF-Rezeptor gerichtete Therapie (HAN *et al.*, 2012b).

LIN *et al.* haben in *In-vitro*-Experimenten zeigen können, dass es auch nach Stimulation mit EGF oder TGF- $\alpha$  zu einem messbar höheren Level an nEGFR mit einem peak bereits nach 15-30 Minuten kam (LIN *et al.*, 2001).

Eine erhöhte Konzentration von Stat-1 lässt demnach eine Apoptoseinduktion vermuten.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Panitumumab und ionisierender Strahlung auf die *KRAS*-mutierte Zelllinie A549 *in vitro* untersucht. Denn in der klinischen Anwendung wird der EGFR-Antagonist bisher nur Patienten zugänglich gemacht, welche nachweislich einen Tumor mit dem *KRAS*-Wildtyp besitzen.

Die erlangten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die A549-Zellen zeigten im Wachstumsversuch unter Einfluss von Panitumumab eine konzentrationsunabhängige Wachstumshemmung, trotz vorhandener *KRAS*-Mutation. Im Vergleich dazu ließen sich HT-29-Zellen (*KRAS*-Wildtyp) in ihrem Wachstum durch den Antikörper nicht beeinflussen.
2. Die A549-Zellen reagierten nach einer Inkubationszeit mit Panitumumab von 84 und 96 Stunden mit einem G1-Arrest. Die alleinige Bestrahlung mit 8 Gy rief bei den Tumorzellen eine Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase vor. Durch die kombinierte Therapie mittels EGFR-Antagonisten und ionisierender Strahlung befanden sich weniger als 10 % der Zellpopulation in der am meisten strahlenresistenten S-Phase. Dies ist ein positiver Hinweis für die klinische Anwendung in Hinblick auf eine bessere Tumorkontrolle durch die simultane Behandlung.
3. Anhand durchflusszytometrischer Analysen konnte eine signifikante Abnahme der vitalen A549-Zellen anteilig zur Gesamtpopulation nach ionisierender Strahlung mit 8 Gy und nach kombinierter Therapie mit Panitumumab beobachtet werden.
4. Unter den genutzten Bedingungen konnte Panitumumab bei den A549-Zellen keine Induktion von Apoptose oder Nekrose hervorrufen. Es bestand jedoch eine Tendenz zur Zunahme der nekrotischen Fraktion durch die kombinierte Behandlung mit Panitumumab und Bestrahlung.
5. Durch den Einfluss von 50 nM des Antikörpers wurde in Western Blot Analysen der A549-Zellen eine größere Menge an nicht-phosphoryliertem EGFR beobachtet. Durch die kombinierte Therapie konnte außerdem ein größerer Anteil des Tumorsuppressors Stat-1 in den A549-Zellen nachgewiesen werden.

Panitumumab hat auch Einfluss auf Tumorzellen mit *KRAS*-Mutation, die in der klinischen Anwendung von einer Therapie mit dem EGFR-Antikörper noch ausgeschlossen sind. Die neu gewonnen Erkenntnisse zur Wirkungsweise von EGFR-Antagonisten sowie die Ergebnisse aus aktuellen experimentellen und klinischen Studien bieten außerdem Ansätze für weitere

Untersuchungen. So können Variationen von Faktoren wie z. B. Inkubationszeit, Konzentration des Wirkstoffes und Zeitpunkt der Zugabe für weiterführende Versuche erfolgsversprechend sein.

Da dem Protein Stat-1 eine proapoptotische Rolle zugesprochen sowie einen *in vivo* getesteter Anti-Tumor-Effekt bestätigt wird, ist eine mögliche Apoptoseinduktion durch Panitumumab auch an den A549-Zellen theoretisch denkbar. Auch hier bieten sich Möglichkeiten zu weiterführenden *In-vitro*-Untersuchungen.

Ebenso könnte die phosphorylierte Form des EGF-Rezeptors detektiert werden, um den Einfluss von Panitumumab auf Tumorzellen weiter zu verifizieren. Eine weitere grundsätzliche Überlegung ist auch, den Zeitpunkt sowie die Dosis der Bestrahlung (z. B. fraktionierte Gabe) zu variieren.

Abschließend kann festgestellt werden, dass Panitumumab als erster humaner monoklonaler EGFR-Antikörper in der Anti-Tumortherapie eine wichtige Rolle eingenommen hat und ein Ausbau der Zulassung auch für Tumoren, die eine *KRAS*-Mutation aufweisen, in der Zukunft denkbar ist. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass sich in der klinischen Anwendung eine kombinierte Therapie mit Panitumumab und ionisierender Strahlung als sinnvoll erweisen kann.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.: Signalweiterleitung durch den EGFR und therapeutische Angriffspunkte (GERBER, 2008)

Abb. 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus (ROYER *et al.*, 1999).

Abb. 3: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der a) A549- und b) HT-29-Zellen

Abb. 4: Schema zum Versuchsaufbau der Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie

Abb. 5: Schema zum Versuchsaufbau der Apoptose-Nekrose-Messungen mittels Durchflusszytometrie

Abb. 6: Schema zum Versuchsaufbau des Western Blots

Abb. 7: Wachstumskurve der A549-Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Panitumumab-Konzentrationen

Abb. 8: Wachstumskurve der A549-Zellen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Panitumumab-Konzentrationen

Abb. 9: Wachstumskurve der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab

Abb. 10: Wachstumskurve der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab (1 nM- 50 nM) und/oder Sorafenib (4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M)

Abb. 11: Zellzyklusanalysen der A549-Zellen bei Inkubation mit Panitumumab und/oder Bestrahlung, Fixierungszeitpunkt 12 h nach Bestrahlung

Abb. 12: Zellzyklusanalysen der A549-Zellen bei Inkubation mit Panitumumab und/oder Bestrahlung; Fixierungszeitpunkt 24 h nach Bestrahlung

Abb. 13: Zellzyklusanalysen der A549-Zellen bei Inkubation mit Panitumumab und/oder Bestrahlung; Fixierungszeitpunkt 48 h nach Bestrahlung

Abb. 14: Apoptose-Nekrose-Messung der A549-Zellen

Abb. 15: Ergebnisse der Apoptose-Nekrose Messungen der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab 50 nM und oder ionisierender Strahlung (8 Gy)

Abb. 16: Western Blot der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab 50 nM und/oder Bestrahlung (8 Gy)

Abb. 17: Western Blot der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab 50 nM und/oder Bestrahlung (8 Gy)

## 6.2 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Schema zur Probenaufbereitung der Apoptose-Nekrose-Messung
- Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper und den verwendeten Konzentrationen für die Western Blot Analysen
- Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Materialien und Geräte nach Methode sortiert
- Tab. 4: Zellpopulationsverdopplungszeiten der HT-29-Zellen in Stunden

## Literaturverzeichnis

- Ålgars, A.; Lintunen, M.; Carpén, O.; Ristamäki, R.; Sundström, J. (2011): EGFR gene copy number assessment from areas with highest EGFR expression predicts response to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Br J Cancer* 105 (2), 255–262.
- Amado, R. G.; Wolf, M.; Peeters, M.; van Cutsem, E.; Siena, S.; Freeman, D. J. *et al.* (2008): Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26 (10), 1626–1634.
- Bardelli, A.; Siena, S. (2010): Molecular Mechanisms of Resistance to Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28 (7), 1254–1261.
- Baselga, J. (2002): Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *The Oncologist* 7 (4), 2–8.
- Battle, T. E.; Frank, D. A. (2002): The role of STATs in apoptosis. *Curr. Mol. Med.* 2 (4), 381–392.
- Brabander, M. J. de; van de Velde, R. M. L.; Aerts, F. E. M.; Borgers, M.; Janssen, P. A. J. (1976): The Effects of Methyl [5-(2-Thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate, (R 17934; NSC 238159), a New Synthetic Antitumoral Drug Interfering with Microtubules, on Mammalian Cells Cultured *in Vitro*. *Cancer Res* 36, 905–916.
- Bradford, M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* (72), 248–254.
- Carteni, G.; Fiorentino, R.; Vecchione, L.; Chiurazzi, B.; Battista, C. (2007): Panitumumab a novel drug in cancer treatment. *Annals of Oncology* 18 (6), vi16-vi21.
- Choi, H. J.; Zhu, B. T. (2012): Role of cyclin B1/Cdc2 in mediating Bcl-XL phosphorylation and apoptotic cell death following nocodazole-induced mitotic arrest. *Mol. Carcinog.*, 1–13.
- Di Nicolantonio, F.; Martini, M.; Molinari, F.; Sartore-Bianchi, A.; Arena, S.; Saletti, P. *et al.* (2008): Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26 (35), 5705–5712.
- Dittmann, K.; Mayer, Claus; Fehrenbacher, B.; Schaller, M.; Raju, U.; Milas, Luka *et al.* (2005): Radiation-induced Epidermal Growth Factor Receptor Nuclear Import Is Linked to Activation of DNA-dependent Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 280 (35), 31182–31189.
- Douillard, J.-Y.; Siena, S.; Cassidy, J.; Tabernero, J.; Burkes, R.; Barugel, M. *et al.* (2010): Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study. *Journal of Clinical Oncology* 28 (31), 4697–4705.
- Freeman, D. J.; Bush, T.; Ogbagabriel, S.; Belmontes, B.; Juan, T.; Plewa, C. *et al.* (2009): Activity of panitumumab alone or with chemotherapy in non-small cell lung carcinoma cell lines expressing mutant epidermal growth factor receptor. *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (6), 1536–1546.
- Gerber, D. E. (2008): EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Drug Development Research* 69 (6), 359–372.

- Giannopoulou, E.; Antonacopoulou, A.; Matsouka, P.; Kalofonos, H. P. (2009): Autophagy: novel action of panitumumab in colon cancer. *Anticancer Res* 29 (12), 5077–5082.
- Han, W.; Carpenter, R. L.; Cao, X.; Lo, H.-W. (2012a): STAT1 gene expression is enhanced by nuclear EGFR and HER2 via cooperation with STAT3. *Mol. Carcinog.*, 1–11.
- Han, W.; Lo, H.-W. (2012b): Landscape of EGFR signaling network in human cancers: Biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Letters* 318 (2), 124–134.
- Huang, S.-M.; Harari, P. M. (2000): Modulation of Radiation Response after Epidermal Growth Factor Receptor Blockade in Squamous Cell Carcinomas: Inhibition of Damage Repair, Cell Cycle Kinetics, and Tumor Angiogenesis. *Clinical Cancer Research* (6), 2166–2174.
- Joiner, M.; van der Kogel, A. (2010): Basic clinical radiobiology. 4. ed., [Nachdr.]. London: Hodder Arnold.
- Jordan, M. A.; Wilson, L. (1998): Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current Opinion in Cell Biology* (10), 123–130.
- Kaatsch, P.; Spix, C.; Hentschel, S.; Katalinic, A.; Luttmann, S.; Stegmaier, C. et al. (2013): Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Aufl., neue Ausg. Berlin: Robert Koch-Institut.
- Kim, H. S.; Lee, M.-S. (2007): STAT1 as a key modulator of cell death. *Cellular Signalling* 19 (3), 454–465.
- Kleinig, H.; Sitte, P.; Maier, U.; Wolter, A. (1999): Zellbiologie. 4. Aufl. Stuttgart: Fischer.
- Koopman, G.; Reutelingsperger, C.; Kuijten, G.; Keehnen, R.; Pals, S.; van Oers, M. (1994): Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood* 84 (5), 1415–1420.
- Krieken, J. H. J. M.; Jung, A.; Kirchner, T.; Carneiro, F.; Seruca, R.; Bosman, F. T. et al. (2008): KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 453 (5), 417–431.
- Kriesen, S. (2013): Wirkung von Celecoxib und Cetuximab auf die Strahlensensibilität der Tumorzelllinien A549 und FaDu in vitro. Dissertation. Universität Rostock, Rostock. Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Rostock.
- Lin, S.-Y.; Makino, K.; Xia, W.; Matin, A.; Wen, Y. (2001): Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature Cell Biology* 3, 802–808.
- Lohr, F.; Wenz, F. (2007): Strahlentherapie kompakt. 2. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/book/9783437232916>.
- Lurje, G.; Lenz, H.-J (2009): EGFR Signaling and Drug Discovery. *Oncology* 77 (6), 400–410.
- Maity, A.; McKenna, W. G.; Muschel, R. J. (1994): The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiotherapy and Oncology* (31), 1–13.

- Martin, S. J.; Reutelingsperger, C. (1995): Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182, 1545–1556.
- Martinelli, E.; Troiani, T.; Morgillo, F.; Rodolico, G.; Vitagliano, D.; Morelli, M. *et al.* (2010): Synergistic antitumor activity of sorafenib in combination with epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal and lung cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 16 (20), 4990–5001.
- Mikhailov, M.V; Nikitin, S.M; Zhuze, A.L; Zasedatelev, A.S; Gursky, G.V; Gottikh, B.P (1981): Bis-actinomycin D: A new synthetic sequence-specific ligand. *FEBS Letters* 136 (1), 53–57.
- Minjgee, M.; Toulany, M.; Kehlback, R.; Giehl, K.; Rodemann, H. P. (2011): K-RAS(V12) induces autocrine production of EGFR ligands and mediates radioresistance through EGFR-dependent Akt signaling and activation of DNA-PKcs. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 81 (5), 1506–1514.
- Pawlik, T. M.; Keyomarsi, K. (2004): Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59 (4), 928–942.
- Peeters, M.; Price, T. J.; Cervantes, A.; Sobrero, A. F.; Ducreux, M.; Hotko, Y. *et al.* (2010): Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28 (31), 4706–4713.
- Peng, D.; Fan, Z.; Lu, Y.; DeBlasio, T.; Scher, H.; Mendelsohn, J. (1996): Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res.* 56 (16), 3666–3669.
- Potthoff, K.; Hofheinz, R.; Hassel, J. C.; Volkenandt, M.; Lordick, F.; Hartmann, J. T. *et al.* (2011): Interdisciplinary management of EGFR-inhibitor-induced skin reactions: a German expert opinion. *Annals of Oncology* 22 (3), 524–535.
- Rajagopalan, H.; Bardelli, A.; Lengauer, C.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Velculescu, V. E. (2002): Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418 (6901), 934.
- Ray, G. L.; Baidoo, K. E.; Wong, K. J.; Williams, M.; Garmestani, K.; Brechbiel, M. W.; Milenic, D. E. (2009): Preclinical evaluation of a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor as a radioimmunodiagnostic and radioimmunotherapeutic agent. *British Journal of Pharmacology* 157 (8), 1541–1548.
- Royer, H.-D.; Grinstein, E.; Janz, M. (1999): Regulation des Zellzyklus und therapeutische Implikationen. *Der Onkologe* (5), 884–890.
- Rude Voldborg, B.; Damstrup, L.; Spang-Thomsen, M.; Skovgaard Poulsen, H. (1997): Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Review. *Annals of Oncology* 8, 1197–1206.
- Sack, U.; Tárnok, A.; Rothe, G. (2007): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: Karger.
- Sartore-Bianchi, A.; Martini, M.; Molinari, F.; Veronese, S.; Nichelatti, M.; Artale, S. *et al.* (2009): PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer Are Associated with Clinical Resistance to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies. *Cancer Research* 69 (5), 1851–1857.
- Sauer, R. (2010): Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.

- Snyder, L. C.; Astsaturov, I.; Weiner, L. M. (2005): Overview of monoclonal antibodies and small molecules targeting the epidermal growth factor receptor pathway in colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer* (5), 71–80.
- Soulières, D.; Greer, W.; Magliocco, A. M.; Huntsman, D.; Young, S.; Tsao, M.-S; Kamel-Reid, S. (2010): KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Current Oncology* 17 (1, Supplement 1), 31–40.
- Tiemann, N. (2011): In-vitro-Untersuchungen zur Ermittlung der kombinierten Wirkung von Panitumumab und ionisierender Strahlung auf die Tumorzellen A549 und HT-29. Dissertation. Universität Rostock, Rostock. Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Rostock.
- Tiemann, N.; Hildebrandt, G.; Manda, K. (2012): Unexpected effect of the monoclonal antibody Panitumumab on human cancer cells with different KRAS status. *Med Oncol* 29 (3), 2276–2283.
- Toffoli, G.; Mattia, E. de; Cecchin, E.; Bion, P.; Masier, S.; Corona, G. (2007): Pharmacology of epidermal growth factor inhibitors. *The International journal of biological markers* 22 (1 Suppl 4), 24–39.
- Toulany, M. (2006): Blockage of Epidermal Growth Factor Receptor-Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT Signaling Increases Radiosensitivity of K-RAS Mutated Human Tumor Cells In vitro by Affecting DNA Repair. *Clinical Cancer Research* 12 (13), 4119–4126.
- Toulany, M.; Dittmann, K.; Baumann, M.; Rodemann, H. P. (2005a): Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS. *Radiotherapy and Oncology* 74 (2), 117–129.
- Toulany, M.; Dittmann, K.; Krüger, M.; Baumann, M.; Rodemann, H. P. (2005b): Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. *Radiotherapy and Oncology* 76 (2), 143–150.
- Townsend, P. A. (2003): STAT-1 Interacts with p53 to Enhance DNA Damage-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 279 (7), 5811–5820.
- Wannenmacher, M.; Wenz, F.; Debus, J. (Hg.) (2013): Strahlentherapie. 2., überarb. Aufl. 2013. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg.
- Wicki, A.; Herrmann, R.; Christofori, G. (2010): Kras in metastatic colorectal cancer. *Swiss Medical Weekly* 140.
- Wu, X.; Fan, Z.; Masui, H.; Rosen, N.; Mendelsohn, J. (1995): 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 (4), 1897–1905.
- Wu, X.; Rubin, M.; Fan, Z.; DeBlasio, T.; Soos, T.; Koff, A.; Mendelsohn, J. (1996): Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 12 (7), 1397–1403.
- Yang, X. D.; Jia, X. C.; Corvalan, J. R.; Wang, P.; Davis, C. G. (2001): Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38 (1), 17–23.
- Yang, X.-D; Jia, X.-C; Corvalan, J. R.; Wang, P.; Davis, C. G.; Jakobovits, A. (1999): Eradication of Established Tumors by a Fully Human Monoclonal Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor without Concomitant Chemotherapy. *Cancer Res* (59), 1236–1243.



## Thesen

In der klinischen Anwendung ist bis heute der *KRAS*-Status der Tumoren ein Entscheidungskriterium, denn nur Wildtyp-*KRAS*-Tumoren werden einer Behandlung mit Panitumumab zugänglich gemacht. In vorklinischen *In-vitro*-Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass auch *KRAS*-mutierte Zellen auf den Antikörper ansprechen, entgegen den klinischen Leitlinien zur Panitumumab-Therapie.

Eine kombinierte Behandlung mit ionisierender Strahlung war bereits Schwerpunkt von *In-vitro*-Untersuchungen und zeigte einen strahlensensibilisierenden Effekt durch den Antikörper.

In weiterführenden *In-vitro*-Untersuchungen sollte der alleinige Einfluss des EGFR-Antagonisten Panitumumab bzw. ionisierender Strahlung, sowie deren Kombination an den *KRAS*-mutierten A549-Zellen erforscht werden.

Der bereits in der Literatur beschriebene konzentrationsunabhängige wachstumshemmende Effekt des Antikörpers auf die A549-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit anhand von Wachstumsversuchen bestätigt werden. Auf die HT-29-Zellen (*KRAS* Wildtyp) hatte der Antikörper, wie bereits untersucht, keinen wachstumshemmenden Effekt.

Zellzyklusanalysen mit dem Durchflusszytometer ergaben, dass der EGFR-Antagonist bei den A549-Zellen nach einer Inkubationszeit von 84 und 96 Stunden einen G1-Arrest des Zellzyklus bewirkte.

Durch die kombinierte Therapie mittels EGFR-Antagonisten und ionisierender Strahlung befanden sich nur weniger als 10 % der Zellpopulation in der am meisten strahlenresistenten S-Phase. Dies ist ein positiver Hinweis für die klinische Anwendung in Hinblick auf eine bessere Tumorkontrolle durch die simultane Behandlung.

Nach einer Bestrahlung der *KRAS*-mutierten Tumorzellen mit 8 Gy konnte eine signifikante Abnahme der vitalen Zellen anteilig zur Gesamtpopulation beobachtet werden. Dies zeigten weitere Untersuchungen am Durchflusszytometer.

Panitumumab rief unter den genutzten Bedingungen bei den A549-Zellen keine Induktion von Apoptose oder Nekrose hervor. Es bestand jedoch eine Tendenz zur Zunahme der nekrotischen Fraktion durch die kombinierte Behandlung mit Panitumumab und Bestrahlung.

Western Blot-Analysen zeigten in den mit 50 nM Panitumumab behandelten A549-Zellen eine gesteigerte Expression an nicht-phosphoryliertem EGFR. Durch die kombinierte Therapie konnte außerdem ein größerer Gehalt des Tumorsuppressors Stat-1 in den A549-Zellen nachgewiesen werden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Panitumumab als erster humaner, monoklonaler EGFR-Antikörper auch einen Effekt auf *KRAS*-mutierte A-549 Tumorzellen hat. Der *KRAS*-Status als prädiktiver Faktor in der klinischen Anwendung ist daher allein nicht aussagekräftig und sollte überdacht werden.

Es ergeben sich durch die kombinierte Therapie von Antikörper und ionisierender Strahlung erfolversprechende Ansätze in der aktuellen Tumorthherapie, welche weiterführend in klinischen Studien untersucht werden sollten.

## DANKSAGUNG

Während der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit haben mir viele Menschen motivierend zur Seite gestanden und mich liebevoll unterstützt. Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während dieser Zeit begleitet haben. Im Folgenden möchte ich jedoch einige Personen benennen, ohne die es nicht zum Gelingen dieser Arbeit gekommen wäre.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Guido Hildebrandt für die Vergabe des Themas und die Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit.

Bei Frau Dr. Katrin Manda möchte ich mich für die Unterstützung während der gesamten Zeit und die immer wieder motivierenden Worte herzlich bedanken. Als Betreuerin dieser Arbeit konnte ich jederzeit meine erlangten Ergebnisse mit ihr diskutieren und zukünftige Versuche sinnvoll planen.

Vielen Dank an alle Kollegen und Mitarbeiter aus dem Strahlenbiologischen Labor, die mir tatkräftig und mit vielen hilfreichen Tipps zur Seite standen. Besonders möchte ich mich bei meiner Freundin und Kommilitonin Tina Präkelt bedanken. Unsere gemeinsame Zeit im Labor sowie die regelmäßigen angeregten Diskussionen werden mir in guter Erinnerung bleiben. Herzlichen Dank auch an Frau Heike Stark, da sie mir vor allem in der Anfangszeit geholfen hat, mich in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken einzufinden.

Zu guter Letzt danke ich von ganzem Herzen meiner Familie und meinem lieben Erik, die mir während der ganzen Zeit neben Studium, Beruf und anderen turbulenten Zeiten den Rücken freigehalten haben.

## **SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig 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 keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Aina Jannermann

Hamburg, 18.03.2015