

Aus der Abteilung für Strahlentherapie  
der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Ch. Rube

Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 (Iressa®) als Monotherapie  
und in Kombination mit hyperfraktionierter Bestrahlung auf die  
Proliferation von high-grade Gliomen in vitro unter Berücksichtigung der  
Expression des membranständigen EGF-Rezeptors

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES  
EINES DOKTORS DER MEDIZIN**

der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2006

vorgelegt von  
Nadine Rau  
geb. am 20. Juli 1978 in Pirmasens

Meinen Eltern

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Gliome/Astrozytome</b>	<b>6</b>
2.1.1. Entstehung von Glioblastomen	7
<b>2.2. Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)</b>	<b>8</b>
2.2.1. Struktur des EGF-Rezeptors	8
2.2.2. Aktivierung des EGF-Rezeptors und dessen Signalpathways	10
2.2.3. Inaktivierung des EGFR-Signals	12
2.2.4. Physiologische Funktion der EGFR-Familie	12
2.2.5. Die Rolle des EGF-Rezeptors in der Pathogenese maligner Erkrankungen	13
<b>2.2.5.1. EGF-Rezeptor und Tumorprogression</b>	<b>15</b>
<b>2.2.5.2. EGF-Rezeptor und Tumorprognose</b>	<b>17</b>
2.2.6. Die Blockade des EGF-Rezeptors als neue therapeutische Strategie	17
<b>2.3. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD 1839 „Iressa®“</b>	<b>19</b>
<b>2.4. Die Aufgabenstellung der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Verwendete Chemikalien, Lösungen und Materialien</b>	<b>23</b>
3.1.1. Zellkultur	23
3.1.2. Western Blot	23
3.1.3. Real-Time RT-PCR	26
3.1.4. WST-Assay	26

---

<b>3.2. Zellkultur</b>	<b>27</b>
3.2.1. Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“	27
<b>3.3. Bestrahlung</b>	<b>28</b>
<b>3.4. Western Blot</b>	<b>28</b>
3.4.1. Proteinpräparation	29
3.4.2. Proteingehaltsbestimmung	29
3.4.3. Elektrophorese und Blotting	29
3.4.4. Detektion und Entwicklung	30
3.4.5. Quantifizierung	31
<b>3.5. PCR-Analyse</b>	<b>31</b>
3.5.1. Prinzip der Real-Time RT-PCR	31
3.5.2. RNA-Extraktion	32
3.5.3. First-strand cDNA Synthese	33
3.5.4. Amplifikation und Messung der Fluoreszenz	33
3.5.5. Auswertung	34
<b>3.6. WST-Assay</b>	<b>35</b>
3.6.1. Prinzip des WST-Assays	35
3.6.2. Vorversuch und Erstellen der Eichkurven	35
3.6.3. Hauptversuch	36
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>4.1. WST-Assay</b>	<b>37</b>
4.1.1. Eichkurven	37
4.1.2. Hyperfraktionierte Bestrahlung reduziert das Wachstum der Gliomzelllinien U343 und U373	40
4.1.3. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ hemmt das Zellwachstum der Gliomzelllinien U343 und U373 abhängig von der Zelllinie unterschiedlich effektiv	44

---

4.1.4. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verstärkt die Wirkung ionisierender Strahlung abhängig von der Bestrahlungsdosis und der Zelllinie	47
<b>4.2. Real-Time RT-PCR</b>	<b>54</b>
4.2.1. Eichkurven	54
4.2.2. Die Gliomzelllinien U343 und U373 exprimieren den EGF-Rezeptor auf mRNA-Ebene unterschiedlich stark	55
4.2.3. Hyperfraktionierte Bestrahlung beeinflusst die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA- Ebene	56
4.2.4. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verändert die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene bei den Gliomzelllinien U343 und U373	62
4.2.5. Hyperfraktionierte Bestrahlung kombiniert mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verändert die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene abhängig von der Zelllinie	64
<b>4.3. Western Blot</b>	<b>70</b>
4.3.1. Die Gliomzelllinien U343 und U373 exprimieren den EGF-Rezeptor auf Proteinebene unterschiedlich stark	70
4.3.2. Hyperfraktionierte Bestrahlung beeinflusst die Expression des EGF-Rezeptors auf Proteinebene	72
4.3.3. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verringert die Expression des EGF-Rezeptors auf Proteinebene bei den Gliomzelllinien U343 und U373	77
4.3.4. Hyperfraktionierte Bestrahlung kombiniert mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verändert die Proteinexpression des EGF-Rezeptors	79
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>84</b>
<b>5.1. High-grade Gliome und ionisierende Strahlung</b>	<b>84</b>
<b>5.2. High-grade Gliome und der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“</b>	<b>86</b>
<b>5.3. High-grade Gliome und die Kombination aus ionisierender Strahlung und dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“</b>	<b>88</b>

---

<b>5.4. Die Expression des EGF-Rezeptors unter ionisierender Strahlung</b>	<b>91</b>
<b>5.5. Die Expression des EGF-Rezeptors unter Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“</b>	<b>93</b>
<b>5.6. Die Expression des EGF-Rezeptors unter Kombination aus ionisierender Bestrahlung und Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“</b>	<b>96</b>
<b>5.7. Ausblick</b>	<b>98</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>100</b>
<b>7. DANKSAGUNG</b>	<b>128</b>
<b>8. LEBENSLAUF</b>	<b>129</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abbildung 1:</b> Histopathologisches Bild eines Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV)	7
<b>Abbildung 2:</b> Aktivierung des EGF-Rezeptors	10
<b>Abbildung 3:</b> Strukturformel von „Iressa®“	19
<b>Abbildung 4:</b> Eichkurve der Gliomzelllinie U343	38
<b>Abbildung 5:</b> Eichkurve der Gliomzelllinie U373	38
<b>Abbildung 6:</b> Eichkurve der Zelllinie U343 mit Regressionsgerade	39
<b>Abbildung 7:</b> Eichkurve der Zelllinie U373 mit Regressionsgerade	39
<b>Abbildung 8:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung	43
<b>Abbildung 9:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung	43
<b>Abbildung 10:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U343 nach Inkubation mit „Iressa®“	46
<b>Abbildung 11:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U373 nach Inkubation mit „Iressa®“	46
<b>Abbildung 12:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“	51
<b>Abbildung 13:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“	51
<b>Abbildung 14:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy kombiniert mit „Iressa®“	52
<b>Abbildung 15:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy kombiniert mit „Iressa®“	52
<b>Abbildung 16:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“	53
<b>Abbildung 17:</b> WST-Assay der Gliomzelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“	53
<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der relativen EGFR-Expression der Zelllinien U343 und U373	55

- Abbildung 19:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy 59
- Abbildung 20:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy 59
- Abbildung 21:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy 60
- Abbildung 22:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy 60
- Abbildung 23:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1,5 Gy 61
- Abbildung 24:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1,5 Gy 61
- Abbildung 25:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U343 nach Inkubation mit „Iressa®“ 63
- Abbildung 26:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U373 nach Inkubation mit „Iressa®“ 63
- Abbildung 27:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“ 67
- Abbildung 28:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“ 67
- Abbildung 29:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy kombiniert mit „Iressa®“ 68
- Abbildung 30:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy kombiniert mit „Iressa®“ 68
- Abbildung 31:** RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“ 69

<b>Abbildung 32:</b> RT-PCR: relative EGFR-Expression der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit 1,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“	69
<b>Abbildung 33:</b> Vergleich der EGFR-Expression auf Proteinebene der Zelllinien U343 und U373	71
<b>Abbildung 34:</b> Western Blots der Kontrollen von U343 und U373	71
<b>Abbildung 35:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy	74
<b>Abbildung 36:</b> Western Blot der Zelllinie U343: 8x 0,5 Gy	74
<b>Abbildung 37:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy	74
<b>Abbildung 38:</b> Western Blot der Zelllinie U373: 8x 0,5 Gy	74
<b>Abbildung 39:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy	75
<b>Abbildung 40:</b> Western Blot der Zelllinie U343: 8x 1 Gy	75
<b>Abbildung 41:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy	75
<b>Abbildung 42:</b> Western Blot der Zelllinie U373: 8x 1 Gy	75
<b>Abbildung 43:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1,5 Gy	76
<b>Abbildung 44:</b> Western Blot der Zelllinie U343: 8x 1,5 Gy	76
<b>Abbildung 45:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1,5 Gy	76
<b>Abbildung 46:</b> Western Blot der Zelllinie U373: 8x 1,5 Gy	76
<b>Abbildung 47:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343 nach Inkubation mit „Iressa®“	78
<b>Abbildung 48:</b> Western Blot der Zelllinie U343 mit „Iressa®“	78

<b>Abbildung 49:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373 nach Inkubation mit „Iressa®“	78
<b>Abbildung 50:</b> Western Blot der Zelllinie U373 mit „Iressa®“	78
<b>Abbildung 51:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“	81
<b>Abbildung 52:</b> Western Blot der Zelllinie U343: 8x 0,5 Gy mit „Iressa®“	81
<b>Abbildung 53:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 0,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“	81
<b>Abbildung 54:</b> Western Blot der Zelllinie U373: 8x 0,5 Gy mit „Iressa®“	81
<b>Abbildung 55:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy kombiniert mit „Iressa®“	82
<b>Abbildung 56:</b> Western Blot der Zelllinie U343: 8x 1 Gy mit „Iressa®“	82
<b>Abbildung 57:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1 Gy kombiniert mit „Iressa®“	82
<b>Abbildung 58:</b> Western Blot der Zelllinie U373: 8x 1 Gy mit „Iressa®“	82
<b>Abbildung 59:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“	83
<b>Abbildung 60:</b> Western Blot der Zelllinie U343: 8x 1,5 Gy mit „Iressa®“	83
<b>Abbildung 61:</b> Densitometrische Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373 nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Dosis 1,5 Gy kombiniert mit „Iressa®“	83
<b>Abbildung 62:</b> Western Blot der Zelllinie U373: 8x 1,5 Gy mit „Iressa®“	83

**TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tabelle 1:</b> WHO-Einteilung der Gliome	<b>6</b>
<b>Tabelle 2:</b> Die EGFR-Familie und ihre Liganden	<b>9</b>
<b>Tabelle 3:</b> Prozentualer Anteil der EGFR-Überexpression bei einigen Tumorerkrankungen	<b>14</b>
<b>Tabelle 4:</b> Strategien der EGFR-Blockade	<b>18</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol/l	Mikromol pro Liter
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CDK4	cyclin-dependent-kinase 4
cDNA	complementäre DNA
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
G1-Phase	Gap1-Phase (Wachstumsphase)
G2-Phase	Gap2-Phase (Reparatur- und Vorbereitungsphase)
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HER	Human EGF Receptor
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt destilliertes Wasser

---

I	Iressa®
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50 %
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin 8
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MeV	Megaelektronen-Volt
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-Phase	Mitose-Phase (Kern- und Zellteilung)
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NRG	Neuroregulin
p	kurzer Arm des Chromosoms
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	phosphotyrosine binding
PTEN	phosphatase and tensin
q	langer Arm des Chromosoms
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase

---

s	Sekunde
SAPK	stress-activated protein kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src homology 2
S-Phase	Synthesephase (Replikation der DNA)
STATS	signal transducer and activators of transcription
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF $\alpha$	Transforming Growth Factor alpha
Tris	3-N-Tris-(hydroxymethyl)-methylamino-2-hydroxypropansulfonsäure
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung plus Tween 20
u	Unit
u/ $\mu$ l	Units pro Mikroliter
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol.	Volumen
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) hat zentrale Bedeutung für die Entwicklung und Progression von malignen Tumoren. Der Rezeptor und seine Signalkaskaden sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt, welche die Tumorgenese fördern. Hierzu zählen sowohl die Stimulation von Zellproliferation, Angiogenese und Metastasierung als auch die Reduktion der Apoptose. Viele solide Tumoren, darunter auch high-grade Gliome, zeigen eine Überexpression des EGF-Rezeptors (EGFR). Diese Überexpression wird mit einer schlechten Prognose, einer reduzierten Überlebensrate und einer Resistenzentstehung gegenüber zytotoxischen Substanzen und ionisierender Strahlung assoziiert. Die entscheidende Rolle des EGF-Rezeptors in der Tumorgenese hat die Entwicklung von neuen Therapieansätzen veranlasst, die spezifisch den Rezeptor blockieren. Zu diesen neuen Therapieansätzen gehört unter anderem der niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“, der seine antitumorale Wirksamkeit sowohl in vitro als auch in vivo unter Beweis stellen konnte. Maligne Gliome zählen zu den aggressivsten und therapieresistentesten Tumoren im klinischen Alltag und zeigen in zirka 40 Prozent die Überexpression des EGF-Rezeptors. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die antiproliferative Wirkung von ZD1839 „Iressa®“ sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit hyperfraktionierter Bestrahlung an zwei menschlichen high-grade Gliomzelllinien (U343, U373) evaluiert. Weiterhin wurde der Einfluss von ZD1839 „Iressa®“ und ionisierender Strahlung auf die Expression des Rezeptors untersucht.

Nach hyperfraktionierter Bestrahlung mit den Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy wurde eine dosisabhängige Reduktion des Zellwachstums in den Gliomzelllinien beobachtet. Eine Reduktion des Zellwachstums wurde ebenfalls für die Inkubation mit 1  $\mu$ M ZD1839 „Iressa®“ gezeigt. Eine synergistisch antiproliferative Wirkung auf die Gliomzelllinien wurde durch die Kombination aus Inkubation mit ZD1839 „Iressa®“ und ionisierender Bestrahlung erzielt. Dieser Synergieeffekt wurde besonders bei der Einzeldosis von 0,5 Gy pro Fraktion beobachtet.

Die Behandlung mit ZD1839 „Iressa®“ und hyperfraktionierter Bestrahlung hatte auch Auswirkungen auf die Expression des EGF-Rezeptors. Die Ergebnisse der Western Blot Versuche zeigten eine Abnahme der Proteinexpression für den Rezeptor nach den unterschiedlichen Behandlungsschemata. Die Änderungen der mRNA-Expression, die durch Real-Time RT-PCR quantifiziert wurden, waren sowohl von der Zelllinie als auch der Behandlungsart abhängig. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen, dass eine Blockade des EGF-Rezeptors auch Auswirkungen auf dessen Expression hat. Weiterhin leisten diese Ergebnisse einen Beitrag für das Verständnis der komplexen Regulationssysteme der Expression des EGF-Rezeptors in Tumoren. Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit sowohl die antiproliferative Wirkung von ZD1839

„Iressa®“ als Monotherapie und in Kombination mit hyperfraktionierter Bestrahlung als auch der Einfluss dieser Behandlungen auf die Expression des EGF-Rezeptors an zwei high-grade Gliomzelllinien verdeutlicht.

**Influence of the tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa®) as a single agent and in combination with hyperfractionated ionizing radiation on the proliferation of high grade gliomas in vitro under consideration of the expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR)**

**SUMMARY**

The epidermal growth factor receptor (EGFR) plays a crucial role in the development and progression of malignant tumors as its signaling pathways activate a number of tumorigenic processes, including stimulating cell proliferation, angiogenesis and metastasis, as well as reducing apoptosis. A wide variety of solid human cancers, among them high grade gliomas, shows an overexpression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) which has been associated with poor prognosis, reduced survival rate and resistance to cytotoxic drugs and ionizing radiation. The critical role the EGFR plays in cancer has led to the development of therapeutic strategies targeting specifically the EGFR. One of these novel antitumor agents is the small molecule selective tyrosine kinase inhibitor ZD1839 „Iressa®“ which has demonstrated promising in vitro and in vivo antitumor activity. Malignant gliomas are among the most aggressive and treatment refractory tumors encountered in the clinic and are known to overexpress EGFR in about 40 percent. For that reason in this study the antiproliferative effect of ZD1839 „Iressa®“ as a single treatment and in combination with hyperfractionated ionizing radiation was evaluated in two human high-grade glioma cell lines (U343, U373). Furthermore the influence of ZD1839 „Iressa®“ and ionizing radiation on the expression of the receptor itself was investigated.

After exposure to different irradiation doses (8x 0,5 Gy; 8x 1 Gy; 8x 1,5 Gy) a dose-dependent growth inhibition was observed in the glioma cell lines. The growth inhibition was also shown when the cell lines were incubated with 1 µM ZD1839 „Iressa®“. A synergistic antiproliferative effect was obtained when the glioma cells were treated with the combination of ionizing radiation and 1 µM ZD1839 „Iressa®“, especially for irradiation dose of 0,5 Gy per fraction.

The treatment with ZD1839 „Iressa®“ and hyperfractionated ionizing radiation also affected the expression of the EGFR. The Western Blot results showed a downregulation of the receptor on the protein level after exposure to the different treatments. The alterations on the mRNA level quantified by real-time RT-PCR were dependent of both the cell line and the treatment. These findings underline that targeting the EGFR also affect the expression of the receptor. Furthermore these results make a contribution to the comprehension of the complex regulation systems controlling the expression of the EGFR in cancer. Summarized in this study both the antiproliferative activity of ZD1839 „Iressa®“ as a single agent and in combination with ionizing radiation and its influence on the expression of the EGFR was shown on high grade glioma cells.

## 2. EINLEITUNG

Die Behandlung von soliden Tumoren besteht aus der chirurgischen Resektion und der Applikation von zytotoxischen Therapien wie Chemo- und Radiotherapie. Diese konventionellen zytotoxischen Therapien führen nicht zu einer spezifischen Zerstörung des Tumorgewebes, sondern schädigen auch gesundes Gewebe. Aufgrund dieser Nebenwirkung solcher Therapien sind der erfolgreichen Behandlung von soliden Tumoren Grenzen gesetzt. Die Normaltoxizität limitiert die Gesamtdosis und kann somit zu der Verabreichung von subtherapeutischen Dosen oder sogar zu einer Unterbrechung der Therapie führen. Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemo- oder Radiotherapie stellt einen weiteren begrenzenden Faktor in der erfolgreichen Behandlung von soliden Tumoren dar. Die unspezifische Toxizität und die begrenzte Wirksamkeit von traditionellen zytotoxischen Therapien haben die Entwicklung neuer spezifischer Therapieansätze veranlasst, die maximale therapeutische Erfolge mit minimaler Toxizität erzielen sollen. Die Entwicklung solcher Substanzen erfordert Kenntnisse über die Regulationsmechanismen und Signalwege in gesunden Zellen und deren Fehlsteuerung bei malignen Erkrankungen.

Rezeptoren der Zellmembran spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation und Steuerung zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Zellüberleben. In Tumoren führt eine Störung dieses Regulationssystems zur malignen Transformation der Zelle. Eine zentrale Bedeutung für die Tumorgenese und -Progression hat der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Die Entwicklung von biologischen Substanzen, die gezielt den EGF-Rezeptor blockieren, ist ein entscheidender Schritt in der Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten für maligne Erkrankungen. Die Fokussierung auf den EGF-Rezeptor resultiert aus verschiedenen Beobachtungen. Wie präklinische Studien gezeigt haben, führt die Aktivierung dieses Rezeptors in Tumorzellen zu einer Stimulation von Proliferation, Angiogenese und Metastasierung sowie einer Reduktion der Apoptoserate (HUANG et al., 1999). Zudem liegt in vielen soliden Tumoren eine Überexpression des EGF-Rezeptors vor (SALOMON et al., 1995). Diese Überexpression des Rezeptors findet man auch in 40% der Gliome (LIBERMANN et al., 1985; WONG et al., 1987; MALDEN et al., 1988; EKSTRAND et al., 1991; FLEMING et al., 1992). In Glioblastomen wird die relative Resistenz gegenüber Radiotherapie mit der Überexpression des EGF-Rezeptors assoziiert (BARKER et al., 2001). In präklinischen Studien wurde gezeigt, dass die Blockade des EGF-Rezeptors eine effektive Option in der Tumorbehandlung darstellt, welche die Wirksamkeit von Chemo- und Radiotherapie potenziert (HERBST et al., 2002).

Es wurden verschiedene Strategien der therapeutischen EGFR-Blockade in Tumoren entwickelt, darunter auch die Applikation des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 „Iressa®“. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ bei

verschiedenen EGFR-exprimierenden, menschlichen Karzinomzellen zu einer Wachstumshemmung in vitro führt (CIARDIELLO et al., 2000; CIARDIELLO et al., 2001; CIARDIELLO et TORTORA, 2001). Aufgrund dieser viel versprechenden Studien wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit sich die Ergebnisse der EGFR-Blockade durch den Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ auf menschliche Gliomzelllinien übertragen lassen.

Die Diagnose „high-grade Gliom“ ist trotz multimodaler Therapieansätze auch heute noch mit einer infausten Prognose verbunden. Im klinischen Alltag zählen high-grade Gliome zu den aggressivsten und therapierefraktärsten Tumoren.

Die Entwicklung neuer Therapiekonzepte, die immer spezifischer in den Tumorstoffwechsel eingreifen, vermag in Zukunft neue Perspektiven in der Behandlung von Gliomen zu eröffnen.

## 2.1. Gliome/Astrozytome

Unter Gliomen versteht man intraaxiale Tumoren des Zentralen Nervensystems unterschiedlicher Differenzierung, die von der Neuroglia ausgehen. Zirka 70% aller primären Hirntumoren des Erwachsenenalters werden den Gliomen zugerechnet. Die World Health Organisation (WHO) klassifiziert die Tumoren in vier Malignitätsgrade (KLEIHUES et al., 1993; KLEIHUES et SOBIN, 2000; KLEIHUES et al., 2002). Gliome mit dem WHO Grad 1 und 2 werden als low-grade Astrozytome, Gliome mit dem WHO Grad 3 und 4 als high-grade Gliome zusammengefasst. Die histopathologische Einteilung beurteilt Kriterien wie Zelldichte, Differenzierungsgrad, Zellpolymorphismus, Mitoserate, fokale Nekrosenbildung und Angiogeneese.

WHO Grad I	Pilozytisches Astrozytom
WHO Grad II	Fibrilläres, gemistozytisches, protoplasmatisches Astrozytom
WHO Grad III	Anaplastisches Astrozytom
WHO Grad IV	Glioblastom

**Tabelle 1:** WHO-Einteilung der Gliome

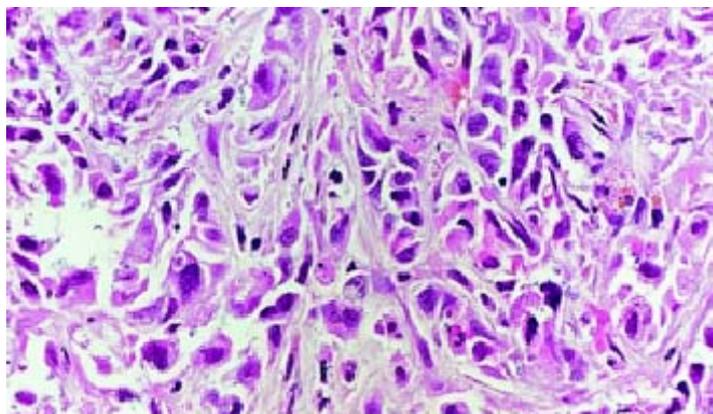
High-grade Gliome sind schlecht differenzierte, schnell wachsende, aggressive Tumoren mit einer jährlichen Inzidenz von 4 bis 5 Fällen pro 100000 Einwohner. Man unterscheidet zwischen dem anaplastischen Astrozytom (WHO Grad 3) und dem diffus wachsenden Glioblastoma multiforme (WHO Grad 4).

Die Standardtherapie von high-grade Gliomen besteht derzeit aus der chirurgischen Resektion mit postoperativer Radiotherapie und, in Abhängigkeit vom Tumorgrad, adjuvanter Chemotherapie (BURTON et PRADOS, 1999; PRADOS et LEVIN, 2000). Die konventionelle Radiotherapie wird, bei einer Gesamtdosis von 60 Gy, in Form einer perkutanen Herdbestrahlung à 2 Gy pro Fraktion appliziert (WALKER et al., 1979; WALKER et al., 1980). Trotz dieser multimodalen Therapiekonzepte ist die Prognose von hochmalignen Gliomen äußerst schlecht. Die mediane Überlebenszeit von Glioblastomen liegt derzeit unter Therapie bei 12 Monaten, ohne Therapie bei 4-6 Monaten (PRADOS et al., 1998). Im Vergleich dazu ist die Prognose des anaplastischen Astrozytoms ohne Therapie deutlich besser. Die mediane Überlebenszeit nach Biopsie beträgt hier 18 Monate (CURRAN et al., 1992). Unter Therapie werden mediane Überlebenszeiten von 4-5 Jahren angegeben (LEVIN et al., 1995). Trotz des nachgewiesenen Benefits von Radiotherapie treten 90% der Rezidive in dem Bestrahlungsfeld auf (LEE et al., 1999; OPPITZ et al., 1999).

### 2.1.1. Entstehung von Glioblastomen

Aufgrund der unterschiedlichen molekulargenetischen Veränderungen in Glioblastomen bei jüngeren und älteren Patienten beschreibt die Literatur zwei Wege der Tumorentstehung (RASHEED et al., 1999; SMITH et JENKINS, 2000). Ein Weg ist durch eine schrittweise Entwicklung von low-grade Astrozytomen zu sekundär malignen Gliomen bis hin zum Glioblastom gekennzeichnet. Diese sekundären Glioblastome treten bei jüngeren Patienten auf und zeigen häufig Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 (RASHEED et al., 1999). In der Progression von low-grade zu high-grade Gliomen sind genetische Veränderungen von Bedeutung, welche die Regulation des Zellzyklus betreffen, wie zum Beispiel der Verlust des Antionkogens Rb (Retinoblastom Gen) und die Amplifikation von CDK4 (cyclin-dependent-kinase 4) (SCHMIDT et al., 1994; SMITH et JENKINS, 2000). Weiterhin spielt der Verlust von chromosomalen Segmenten wie 9p, 17p und 19q eine wichtige Rolle (VON DEIMLING et al., 1994; RASHEED et al., 1999; SMITH et JENKINS, 2000).

Der zweite Weg der Tumorentstehung ist die direkte Entwicklung eines Glioblastoms, das deswegen auch als primäres oder de novo Glioblastom bezeichnet wird. Diese primären Glioblastome treten bei älteren Patienten auf und zeigen häufig eine Amplifikation des Protoonkogens c-erbB, welches den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) kodiert (RASHEED et al., 1999). Weitere genetische Charakteristika sind der Verlust von Chromosom 10, die Deletion des Antionkogens mts1/p16 und Mutationen des Tumorsuppressorgens PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog auf Chromosom 10) (BIERNAT et al., 1997; TOHMA et al., 1998; SMITH et JENKINS, 2000). Im Gegensatz zu sekundären Glioblastomen zeigen primäre nur selten eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 (WATANABE et al., 1996; RASHEED et al., 1999; TORTOSA et al., 2000).



**Abbildung 1:** Histopathologisches Bild eines Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV), entnommen aus Prados MD, Berger MS, Wilson CB. Primary central nervous system tumors: advances in knowledge and treatment. CA Cancer J Clin 1998;48:331-60, 321.

## 2.2. Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Membranständige Rezeptoren spielen in der Zelle eine außerordentlich wichtige Rolle in der Umwandlung von externen Reizen und Stimuli in intrazelluläre Signale. Mit Hilfe dieser Informationsübertragung hat die Zelle die Möglichkeit, sich optimal an die herrschenden extrazellulären Bedingungen anzupassen. In diesem System ist auch der Epidermal Growth Factor Receptor von Bedeutung. Er gehört zu der Familie der Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität und wird wegen seiner frühen Entdeckung als deren Prototyp angesehen.

Wachstumsfaktoren oder Zytokine, die von der Zelle in den Interzellularraum sezerniert werden, binden an diesen Membranrezeptor und lösen einen Mechanismus aus, der als Signaltransduktionskaskade bezeichnet wird. Diese Kaskade leitet die Information in den Zellkern weiter und erlaubt der Zelle adäquat auf ihre Umwelt zu reagieren, zu proliferieren, in Apoptose zu gehen oder einen Differenzierungsvorgang einzuleiten.

### 2.2.1. Struktur des EGF-Rezeptors

Der EGF-Rezeptor, auch bekannt unter HER1 (Human EGF Receptor) und ErbB1, wird durch das Protoonkogen c-erbB, das auf dem Chromosom 7p12-13 lokalisiert ist (FISCHER et al., 1994), kodiert. Der Rezeptor ist ein 170 kD schweres, transmembranes Glykoprotein, bestehend aus 1186 Aminosäuren. Diese Aminosäuresequenz des Rezeptors lässt sich in 3 Domänen mit unterschiedlicher Funktion einteilen. Die extrazelluläre Domäne, bestehend aus 622 Aminosäuren, enthält zwei cystinreiche Regionen, an denen eine Vielzahl von Liganden binden kann. Der mittlere Teil, bestehend aus 22 Aminosäuren, ist ein alpha-helikales Segment, das den Rezeptor in der Zellmembran verankert. Der intrazelluläre Anteil des Rezeptors, bestehend aus 542 Aminosäuren, umfasst hauptsächlich die Tyrosinkinase und ein Carboxyl-Ende. Das Carboxyl-Ende enthält Tyrosylreste, die das Substrat der Autophosphorylierung darstellen (CARPENTER et COHEN, 1990; WELLS, 1999).

Die EGFR-Familie beinhaltet neben dem Prototyp EGFR (ULLRICH et al., 1984) noch drei weitere Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die in ihrer Struktur und Funktion dem Prototyp EGFR gleichen: HER2, auch c-neu oder ErbB2 genannt (SCHECHTER et al., 1985; SEMBA et al., 1985; YAMAMOTO et al., 1986), HER3/ErbB3 (KRAUS et al., 1989; PLOWMAN et al., 1990) und HER4/ErbB4 (PLOWMAN et al., 1993). Die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors zeigt zu 36-48% strukturelle Gleichheit mit den anderen Mitgliedern der EGFR-Familie. Die Tyrosinkinase-Domäne weist sogar zu 60-82% strukturelle Homologie auf und das Carboxyl-Ende zeigt mit nur 23-33% geringe strukturelle Gemeinsamkeiten (CROVELLO et al., 1998).

Zwischen dem EGF-Rezeptor und HER2 beträgt die Homologie in der Tyrosinkinase-Domäne 82% (PRIGENT et LEMOINE, 1992).

Für die Rezeptoren der EGFR-Familie ist eine Vielzahl von spezifischen Liganden bekannt (RIESE et STERN, 1998), die in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Zusätzlich wird in Tabelle 2 angegeben auf welchem Chromosom der jeweilige Rezeptor kodiert wird.

Für den Rezeptor HER2 wurde bislang noch kein spezifischer Ligand entdeckt, der mit hoher Affinität bindet (HARDWICK et al., 1992; HOLMES et al., 1992; PELES et al., 1993). HER2 fungiert als Co-Rezeptor und verstärkt die Signalantwort der anderen Rezeptoren (KLAPPER et al., 2000).

REZEPTOR	LIGAND	LOKALISIERT AUF CHROMOSOM
EGFR (ErbB1/HER1)	EGF, TGF $\alpha$ , Amphiregulin, Heparin-binding EGF Betacellulin, Epiregulin, NRG2- $\alpha$	7p11-13 (FISCHER et al., 1994)
HER2 (c-neu/ErbB2)	Kein Ligand bekannt	17q12-q21 (COUSSENS et al., 1985)
HER3/ErbB3	Neuroregulin-1 (NRG-1), Neuroregulin-2 (NRG-2)	12q13 (KRAUS et al., 1989)
HER4/ErbB4	NRG-1, NRG-2, NRG-3, NRG-4, Betacellulin	2q33.3-34 (ZIMONJIC et al., 1995)

**Tabelle 2:** Die EGFR-Familie und ihre Liganden

### 2.2.2. Aktivierung des EGF-Rezeptors und dessen Signalpathways

Der EGF-Rezeptor liegt wie die anderen Mitglieder der EGFR-Familie in Abwesenheit von spezifischen Liganden als inaktives Monomer auf der Zelloberfläche vor. Bindung eines Liganden an EGFR führt zu Dimerisierung; dabei können Dimere aus zwei Molekülen des gleichen Rezeptors bestehen (Homodimer) oder aus zwei verschiedenen Mitgliedern der EGFR-Familie (Heterodimer) (ALROY et YARDEN, 1997).

Die Rezeptordimerisierung aktiviert die intrinsische Tyrosinkinase, wodurch die Autophosphorylierung von Tyrosylresten der intrazellulären Domäne getriggert wird (HELDIN, 1995; WEISS et SCHLESSINGER, 1998). Diese phosphorylierten Tyrosylreste dienen als Bindungsstellen für Proteine, die SH2 (Src homology 2) oder PTB (phosphotyrosine binding) Domänen enthalten. Es handelt sich dabei um Adapterproteine wie Shc, Crk und Grb2 und Kinasen wie Src, Chk und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (SHOELSON, 1997; SUDOL 1998). Die Interaktion der Adapterproteine mit cytosolischen Enzymen und Proteinen führt zur Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionskaskaden. Über das Adapterprotein Grb2 und Stimulierung des ras Proteins wird der mitogen-activated protein (MAP)-kinase Pathway aktiviert (WELLS, 1999). Die MAP-Kinase übermittelt das Signal in den Zellkern, in dem über verschiedene Transkriptionsfaktoren die Zellteilung stimuliert wird (LUNDBERG et WEINBERG, 1999).

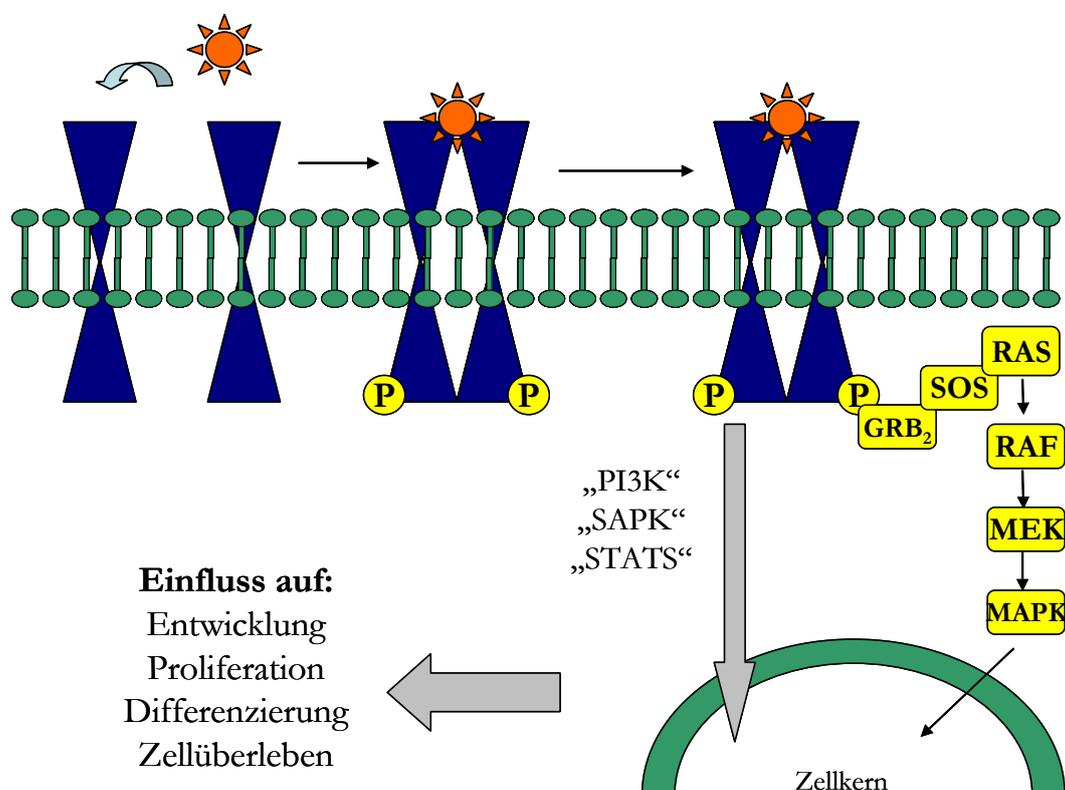


Abbildung 2: Aktivierung des EGF-Rezeptors

Neben dem MAP-Kinase Pathway existieren weitere Signaltransduktionskaskaden, die aktiviert werden können: phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-Akt Pathway, stress-activated protein kinase (SAPK) Pathway und signal transducers and activators of transcription (STATS) Pathway (YARDEN et SLIWKOWSKI, 2001). Diese Signalpathways verändern die Genexpression und beeinflussen dadurch Entwicklung, Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zelle (MOGHAL et STERNBERG, 1999; KLAPPER et al., 2000).

Alternativ zu dieser klassischen Aktivierung kann die Behandlung mit ionisierender Strahlung die Aktivierung des EGFR/MAP-Kinase Pathway induzieren (SCHMIDT-ULLRICH et al., 1997; DENT et al., 1999).

Der EGF-Rezeptor bildet mit den übrigen Mitgliedern der EGFR-Familie und der Vielzahl von Liganden, die spezifisch an einen oder mehrere Rezeptoren binden, ein komplexes Netzwerk der Signalübertragung. Dabei sind Art und Stärke der über EGFR vermittelten Signale unter anderem von dem Liganden, dessen Rezeptorbindung einen Homo- oder Heterodimer erzeugt, und dem Verhältnis der vier Rezeptoren auf der Zelloberfläche abhängig (CROVELLO et al., 1998).

Der EGF-Rezeptor dimerisiert nach Ligandenbindung bevorzugt mit ErbB2, wenn für diese beiden Rezeptoren eine Co-Expression auf der Zelloberfläche vorliegt (TZAHAR et al., 1996). Im Vergleich mit dem EGFR-Homodimer zeigt das gebildete Heterodimer, bestehend aus EGFR und ErbB2, mehr Stabilität, eine höhere Recyclingrate und ein stärkeres Signal (GRAUS-PORTA et al., 1997). Neben ErbB2 kann EGFR auch mit ErbB3 und ErbB4 Heterodimere bilden, die zu einer längeren und stärkeren Aktivierung des PI3K-Akt Pathway führen (YARDEN et SLIWKOWSKI, 2001).

### 2.2.3. Inaktivierung des EGFR-Signals

Um das EGFR-Signal zu inaktivieren, wird der Ligand-Rezeptor-Komplex durch Endocytose internalisiert. Abhängig von dem gebundenen Liganden kann der Rezeptor recycelt und wieder auf die Zelloberfläche gebracht oder abgebaut werden. Durch den Liganden EGF induzierte EGFR-Homodimere werden nach der Endocytose in Lysosomen abgebaut. Wird nach Bindung des Liganden EGF an EGFR allerdings ein Heterodimer mit dem Co-Rezeptor ErbB2 gebildet, entgeht der Rezeptor dem Abbauvorgang und wird wieder der Zelloberfläche zugeführt. Bindung des Liganden TGF $\alpha$  an EGFR führt, unabhängig von Homo- oder Heterodimer, zu einem Recycling des Rezeptors (LENFERINK et al., 1998).

Das Recycling von Rezeptoren stellt damit eine weitere Möglichkeit dar, die Signalstärke zu modulieren. Recycelte Rezeptoren stehen auf der Zelloberfläche schneller für eine erneute Aktivierung bereit und verstärken damit die Signalübertragung durch Wachstumsfaktoren (WATERMAN et al., 1998).

### 2.2.4. Physiologische Funktion der EGFR-Familie

Der EGF-Rezeptor und seine Familie werden von vielen Geweben, die epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs sind, exprimiert und spielen dort eine entscheidende Rolle in der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung. Die Wichtigkeit dieser Rezeptoren für die Entwicklung wurde in Versuchen mit transgenen Mäusen entdeckt. Mäuse mit einer Nullmutation für EGFR sterben bereits als Embryo oder während der Perinatalperiode und weisen Anomalien in vielen Organen einschließlich Gehirn, Haut, Lunge und Gastrointestinaltrakt auf (MIETTINEN et al., 1995; SIBILIA et WAGNER, 1995; THREADGILL et al., 1995; SIBILIA et al., 1998). ErbB2 Knockout Mäuse sterben im Durchschnitt 10,5 Tage post coitum an einer Malformation des kardialen Trabekelsystems (LEE et al., 1995). Zusätzlich wurde für ErbB2 eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Peripheren Nervensystems beschrieben (MORRIS et al., 1999). ErbB3 negative Mäuse sterben durchschnittlich 13,5 Tage post coitum und zeigen Anomalien in der Entwicklung des Herzens und des Gehirns auf (ERICKSON et al., 1997). Mäuse mit einer Nullmutation für ErbB4 sterben an einer Fehlentwicklung des myokardialen Trabekelsystems (GASMANN et al., 1995). Aus diesen Versuchen geht die essentielle Bedeutung des EGF-Rezeptors und seiner Familie in der Embryogenese und Entwicklung hervor.

Auch im adulten Organismus werden zelluläre Prozesse wie Differenzierung und Proliferation über die EGFR-Familie vermittelt. In der Entwicklung der Brustdrüse fördert der EGF-Rezeptor das duktales Wachstum (FOWLER et al., 1995), während ErbB2 und ErbB4 Bedeutung für die

lobuloalveoläre Differenzierung und Laktation haben (JONES et STERN, 1999; JONES et al., 1999).

Die EGFR-Familie hat in vielen Geweben eine entscheidende Funktion in der Regulation von Proliferation, Differenzierung und des Zellüberlebens und ermöglicht der Zelle damit eine Anpassung an ihre Umweltgegebenheiten. Um die Vielzahl der externen Stimuli zu integrieren und die Zellantwort zu optimieren, ist eine Interaktion der verschiedenen zellulären Signalsysteme notwendig. Der EGF-Rezeptor wurde als Umschaltstelle dieses Kommunikationsnetzwerkes entdeckt und dient damit der Signalintegration und Diversifikation (HACKEL et al., 1999; PRENZEL et al., 2000). Ein Beispiel für diese Kommunikation ist die ligandenunabhängige Transaktivierung des EGF-Rezeptors und der nachfolgenden Signalkaskaden durch andere Membranrezeptoren als Antwort der Zelle auf Stress, Membrandepolarisation und einige nichtphysiologischen Reize wie Bestrahlung und alkylierende Substanzen.

### **2.2.5. Die Rolle des EGF-Rezeptors in der Pathogenese maligner Erkrankungen**

Der EGF-Rezeptor hat eine zentrale Funktion in der Regulation und Steuerung von Zellproliferation und Differenzierung in vielen Geweben. Veränderungen in Expression oder Aktivierung des EGF-Rezeptors stören dieses Regulationssystem und können damit die maligne Transformation der Zelle induzieren.

Die anomale Aktivierung des EGF-Rezeptors in Tumoren beruht auf verschiedenen Mechanismen, die sowohl den Rezeptor als auch seine Liganden betreffen. Hauptsächlich findet man eine Überexpression des EGF-Rezeptors, die entweder durch Gen-Amplifikation oder Anomalien in der Transkription verursacht wird, Genmutationen und die autokrine Stimulation durch Überproduktion der Liganden EGF und TGF $\alpha$ .

In präklinischen Studien wurde eine ausgeprägte Korrelation zwischen erhöhter EGFR-Expression und Onkogenese gefunden (STERN et al., 1987). Zudem wurde für verschiedene Tumoren eine Überexpression des EGF-Rezeptors beschrieben (SALOMON et al., 1995). In diesen Tumoren liegt die Anzahl der Rezeptoren auf der Zellmembran über den 40000 bis 100000 Rezeptoren, die eine gesunde Zelle exprimiert (CARPENTER et COHEN, 1979; HERBST et SHIN, 2002). In einigen Tumoren erreicht die Anzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche bis zu 2 Millionen (YAO et al., 1988; PETRIDES et al., 1990; ENNIS et al., 1991). Der Prozentsatz der EGFR-Überexpression variiert unter den Tumorerkrankungen.

<b>Tumorerkrankung</b>	<b>Prozentualer Anteil der Tumoren mit EGFR Überexpression</b>	<b>Literaturquelle</b>
<b><u>Gliome</u></b>	40-63 %	LIBERMANN et al., 1985; EKSTRAND et al., 1991; WATANABE et al., 1996; RIESKE et al., 1998
Kopf-Hals-Tumoren	80-100 %	GRANDIS et al., 1996
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	40-80 %	RUSCH et al., 1997; FONTANINI et al., 1998
Brustkrebs	14-91 %	KLIJN et al., 1992; BECKMANN et al., 1996; BUCCI et al., 1997; WALKER et DEARING, 1999
Kolonkarzinom	25-77 %	MESSA et al., 1998; GOLDSTEIN et ARMIN, 2001;

**Tabelle 3:** Prozentualer Anteil der EGFR-Überexpression bei einigen Tumorerkrankungen

Neben der EGFR-Überexpression kann es auch durch Mutation zu einer gesteigerten EGFR-Aktivierung kommen. Es sind einige Genmutationen des EGF-Rezeptors bekannt, die häufigste Mutation ist EGFRvIII (HUMPHREY et al., 1990; WONG et al., 1992; LI et al., 2004). Diese Variante des Rezeptors wurde in mehreren Tumoren einschließlich in Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, Mammakarzinomen, Prostatakarzinomen und in Gliomen gefunden (VOLDBORG et al., 1997). Der mutierte Rezeptor EGFRvIII hat eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, die unabhängig von Ligandenbindung und Dimerisierung ist (CHU et al., 1997; HUANG et al., 1997; MOSCATELLO et al., 1998). EGFRvIII wird nicht internalisiert und erhöht durch die konstante Expression auf der Zellmembran die Dauer der Signaltransduktion (CHU et al., 1997). Diese Mutation wurde in 57% der high-grade und 86% der low-grade Gliome gefunden (PEDERSEN et al., 2001).

Ein wichtiger Mechanismus der EGFR-Aktivierung in Tumoren stellt die autokrine Stimulation dar. Dabei wird durch Überproduktion der Liganden EGF und TGF $\alpha$  die Expression des EGF-Rezeptors gesteigert. Die Tumorzelle zeigt damit eine erhöhte Produktion und Expression sowohl des Rezeptors als auch der aktivierenden Liganden. Viele solide Tumoren, unter anderem Kopf-Hals-Tumoren, Ösophagus-, Mamma- und Zervixkarzinome überexprimieren sowohl den EGF-Rezeptor als auch seine Liganden (SALOMON et al., 1995). Diese kombinierte Überexpression ist

mit einer schlechteren Prognose assoziiert als die Überexpression des Rezeptors oder der Liganden alleine (DI FIORE et al., 1987; KAWAMATA et al., 1994).

### 2.2.5.1. EGF-Rezeptor und Tumorprogression

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors spielt eine zentrale Rolle in der Tumorgenese und -Progression. Die durch EGFR-Aktivierung induzierten Signalkaskaden sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, die das Tumorwachstum kontrollieren und beeinflussen. Wie präklinische Studien gezeigt haben, wird die Zellproliferation stimuliert, Angiogenese und Metastasierung gefördert sowie die Apoptoserate reduziert (HUANG et HARARI, 1999).

Der EGF-Rezeptor hat große Bedeutung in der Regulation des Zellzyklus und Förderung der Zellproliferation. In Tumoren wird dieses Regulationssystem gestört und es folgt unkontrolliertes Zellwachstum. In gesunden Zellen führt eine Stimulation des EGF-Rezeptors durch Liganden während der M-Phase des Zellzyklus in der Regel nicht zu einer Signalweiterleitung. Durch Rezeptorüberexpression in Tumoren kommt es aber zu einer Unterbrechung dieses negativen Regulationsmechanismus und damit zu einer gesteigerten Proliferation (KIYOKAWA et al., 1997). Anhand von menschlichen Prostatakarzinom-Zellen wurde gezeigt, dass Stimulierung des Rezeptors durch EGF die Expression von Cyclin D1 induziert (PERRY et al., 1998), einem Protein, das essentiell für den Zellzyklus ist, indem es den Übergang der G1-Phase in die S-Phase einleitet.

Durch monoklonale Antikörper gegen den EGF-Rezeptor wurde in Prostatakarzinom-Zellen ein G1-Arrest erzeugt und der Zellzyklus damit unterbrochen (PENG et al., 1996).

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod hat eine wichtige Funktion in der Gewebeentwicklung während der Embryogenese und bietet der Zelle die Möglichkeit, das Wachstum von anomalen Zellen zu verhindern. Der Kontrollverlust über die Apoptose ist damit ein entscheidender Prozess in der Entstehung und Entwicklung von malignen Erkrankungen. An der Regulation dieses komplexen Prozesses sind verschiedene Faktoren wie Hormone, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren beteiligt. Auch der EGF-Rezeptor ist in die Regulation involviert, indem er sowohl pro- als auch anti-apoptotische Signale in den Zellkern vermitteln kann. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors kann in Plattenepithelkarzinomzellen über den „STATS“-Pathway und caspase I die Apoptose induzieren (CHIN et al., 1997), während in Prostatakarzinomzellen über den „PI3K“-Akt Pathway die Apoptose verhindert wird (LIN et al., 1999).

In EGFR-exprimierenden Zellen hemmt EGF die Apoptose, so dass sich die Zellen eher weiter teilen als in Apoptose zu gehen (RODECK et al., 1997; AKIMOTO et al., 1999).

Die Blockade des EGF-Rezeptors durch Anti-EGFR-Antikörper führt entweder zur Aktivierung von pro-apoptotischen oder zur Hemmung von anti-apoptotischen Signalkaskaden und damit zu einer gesteigerten Apoptoserate (WU et al., 1995). Durch Verwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren wird die Apoptoserate in menschlichen Karzinomzelllinien ebenfalls gesteigert (WOODBURN, 1999).

Die Bildung von neuen Blutgefäßen ist ausschlaggebend für das Tumorstadium. Ohne die Nahrungs- und Sauerstoffzufuhr über das Blut wäre eine Tumorexpansion nicht möglich. An der Angiogenese ist der EGF-Rezeptor ebenfalls beteiligt. Die Aktivierung des Rezeptors kann in Tumorzelllinien die Produktion von gefäßstimulierenden Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) und IL-8 (Interleukin 8) erhöhen (MAITY et al., 2000; BANCROFT et al., 2002). Durch Blockade des EGF-Rezeptors wird die Expression der stimulierenden Faktoren VEGF, IL-8 und bFGF (basic fibroblast growth factor) reduziert (PETTIT et al., 1997; PERROTTI et al., 1999; MENDELSON, 2001).

Die Migration von Zellen spielt in der Entwicklung von Geweben eine große Rolle und wird wie viele andere zelluläre Prozesse durch den EGF-Rezeptor und seine Liganden beeinflusst. In Tumoren ist die Migration von Zellen essentiell für die Metastasierung. Die Überexpression von EGFR verbessert die Zellmigration (VERBEEK et al., 1998), induziert die Loslösung der Zellen von der extrazellulären Matrix (SCHULZE et al., 2001) und fördert die Produktion der Matrix Metalloproteinase (MMP)-9, welche die Zellinvasion erleichtert (O-CHAROENRAT et al., 2000; ELLERBROECK et al., 2001).

### **2.2.5.2. EGF-Rezeptor und Tumorprognose**

In vielen Studien wurde eine Korrelation zwischen EGFR-Expression und einer schlechten Prognose mit reduzierter Überlebenszeit und erhöhtem Rezidiv- und Metastasierungsrisiko demonstriert. Eine Analyse von über 200 Studien, die zwischen 1985 und 2000 veröffentlicht wurden, beschreibt die EGFR-Expression als einen guten prognostischen Indikator, vor allem bei Kopf-Hals-Tumoren, Ovarial-, Zervix-, Blasen- und Ösophaguskarzinomen (NICHOLSON et al., 2001). In diesen Tumoren korreliert die EGFR-Expression mit einem reduzierten Überleben in 70% der Studien.

Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber zytotoxischen Therapien ist die Hauptursache des Versagens in der Behandlung von malignen Erkrankungen. In einigen Studien wurden erhöhte EGFR-Level mit dieser Resistenzentwicklung gegenüber Hormonbehandlung, Chemo- und Radiotherapie in Verbindung gebracht. Dieser Zusammenhang wurde besonders bei Kopf-Hals-Tumoren (SHERIDAN et al., 1997; CHEN et al., 2000; GUPTA et al., 2002), Mammakarzinomen (NICHOLSON et al., 1988; NICHOLSON et al., 1989), Lungenkrebs (VOLM et al., 1992) sowie Ovarial- und Zervixkarzinomen (KOHLENER et al., 1989; FISCHER-COLBRIE et al., 1997) deutlich. Auch in Glioblastomen wird die Überexpression des EGF-Rezeptors mit einer geringeren Radiosensibilität verbunden (BARKER et al., 2001; CHAKRAVARTI et al., 2004).

### **2.2.6. Die Blockade des EGF-Rezeptors als neue therapeutische Strategie**

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors hat eine entscheidende Bedeutung in der Tumorentwicklung und -Progression. Aus diesem Grund wird die Blockade des EGF-Rezeptors als neue Strategie in der Behandlung von malignen Erkrankungen angesehen.

In präklinischen Studien wurde gezeigt, dass die Blockade des EGF-Rezeptors eine therapeutische Option in der Tumorbehandlung darstellt, welche die Wirksamkeit von Chemo- und Radiotherapie durch Rezeptorblockade potenziert (HERBST et SHINE, 2002).

Die Signalübertragung über den EGF-Rezeptor ist ein komplexer Prozess, ausgehend von Ligandenbindung über Signaltransduktionskaskaden und Veränderungen in der Genexpression, der viele Möglichkeiten der therapeutischen Intervention bietet. Darauf basierend wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Wirkung des EGF-Rezeptors in Tumoren zu hemmen. (WOODBURN, 1999; CIARDIELLO et TORTORA, 2002; MODI et SEIDMAN, 2002). Die Hauptstrategien sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Strategie	Wirkmechanismus	Effekt
Anti-EGFR-Antikörper	Bindung an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors	Blockade der Ligandenbindung und der Signaltransduktion
Tyrosinkinaseinhibitoren	Bindung an die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne	Blockade der Signaltransduktion
Antisense Oligonukleotide	Bindung an EGFR/Liganden mRNA	Verhinderung der Transkription und Produktion von EGFR/Liganden
Impfstoffe gegen EGFR/Liganden	Stimulation der Produktion von Antikörpern, die an EGFR/Ligand binden; Stimulation des Immunsystems	Blockade der Ligandenbindung; Induktion einer Immunreaktion gegen den Tumor
Immunokonjugate (an Antikörper gekoppelte radioaktive Isotope oder Cytotoxine)	Bindung an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors	Nach Internalisierung: Inhibition der Proteinsynthese und Induktion des Zelltods

**Tabelle 4:** Strategien der EGFR-Blockade

Die größte Bedeutung in der klinischen Entwicklung erlangten monoklonale Antikörper gegen den EGF-Rezeptor und niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren (MENDELSON et BASELGA, 2003).

Monoklonale Antikörper binden mit einer höheren Affinität an der extrazellulären Domäne des Rezeptors als natürliche Liganden und verhindern dadurch die ligandeninduzierte Aktivierung der EGFR-Signalkaskaden (MENDELSON, 1997; BASELGA, 2000). Nach Antikörperbindung wird der Rezeptor internalisiert und abgebaut, womit er einer erneuten Aktivierung nicht mehr zur Verfügung steht (PREWETT et al., 1996).

Tyrosinkinaseinhibitoren sind niedermolekulare Moleküle, die um die ATP-Bindungsstelle der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne konkurrieren und damit die Signaltransduktion hemmen.

### 2.3. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD 1839 „Iressa®“

In den letzten zehn Jahren wurde eine Vielzahl von Tyrosinkinaseinhibitoren entwickelt, von denen einige in klinischen Studien evaluiert werden (LEVITZKI et GAZIT, 1995; KLOHS et al., 1997; LEVITZKI et KOTY, 1999; NOONBERG et BENZ, 2000), darunter auch der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“.

Nach der chemischen Struktur ist ZD1839 „Iressa®“ ein 4-(3-chlor-4-fluoroanilin)-7-methoxy-6-(3-morpholinopropoxy)-Quinazolin mit der Summenformel  $C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$ . Der Tyrosinkinaseinhibitor „Iressa®“ ist eine niedermolekulare Substanz mit einer relativen Molekülmasse von 446,9.

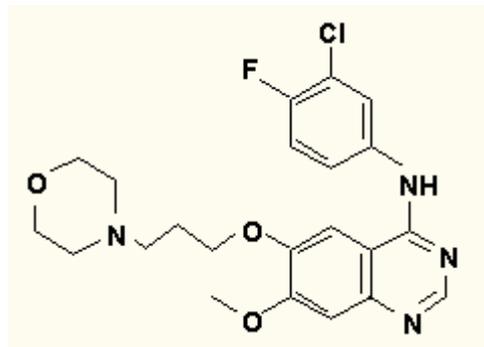


Abbildung 3: Strukturformel von „Iressa®“

Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ lagert sich kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle der intrazellulären Tyrosinasedomäne an und hemmt dadurch die ligandeninduzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors und die Signaltransduktion (WAKELING et al., 1996). „Iressa®“ blockiert spezifisch die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors (EGFR  $IC_{50} = 23$  nmol/l), andere Rezeptoren wie HER2/ErbB2 sprechen erst bei ungefähr 100fach höherer Dosis auf „Iressa®“ an (HER2/ErbB2  $IC_{50} = 3,7$   $\mu$ mol/l) (RABEN et al., 2002). Die Blockade durch „Iressa®“ ist reversibel (CIARDELLO et TORTORA, 2001), der hemmende Effekt ist in Zellkultur bis mindestens 24 Stunden nach Entfernung von „Iressa®“ aus dem Kulturmedium nachweisbar (RABEN et al., 2002).

Durch die niedrige Molekularmasse wird eine gute Penetration in das Tumorgewebe erreicht und die orale Verabreichung ermöglicht (BARKER et al., 2001).

In einer Vielzahl von präklinischen Studien wurde die Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 „Iressa®“ auf Tumorzellen sowohl in vitro als auch in vivo Versuchen untersucht, um die Bedeutung dieser gezielten Rezeptorblockade für die Behandlung maligner Erkrankungen zu evaluieren (CIARDIELLO et al., 2000; SEDLACEK, 2000; CIARDIELLO et al., 2001).

CIARDIELLO et al. konnten zeigen, dass die Inkubation mit „Iressa®“ in vitro eine dosisabhängige Proliferationshemmung bei Mamma-, Ovarial- und Kolonkarzinomzelllinien bewirkt. Dieser antiproliferative Effekt war hauptsächlich zytostatisch, eine gesteigerte Apoptoserate wurde erst bei höheren „Iressa®“-Dosen beobachtet. Darüber hinaus konnte die dosisabhängige Wachstumshemmung auch bei Kolonkarzinom-Xenograft-Tumoren gezeigt werden (CIARDIELLO et al., 2000). Diese dosisabhängige Reduktion der Proliferation wurde ebenso bei Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien beobachtet (RABEN et al., 2002). In Kombination mit Chemotherapeutika wie z.B. Cisplatin zeigte die Blockade des EGF-Rezeptors mittels „Iressa®“ sowohl in vitro als auch in vivo eine verstärkte Effizienz der Zytostatika (CIARDIELLO et al., 2000; SIROTNAK et al., 2000; CIARDIELLO et al., 2002; MAGNE et al., 2002). Für viele Tumoren wurde auch eine additive oder synergistische Wirkung beschrieben, wenn ZD1839 „Iressa®“ mit Bestrahlung kombiniert wird (CIARDIELLO et TORTORA, 2001; BIANCO et al., 2002; RABEN et al., 2002; SOLOMON et al., 2003).

In mehreren Phase I Studien wurde das Toxizitätsprofil und die antitumorale Wirksamkeit einer Monotherapie mit unterschiedlichen ZD1839 „Iressa®“ Dosierungen und Applikationsschemata untersucht. Für diese Studien wurden intensiv vorbehandelte Patienten mit EGFR-überexprimierenden soliden Tumoren wie Nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom, Prostata-, Kolorektal-, Mamma-, Ovarialkarzinom und Kopf-Hals-Tumoren rekrutiert. Diese Studien zur Monotherapie zeigten ein günstiges Nebenwirkungsprofil von „Iressa®“. Es wurden keine hämatologischen, kardio-, neuro-, oder nephrotoxischen Nebenwirkungen beobachtet. Die häufigsten unerwünschten Wirkungen waren leichte Diarrhoe und Akne-ähnlicher Hautausschlag. Diese Nebenwirkungen waren meist mild (WHO Grad 1-2) und reversibel. Bei verschiedenen Tumoren zeigte „Iressa®“ eine gute antitumorale Wirksamkeit mit Stabilisierung der Krankheit und Tumorrückbildung (BASELGA et al., 2002; HERBST et al., 2002; RANSON et al., 2002).

In den Phase II Studien IDEAL 1 und IDEAL 2 wurde gezeigt, dass ZD1839 „Iressa®“ eine neue Option in der Behandlung von Patienten mit austherapiertem fortgeschrittenem Nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom darstellt. Durch „Iressa®“ wurden die tumorassoziierten Symptome klinisch signifikant gebessert und eine gesteigerte Lebensqualität erreicht (NATALE et ZARETSKY, 2002). Ausgehend von diesen viel versprechenden Ergebnissen der IDEAL 1 und 2 Studien wurde der

Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ 2002 in Japan und 2003 in den USA als Therapie des inoperablen oder rezidivierenden Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms unter dem Handelsnamen „Gefitinib“ zugelassen. Auch in Korea, Australien, Argentinien und Singapur ist „Iressa®“ als second-line Therapie des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms zugelassen.

In den Phase III Studien INTACT 1 und INTACT 2 wurde die präklinisch belegte synergistische Wirkung der Kombination aus „Iressa®“ und konventionellen Zytostatika allerdings nicht bestätigt (JOHNSON, 2003; GIACCIONE et al., 2004; HERBST et al., 2004).

#### **2.4. Die Aufgabenstellung der Arbeit**

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde die Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 „Iressa®“ sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit hyperfraktionierter Radiatio auf die menschlichen Gliomzelllinien U343 und U373 am in vitro Modell untersucht. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die Auswirkungen der Mono- und Kombinationstherapie auf die Zellproliferation und auf die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene.

Die Standardtherapie von malignen Gliomen besteht hauptsächlich aus der chirurgischen Resektion und der postoperativen Strahlentherapie (CHAMBERLAIN et KORMANIK, 1998; BURTON et PRADOS, 2000). Bei der Strahlentherapie wird in Form einer perkutanen Herdbestrahlung eine Gesamtdosis von 60 Gy appliziert. Diese Gesamtdosis kann fünfmal die Woche à 2 Gy pro Fraktion über 6 Wochen oder hyperfraktioniert à 1,5 Gy pro Fraktion über 4 Wochen verabreicht werden. Um diesen Bestrahlungsschemata möglichst zu entsprechen, wurde in dieser Arbeit ein hyperfraktionierter Bestrahlungsmodus über vier Tage gewählt. In den verschiedenen Versuchsansätzen wurden dabei die Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy pro Fraktion appliziert.

Trotz der nachgewiesenen Wirksamkeit von Radiotherapie kommt es zur Ausbildung von Rezidiven und zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber ionisierender Bestrahlung. In mehreren Studien wurde diese Resistenzentwicklung gegenüber Strahlentherapie mit erhöhter EGFR-Expression assoziiert (BARKER et al., 2001; HARARI et HUANG, 2001; CHAKRAVARTI et al., 2004). Weiterhin hat sich in mehreren Studien gezeigt, dass die Behandlung mit ionisierender Strahlung die Aktivierung des EGF-Rezeptors induzieren kann und so über den MAP-Kinase Pathway zu einer gesteigerten Proliferation führt (SCHMIDT-ULLRICH et al. 1997; DENT et al., 1999). Damit hat Strahlentherapie, neben dem gewünschten zytotoxischen Effekt, durch die EGFR-Aktivierung auch zytoprotektive Wirkung auf Tumorzellen (SCHMIDT-ULLRICH et al., 1999, SCHMIDT-ULLRICH et al., 2000). Um die Bedeutung der bestrahlungsinduzierten

Aktivierung des EGF-Rezeptors in Gliomzelllinien hinsichtlich der Proliferation zu erfassen, wurde in dieser Arbeit hyperfraktionierte Bestrahlung mit der simultanen Verabreichung des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 „Iressa®“ kombiniert.

Das Proliferationsverhalten der verwendeten Gliomzelllinien U343 und U373 wurde damit nach folgenden Behandlungsschemata mittels des WST-Assays untersucht:

1. nach viertägiger hyperfraktionierter Bestrahlung mit den Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy
2. nach viertägiger Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“
3. nach viertägiger Kombinationsbehandlung bestehend aus hyperfraktionierter Bestrahlung mit den Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy, 1,5 Gy und simultaner Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“

Die Blockade des EGF-Rezeptors bedeutet einen Eingriff in ein komplexes Netzwerk der Signalübertragung und Regulation in der Zelle. Die intrazellulären Vorgänge innerhalb dieses Netzwerkes sind kompliziert, vielschichtig und bislang noch nicht vollständig bekannt. Aus diesem Grund ist es nicht nur interessant das Proliferationsverhalten der Gliomzelllinien unter den drei beschriebenen Behandlungsschemata zu betrachten sondern auch die Auswirkungen dieser Behandlungen auf den EGF-Rezeptor selbst. Um den Einfluss auf den Rezeptor zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Expression des EGF-Rezeptors sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene dargestellt.

Die Zellen wurden wiederum nach folgenden Schemata behandelt:

1. viertägige hyperfraktionierte Bestrahlung mit den Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy
2. viertägige Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“
3. viertägige Kombinationsbehandlung bestehend aus viertägiger hyperfraktionierter Bestrahlung mit den Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy, 1,5 Gy und simultaner Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“

Die Expression des Rezeptors auf mRNA-Ebene wurde mittels Real-Time RT-PCR dargestellt, die Expression auf Proteinebene mittels Western Blot. Um Veränderungen der Rezeptorexpression in ihrem Verlauf darzustellen, wurden verschiedene Zeitpunkte nach der letzten Behandlung für die Untersuchungen gewählt.



BC Assay: protein quantitation kit (Interchim Uptima, Montlucon Cedex, Frankreich)

Multiskan Ascent ELISA-Reader (Thermo Life Sciences, Egelsbach)

SDS-Stop-Puffer (Stocklösung): 125 mM Tris pH-Wert 6,8

3 mM EDTA

20% (v/v) Glycerol

9% SDS

0,05% Bromphenolblau

Pufferstammlösungen für die SDS-Page nach Laemmli:

- Trenngelpuffer (Lösung A): 375 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,8  
0,1% (v/v) SDS
- Sammelgelpuffer (Lösung B): 125 mM Tris-HCl, pH-Wert 6,8  
0,1% (v/v) SDS
- Lösung C: Rotiphorese Gel 30

Trenngel: 2,5 ml Lösung A

2,48 ml Lösung C

650  $\mu$ l Glycerinlösung (50% H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> + 50% Glycerin)

4 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

10  $\mu$ l TEMED

50  $\mu$ l 10% APS

Sammelgel: 2,5 ml Lösung B

1166  $\mu$ l Lösung C

6,3 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

7  $\mu$ l TEMED

100  $\mu$ l 10% APS

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1% (v/v) SDS

Transferpuffer: 25 mM Tris

192 mM Glycin

20% (v/v) Methanol

Blotting-Apparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco)

Nitrozellulose Membran Hybound™ ECL™ (Amersham Biosciences, Freiburg)

Proteinmarker: Roti-Mark Standard

TBST: 10 mM Tris-HCl pH-Wert 8,0

150 mM NaCl

0,05% (v/v) Tween 20

Magermilchpulver (Naturaflor, Töpfer, Dietmannsried)

Primärer Antikörper: Santa Cruz Biotechnologie: EGFR (1005) sc-03 gereinigter, polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanen EGF-Rezeptor

Sekundärer Antikörper: Jackson Immuno Research Laboratories, INC.: Meerrettich-Peroxidasegekoppelter Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper

ECL™-plus (Amersham Biosciences, Freiburg)

Röntgenfilm Curix HC 1.000 L (AGFA-Gevaert, Mortsel, Belgien)

Digital-Kamera QV-R3 (Casio Computer CO., LTD. Tokyo, Japan)

### 3.1.3. Real-Time RT-PCR

RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden)

β-Mercaptoethanol (Sigma, Steinheim)

Omniscript Reverse Transcriptase Kit (QIAGEN GmbH, Hilden)

RNasin® (Promega, Heidelberg)

Oligo-dT Primer (Promega, Heidelberg)

Thermoblock (Biometra, Göttingen)

LightCycler™ Instrument (Roche, Mannheim)

Lightcycler™ Software Version 3.5. (Roche, Mannheim)

QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden)

Sequenzspezifische Oligonukleotide als Primer

EGFR-1 forward 5`-GCCGACAGCTATGAGATGG-3`

EGFR-3 reverse 5`-CCCCTAAATGCCACCGGC-3`

PBGD-1 forward 5`-GGAGCCATGTCTGGTAACG-3`

PBGD-2 reverse 5`-GAATCTTGTCCCCTGTGGT-3`

Glaskapillare (Boehringer, Mannheim)

RNA/DNA Calculator Gene QuantII (Pharmacia Biotech/Amersham, Freiburg)

### 3.1.4. WST-Assay

Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Mannheim)

96-well Microtiterplatte, 0,31 cm<sup>2</sup>, flach (Roth, Karlsruhe)

Multiskan Ascent ELISA-Reader (Thermo Life Sciences, Egelsbach)

Filter 450 nm und 630 nm (Thermo Life Sciences, Egelsbach)

Ascent Software Version 2.4.1. (Thermo Life Sciences, Egelsbach)

### 3.2. Zellkultur

Die maligne Astrocytomzelllinie U343MG-a (DIRKS et al., 1997) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. G. Thiel (Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) zur Verfügung gestellt.

Die menschliche Gliomzelllinie U373MG wurde freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. V. Senner (Institut für Neuropathologie, Westfälische Wilhelms Universität, Münster) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in „Dulbecco`s Modified Eagle Medium“ (DMEM), 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 6 ml Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert.

Zum Passagieren und Ernten der Zellen wurde, wenn nicht anders beschrieben, Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% (w/v) in PBS verwendet. Die notwendigen Waschschrte erfolgten mit PBS.

Das Auszählen der Zellzahl für die darauf folgenden Versuche erfolgte mittels der Neubauer Zählkammer.

#### 3.2.1. Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“

Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ wurde in einer Stocklösung mit DMSO 10 mM angesetzt und lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt.

Den Zellen wurde „Iressa®“ täglich 1 Stunde vor der ersten Bestrahlung 1 µM in frischem Medium zugesetzt.

Bei den Zellen, die nicht mit dem Tyrosinkinaseinhibitor „Iressa®“ behandelt wurden, wurde auch täglich ein Mediumwechsel durchgeführt.

### 3.3. Bestrahlung

Die Zellen wurden hyperfraktioniert über 4 Tage mit den jeweiligen Einzeldosen 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy bestrahlt. So ergaben sich Gesamtdosen von 4 Gy, 8 Gy und 12 Gy. Dieses Bestrahlungsschema wurde in beiden Versuchsansätzen angewendet.

Für jeden Versuchsansatz (mit/ohne „Iressa®“) wurden mehrere unbestrahlte Kontrollen mitgeführt, die je nach Versuchsaufbau entsprechend behandelt wurden.

Die Bestrahlung erfolgte am Linearbeschleuniger Mevatron MDX der Firma Siemens mit Photonen der Grenzenergie 6 MeV. Die Kulturflaschen wurden auf eine 1 cm dicke Plexiglasplatte aufgebaut. Der Gantrywinkel betrug 180 Grad, das heißt das Strahlenbündel traf zunächst auf das Plexiglas und dann auf den Boden der Zellkulturflasche mit den adhären Zellen. Der Fokus-Plexiglasoberflächen-Abstand betrug 100 cm, die Feldgröße 30 x 30 cm. Da sich die Zellen in einem Abstand befanden, unmittelbar nachdem das Dosismaximum erreicht war und die Tiefendosis Kurve hier noch nicht ausgeprägt abflacht, wurde auf diese Weise gewährleistet, dass die verabreichte Dosis homogen verteilt wurde. Die Tangente an der Tiefendosis Kurve verläuft hier nahezu horizontal. Die Monitoreinheiten wurden anhand von Messungen mit Thermolumineszenzstäbchen (TLD) ermittelt.

### 3.4. Western Blot

Der Western Blot wurde modifiziert nach Laemmli (LAEMMLI, 1970) durchgeführt.

18 Stunden vor der ersten Bestrahlung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Die Zellen wurden über 4 Tage hyperfraktioniert bestrahlt.

Eine Stunde bzw. 3 Stunden nach der letzten Bestrahlung wurden die Zellen mit kaltem PBS + Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (20  $\mu$ l PMSF/ml PBS) gewaschen, in 3 ml PBS + PMSF mit dem Zellschaber geerntet und bei 400\*g und 2°C 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in PBS + PMSF resuspendiert, nochmals bei 400\*g und 2°C 5 Minuten zentrifugiert und wieder der Überstand abgesaugt.

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis mit vorgekühlten Lösungen.

### 3.4.1. Proteinpräparation

Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Lysispuffer aufgenommen. Die Mischung aus Zellpellet und Lysispuffer wurde 60 Minuten auf Eis inkubiert und währenddessen alle 10 Minuten für 10 Sekunden gevortext. Das so entstandene Lysat wurde bei 16000\*g und 2°C 15 Minuten zentrifugiert, um die Proteine separat im Überstand zu erhalten.

### 3.4.2. Proteingehaltsbestimmung

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BC Assay: protein quantitation kit der Firma Uptima/Interchim (Montlucon Cedex, Frankreich) gemäß Protokoll. Mittels ELISA-Reader wurde die Absorption der Proteinproben bei 570 nm gemessen und unter Verwendung der Ascent Software Version 2.4.1. die Proteinkonzentration anhand von Standards berechnet.

Die Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer (9 Vol. SDS-Stopp-Puffer + 1 Vol.  $\beta$ -Mercaptoethanol) auf eine Gesamtmenge von 1,2  $\mu$ g verdünnt.

### 3.4.3. Elektrophorese und Blotting

Die mit SDS-Probenpuffer verdünnten Proteine wurden bei 95°C für 5 Minuten denaturiert, 1,2  $\mu$ g Protein auf ein Polyamidgel aufgetragen und über eine SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt.

Gelzusammensetzung: Trenngel: 2,5 ml Lösung A

2,48 ml Lösung C

650  $\mu$ l Glycerinlösung (50%  $H_2O_{dd}$  + 50 % Glycerin)

4 ml  $H_2O_{dd}$

10  $\mu$ l TEMED

50  $\mu$ l 10% APS

Sammelgel: 2,5 ml Lösung B

1166  $\mu$ l Lösung C

6,3 ml  $H_2O_{dd}$

7  $\mu$ l TEMED

100  $\mu$ l 10% APS

Unter Verwendung einer Blotting-Apparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) wurden die aufgetrennten Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert. Um unspezifische Bindungsstellen an der Membran zu blocken, wurde die Membran 1 Stunde in TBST und 5% (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Nach dem Blocken wurde die Membran dreimal mit TBST jeweils 10 Minuten gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in der Verdünnung 1:1000 erfolgte 1,5 Stunden auf dem Wippeltisch. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:20000 eine Stunde auf dem Wippeltisch. Die Membran wurde wieder dreimal mit TBST gewaschen.

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Primärantikörper :

EGFR (1005) sc-03 gereinigter, polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanen EGF-Rezeptor (Santa Cruz Biotechnologie, USA); Verdünnung 1:1000 in TBST

Sekundärantikörper:

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziegen-anti Kaninchen-IgG-Antikörper (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., USA); Verdünnung 1:20000 in TBST

#### **3.4.4. Detektion und Entwicklung**

Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL<sup>TM</sup>-plus Tests (Amersham, Biosciences, Freiburg) gemäß Protokoll. Mit den fluoreszierenden Proteinbanden wurde ein Röntgenfilm eine Minute belichtet. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde jeder Western Blot zweimal durchgeführt.

### 3.4.5. Quantifizierung

Um die Ergebnisse des Western Blot zu objektivieren, wurden die auf Röntgenfilm sichtbar gemachten Proteinbanden densitometrisch gemessen. Für diese Messung wurden die Röntgenfilme zuerst an einem Röntgenfilmbetrachter angebracht und mit einer Digitalkamera abfotografiert. Um das Verwackeln der Bilder zu verhindern, wurde die Digitalkamera auf einem Stativ befestigt. Mit Hilfe der Software „NIH Image J 1.29x“ (Image J 1.29x; Wayne Rasband; National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, Java 1.3.1.) erfolgte die densitometrische Messung der Proteinbanden und des Hintergrundes. Durch Subtraktion der beiden Messwerte erhielt man hintergrundbereinigte Ergebnisse für die objektive Quantifizierung und Auswertung des Western Blot.

## 3.5. PCR-Analyse

### 3.5.1. Prinzip der Real-Time RT-PCR

Die 1987 von Mullis und Faloona (MULLIS et FALOONA, 1987) beschriebene PCR (Polymerase Kettenreaktion) ist eine Methode, welche die in vitro-Amplifizierung von DNA ermöglicht hat.

Mit Hilfe der Real-Time RT-PCR hat man nun die Möglichkeit auch mRNA zu amplifizieren. Bei dieser Methode wird die isolierte mRNA zunächst mit der reversen Transkriptase (RT) in komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) umgeschrieben. Die gewonnene cDNA dient nun als Ausgangsmaterial für die Amplifikation mittels PCR. Dabei wird zunächst die cDNA durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Daran schließt sich die Annealing Phase bei niedriger Temperatur (üblicherweise 50–60°C) an; darunter versteht man das Anlagern von sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die als Primer für die de novo Synthese von DNA dienen, an den DNA-Einzelstrang. In der Elongationsphase wird durch Zugabe einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) der Einzelstrang bei 72°C zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert. Durch mehrfache Wiederholung dieses Reaktionszyklus, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation, ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Mit Hilfe des LightCycler™ Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim) werden die Reaktionszyklen automatisiert durchgeführt. Der LightCycler™ bietet zudem die Möglichkeit den exponentiellen Anstieg der DNA durch Verwendung der Substanz SYBR Green I (QantiTect SYBR Green PCR Kit, QIAGEN GmbH, Hilden) zu messen. SYBR Green I ist ein Farbstoff, der durch Interkalieren (d.h. Einlagerung) zwischen Basen des DNA-Doppelstrangs Fluoreszenzeigenschaften erhält. Während der PCR lagert sich SYBR Green I nach jedem Zyklus in die entstandenen Doppelstränge

ein, so dass die Zunahme der Fluoreszenz ein Maß für die Menge an Doppelstrang-DNA darstellt. Die Fluoreszenzzunahme wird am Ende jedes Elongationszyklus gemessen und kann während der gesamten PCR auf dem Monitor verfolgt werden (Real-Time). Da SYBR Green I nicht nur an der gesuchten, sondern unspezifisch an jeder Doppelstrang-DNA bindet, wird anhand einer Schmelzkurve das spezifische Produkt identifiziert. Da die Schmelztemperatur von der Länge des PCR-Produkts und der spezifischen Basensequenz abhängt, hat das amplifizierte Produkt eine spezifische Schmelztemperatur. Somit ist es häufig möglich, die Temperatur der Fluoreszenzmessung am Ende jedes Amplifikationszyklus in einen Bereich festzulegen, in dem nur noch das spezifische Produkt als Doppelstrang vorliegt.

### 3.5.2. RNA-Extraktion

Für die Messung der EGFR-Expression auf mRNA-Ebene wurden 18 Stunden vor Bestrahlung  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Die Zellen wurden über vier Tage hyperfraktioniert bestrahlt.

Eine Stunde, 3 Stunden und 4 Stunden nach der letzten Bestrahlung wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gemäß Protokoll die Gesamt-RNA extrahiert.

Nach dem Ernten wurden die Zellen in Medium aufgenommen, um das Trypsin/EDTA zu inaktivieren, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei  $300 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in  $350 \mu\text{l}$  Buffer RLT + 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgelöst und anschließend homogenisiert. Es wurde  $350 \mu\text{l}$  70% Ethanol zugefügt und suspendiert.  $700 \mu\text{l}$  der Suspension wurden in eine „RNeasy Mini Column“ überführt, die in einem 2 ml Sammelröhrchen steckt, 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die „RNeasy Mini Column“ zu waschen, wurden  $700 \mu\text{l}$  Buffer RW1 zugegeben, 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Der nächste Waschschrift wurde mit  $500 \mu\text{l}$  Buffer RPE durchgeführt, 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert und der Durchfluss abermals verworfen. Der dritte Waschvorgang wurde wiederum mit  $500 \mu\text{l}$  Buffer RPE durchgeführt, diesmal aber 2 Minuten bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die „RNeasy Mini Column“ wurde in ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen gesteckt und unter zweimaliger Zugabe von je  $25 \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser 1 Minute bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert. Im Eluat befand sich nun die Gesamt-RNA.

Die Menge der extrahierten RNA-Menge wurde mittels RNA/DNA Calculator Gene QuantII gemessen. Dabei wurde ein Aliquod der RNA-Probe mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> im Verhältnis 1:25 verdünnt.

### 3.5.3. First-strand cDNA Synthese

Die mRNA wurde mit Hilfe des Omniscript Reverse Transcriptase Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gemäß der Anleitung in cDNA umgeschrieben.

Dabei wurde jede Reaktion in einem Volumen von 20 µl, bestehend aus Master Mix und Template-RNA, durchgeführt. Der Master Mix setzte sich folgendermaßen zusammen: 2 µl 10x Buffer RT, 2 µl dNTP Mix, 2 µl Oligo-dT Primer, 1 µl RNase Inhibitor und 1 µl Omniscript Reverse Transcriptase. Der hierzu benötigte Oligo-dT Primer (Promega, Heidelberg) mit einer Ausgangskonzentration von 1,01x10<sup>2</sup> µmol/l wurde auf eine Endkonzentration von 1 µmol/l verdünnt. Der für die Reaktion verwendete RNase Inhibitor RNasin® (Promega, Heidelberg) mit einer Ausgangskonzentration von 40 u/µl wurde pro 20 µl Reaktion auf 10 units verdünnt. Die Menge an eingesetzter Template-RNA bewegte sich zwischen 100 ng und 1 µg. Das Gemisch aus Master Mix und RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und für 60 Minuten bei 37°C in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen) inkubiert. Die so gewonnene cDNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

### 3.5.4. Amplifikation und Messung der Fluoreszenz

Die cDNA wurde mit Hilfe des LightCyclers™ nach dem beschriebenen Prinzip der Real-Time RT-PCR amplifiziert und gemessen. Hierzu wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet.

Neben der EGFR-Expression wurde auch die Expression von Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) als so genanntes „house-keeping-gene“ gemessen. Folgende sequenzspezifische Oligonukleotide wurden als Primer zur Amplifikation der genannten DNA-Abschnitte eingesetzt:

EGFR-1 forward 5`-GCCGACAGCTATGAGATGG-3`

EGFR-3 reverse 5`-CCCCTAAATGCCACCGGC-3`

PBGD-1 forward 5`-GGAGCCATGTCTGGTAACG-3`

PBGD-2 reverse 5`-GAATCITGTCCCCTGTGGT-3`

Als Reaktionsgefäß für die eigentliche PCR-Reaktion im LightCycler™ wurden spezielle Glaskapillaren verwendet.

Da für jede Probe sowohl die EGFR- als auch die PBGD-Expression gemessen wurde, wurde jeweils ein Master Mix mit dem entsprechenden Primer angesetzt. Jeder Master Mix bestand aus 10 µl SYBR Green, 2 µl des entsprechenden Primer und 6 µl RNase-freiem Wasser.

Die cDNA-Proben wurden mit RNase-freiem Wasser so verdünnt, dass in jeder Reaktion die gleiche, einer mRNA-Menge von 5 ng entsprechenden, cDNA-Menge in 2 µl eingesetzt wurde. Aus den 18 µl Master Mix und den 2 µl cDNA ergab sich ein Gesamtvolumen von 20 µl, welches in die Glaskapillaren pipettiert wurde. Anschließend wurden die Kapillaren mit Deckeln verschlossen, kurz zentrifugiert und in das LightCycler™ Proben-Karussell gesetzt.

In jedem LightCycler™-Lauf wurde jeweils eine Leerprobe für EGFR und PBGD angesetzt.

Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde jede PCR dreimal durchgeführt.

Die einzelnen Arbeitsschritte des LightCycler™ wurden folgendermaßen definiert:

Zuerst erfolgte die Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase, indem die Proben für 900 Sekunden bei 95°C erhitzt wurden. Danach folgten 45 Amplifikationszyklen, wobei jeder Zyklus aus Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden, Annealing bei 58°C für 30 Sekunden und Elongation bei 72°C für 10 Sekunden bestand. Am Ende jeder Elongationsphase wurde die Fluoreszenzzunahme des SYBR Green I gemessen. Nach dem letzten Zyklus wurde eine Schmelzkurve (Melting Curve) angefertigt, um die spezifischen PCR-Produkte zu verifizieren. Dabei wurden die Proben kurz auf 95°C aufgeheizt, für 15 Sekunden auf 65°C abgekühlt und dann um 0,1°C/s bis auf 95°C unter ständiger Messung der Fluoreszenz aufgeheizt.

### 3.5.5. Auswertung

Die gewonnenen Daten aus der Amplifizierung und der Schmelzkurve wurden anhand der LightCycler™ Software Version 3.5. ausgewertet. Dabei wurde die EGFR-Expression nicht absolut, sondern relativ zu der Expression des schon erwähnten „house-keeping-gene“ Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) als Quotient EGFR/PBGD betrachtet. Unter einem „house-keeping-gene“ versteht man ein Gen, welches die Zelle unabhängig von äußeren Faktoren konstant exprimiert, um ihre basalen Funktionen aufrecht zu erhalten. Um die Expression von EGFR und PBGD quantifizieren zu können, wurden für jedes Produkt und jede Zelllinie so genannte Standardkurven erstellt. Für die Standardkurven wurden festgelegte mRNA-Mengen in einer Verdünnungsreihe mittels RT-PCR amplifiziert und gemessen. Mit Hilfe der Software LightCycler™ Version 3.5. wurden aus diesen Messdaten externe Standardkurven erstellt, die als Berechnungsgrundlage für jeden PCR-Lauf dienen.

### **3.6. WST- Assay**

#### **3.6.1. Prinzip des WST-Assays**

Der WST-Assay, benannt nach dem Tetrazolium Salz WST-1, ist ein kolorimetrischer Test zur Quantifizierung der Zellproliferation und des Zellüberlebens. In den letzten Jahren wurden verschiedene Tetrazolium Salze wie MTT (MOSMANN, 1983; CARMICHAEL et al., 1987; VISTICA et al., 1991), XTT (SCUDIERO et al., 1988; WEISLOW et al., 1989; ROEHM et al., 1991) und MTS (CORY et al., 1991) für die Messung der Zellproliferation verwendet. Der Test beruht auf der Spaltung des Tetrazolium Salzes WST-1 durch mitochondriale Enzyme lebender Zellen. Dabei wird WST-1 durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System in den roten Farbstoff Formazan umgesetzt. Die Zunahme der Zellzahl bedeutet eine gesteigerte Aktivität der mitochondrialen Enzyme, wodurch die Menge an gebildetem Farbstoff ansteigt. Somit korreliert die Zellzahl direkt mit der gebildeten Farbstoffmenge. Die Quantifizierung des gebildeten Farbstoffs erfolgt mittels ELISA-Reader durch Messung der Absorption bei 450 nm (Substratmessung) und 630 nm (unspezifischer Hintergrund). Mit Hilfe von Eichkurven kann aus der Absorption bei 450 nm die Zellzahl ermittelt werden.

#### **3.6.2. Vorversuch und Erstellen der Eichkurven**

Gemäß Protokoll wurden zuerst Vorversuche gemacht, um den optimalen Messzeitpunkt nach Inkubation mit WST-1 zu ermitteln. Dafür wurden für jede Zelllinie folgende Zellzahlen: 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000, 22000, 24000, 26000, 28000, 30000, 32000, 34000, 36000, 38000, 40000, 42000, 44000, 46000, 48000, 52000, 56000, 62000, 66000 in mehrere 96-well Microtiterplatten ausgesät und jede Kavität mit 100 µl Medium befüllt. Nach 6 Stunden wurde das Medium aus jeder Kavität abgesaugt und durch 100 µl Medium + 10 µl WST-1 pro Kavität ersetzt. Die Messung der Absorption bei 450 nm und 630 nm mittels ELISA-Reader erfolgte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten: 0,5 Stunden, 1 Stunde, 1,5 Stunden, 2 Stunden, 2,5 Stunden, 3 Stunden, 3,5 Stunden und 4 Stunden. Als Kontrollen wurden pro Microtiterplatte 3 Kavitäten mit 100 µl Medium + 10 µl WST-1 gemessen. Der Mittelwert dieser Werte wurde als „blank“ von den eigentlichen Messwerten abgezogen, um Fehler durch die Messung unspezifischer Absorption zu vermeiden.

Für die Zelllinie U343 ergab sich der geeignete Messzeitpunkt 1,5 Stunden nach Inkubation mit WST-1, für die Zelllinie U373 1 Stunde nach der Inkubation.

Aus den gemessenen Absorptionen bei steigender Zellzahl konnten für jede Zelllinie Eichkurven erstellt werden, anhand derer man aus der Absorption die Zellzahl ermitteln konnte.

Für die Messung der Absorption und das Erstellen der Eichkurven wurde die Ascent Software Version 2.4.1. verwendet.

### 3.6.3. Hauptversuch

Auch für den WST-Assay wurden die Zellen über 4 Tage hyperfraktioniert mit den Einzeldosen 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy jeweils mit und ohne den Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 („Iressa®“) bestrahlt.

15 Stunden vor der ersten Bestrahlung wurden 2500 Zellen pro well ausgesät. Der Tyrosinkinaseinhibitor „Iressa®“ wurde den Zellen täglich 1 Stunde vor der morgendlichen Bestrahlung 1  $\mu\text{M}$  in frischem Medium zugesetzt. Bei den unbehandelten Zellen fand täglich 1 Stunde vor der ersten Bestrahlung ein Mediumwechsel statt. Nach der letzten Bestrahlung wurde aus allen Kavitäten das Kulturmedium abgesaugt und durch 250  $\mu\text{l}$  frisches Medium ersetzt. Folgende Zeitpunkte wurden zur Durchführung des WST-Assay festgelegt: 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden nach der letzten Bestrahlung. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde das Medium der entsprechenden Kavitäten abgesaugt und durch 100  $\mu\text{l}$  Medium + 10  $\mu\text{l}$  WST-1 ersetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei der Zelllinie U343 und 1,5 Stunden Inkubation bei der Zelllinie U373 erfolgte die Absorptionsmessung (450 nm, 630 nm) mittels ELISA-Reader. Auch im Hauptversuch wurden als Kontrollen Kavitäten nur mit 100  $\mu\text{l}$  Medium + 10  $\mu\text{l}$  WST-1 gemessen und der Mittelwert dieser Messungen als „blank“ von den eigentlichen Ergebnissen abgezogen. Damit wurden Fehler durch die Messung unspezifischer Absorption vermieden.

Mit Hilfe der im Vorversuch erstellten Eichkurven konnte aus den gemessenen Absorptionen die entsprechende Zellzahl ermittelt werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde jeder Versuch dreimal durchgeführt, die Auswertung erfolgte mittels Ascent Software Version 2.4.1.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. WST-Assay

Der WST-Assay diene, wie in Kapitel drei beschrieben, als kolorimetrischer Test zur Quantifizierung des Zellüberlebens und der Zellproliferation. Anhand dieser Methode wurde in dem ersten Versuchsansatz die Wirkung von hyperfraktionierter Radiatio über 4 Tage mit den Einzeldosen 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy auf das Zellwachstum der verwendeten menschlichen Gliomzelllinien U343 und U373 untersucht. Ein zweiter Versuchsansatz wurde mit dem EGFR-spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ modifiziert. In diesem zweiten Versuchsansatz wurde die Wirkung von „Iressa®“ alleine und in Kombination mit hyperfraktionierter Radiatio auf das Zellüberleben und Zellwachstum untersucht.

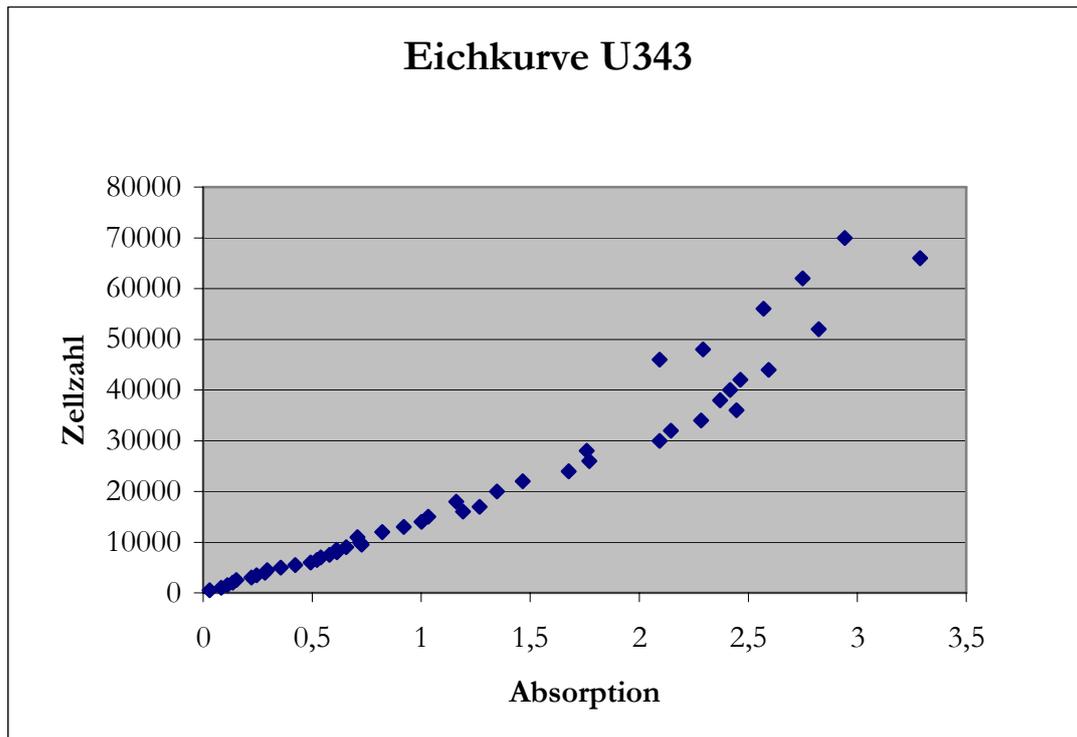
Als Messzeitpunkte zur Durchführung des WST-Assays wurden 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden nach der letzten Bestrahlung festgelegt. Mit den unbestrahlten Kontrollgruppen, jeweils mit und ohne „Iressa®“, wurde in dem gleichen Zeitfenster verfahren.

#### 4.1.1. Eichkurven

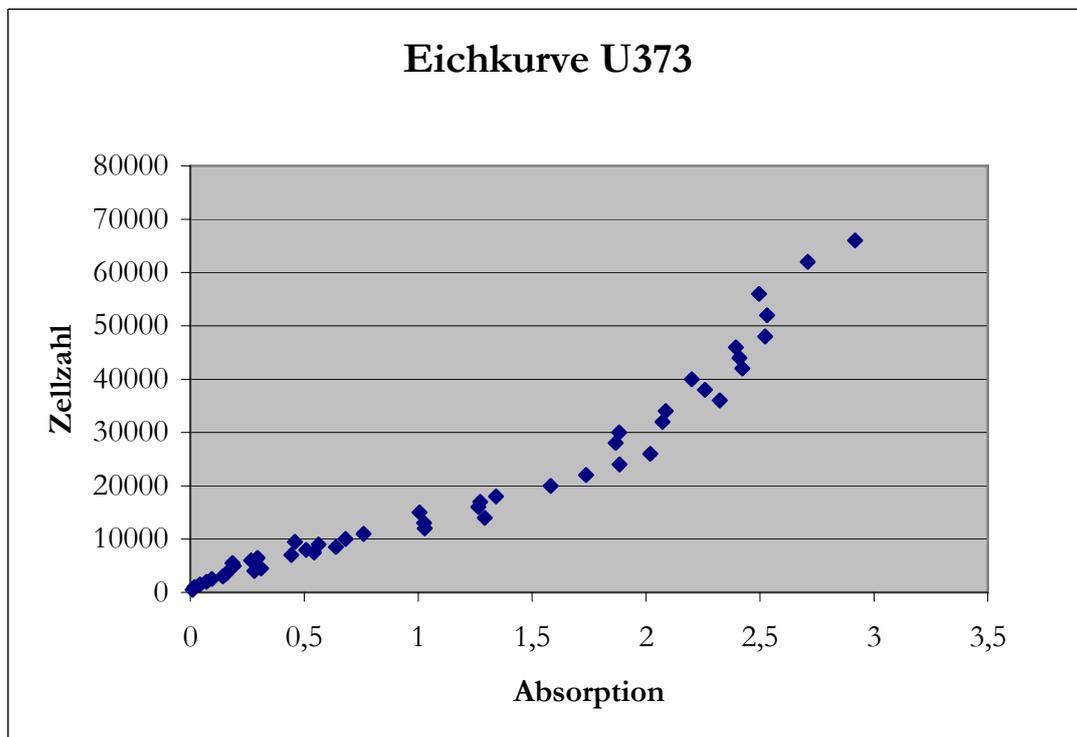
In Vorversuchen wurden für beide Gliomzelllinien Eichkurven erstellt, anhand derer man in den Hauptversuchen von der gemessenen Absorption auf die Zellzahl schließen konnte. Für das Erstellen der Eichkurven wurden mehrere 96-well Microtiterplatten mit aufsteigenden Zellzahlen ausgesät. Die Microtiterplatten wurden unterschiedlich lange mit dem Salz WST-1 inkubiert und anschließend die Absorption mittels ELISA-Reader gemessen. Als optimaler Messzeitpunkt wurde die Inkubationszeit ausgewählt, bei der die Eichkurve den längsten linearen Verlauf zeigte. So wurden für die Zelllinie U343 90 Minuten und für die Zelllinie U373 60 Minuten Inkubationszeit mit der Substanz WST-1 ermittelt.

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen die erstellten Eichkurven für die Gliomzelllinien U343 und U373. Bei beiden Eichkurven erkennt man, dass der lineare Trend zwischen Zunahme der Absorption und ansteigender Zellzahl nur bis zu einem gewissen Punkt gewahrt bleibt. Bei beiden Zelllinien liegt dieser Punkt etwa bei 40000 Zellen. Aus diesem Grund wurden die Regressionsgeraden nur für den linearen Teil der Eichkurven ermittelt. Die Regressionsgeraden sind Funktionen, welche die Berechnung der Zellzahl anhand der gemessenen Absorption erlauben.

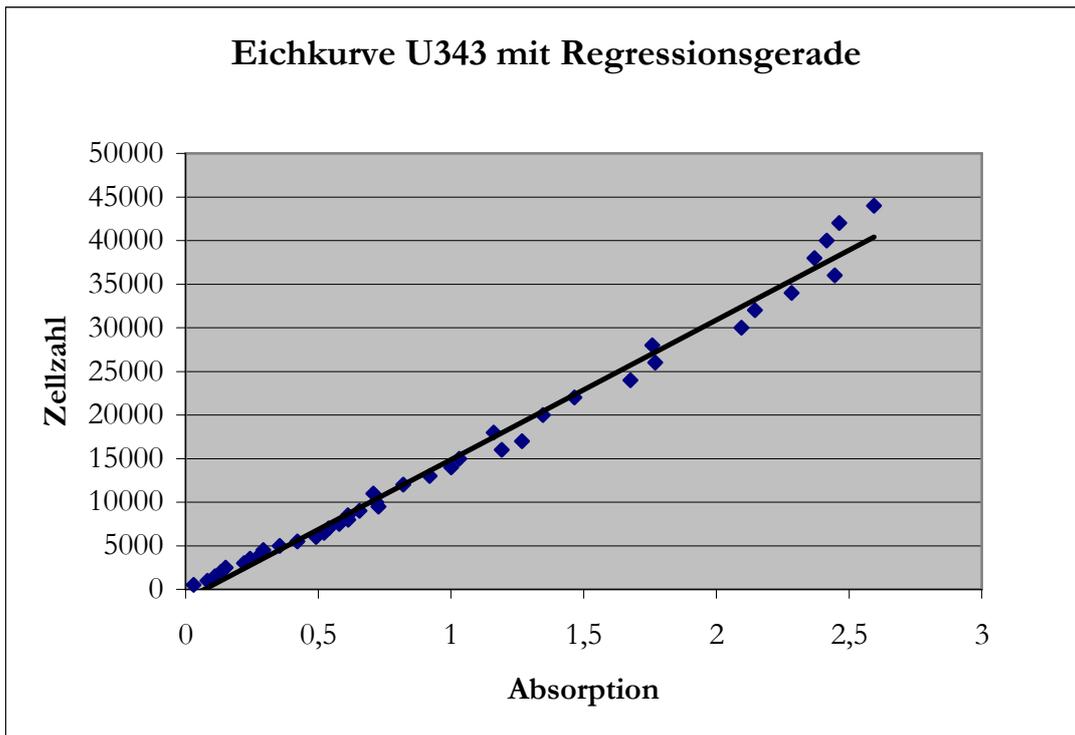
In Abbildung 6 und 7 sind die Eichkurven mit der jeweiligen Regressionsgerade dargestellt.



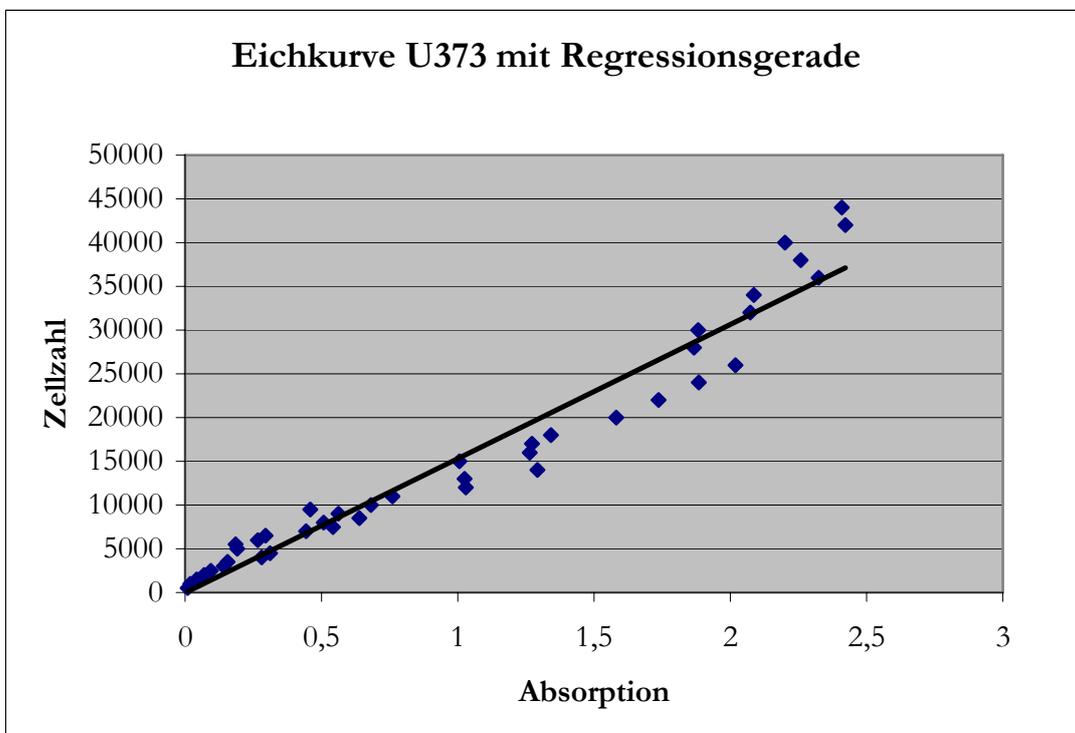
**Abbildung 4:** Eichkurve der Gliomzelllinie U343, gemessen 90 min nach der Inkubation mit WST-1



**Abbildung 5:** Eichkurve der Gliomzelllinie U373, gemessen 60 min nach Inkubation mit WST-1



**Abbildung 6:** Eichkurve der Zelllinie U343 mit Regressionsgerade



**Abbildung 7:** Eichkurve der Zelllinie U373 mit Regressionsgerade

#### 4.1.2. Hyperfraktionierte Bestrahlung reduziert das Wachstum der Gliomzelllinien U343 und U373

In dem ersten Versuchsansatz wurde die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Zellproliferation und das Zellüberleben der Gliomzelllinien U343 und U373 untersucht. Es wurden von beiden Zelllinien 2500 Zellen pro Versuch ausgesät und über 4 Tage hyperfraktioniert mit den Einzeldosen 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy bestrahlt. Die Zellzahl wurde 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden nach der letzten Bestrahlung mittels WST-Assay ermittelt. Die unbestrahlte Kontrollgruppe wurde in dem gleichen Zeitansatz behandelt.

In den Abbildungen 8 und 9 sind die Wachstumskurven der Zelllinien über den Zeitraum der Bestrahlung und 96 Stunden nach Bestrahlung dargestellt. Zum Vergleich wird in jedem Diagramm zusätzlich eine unbestrahlte Kontrollgruppe dargestellt. Da während der Bestrahlung keine Zellzahlmessungen erfolgten, wird diese Zeit durch eine unterbrochene Linie angedeutet. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Zeitpunkte der Messung nach Bestrahlung. Als Fehlerindikator wurde der Standardfehler jedes Mittelwertes in die Kurve eingetragen.

Bei der Gliomzelllinie U343 zeigen die bestrahlten Zellen, unabhängig von der Einzeldosis, bereits 24 Stunden nach der letzten Bestrahlung eine Reduktion des Zellwachstums gegenüber der Kontrollgruppe. Die Messung ergibt zu diesem Zeitpunkt für die Kontrolle 14507 (+/- 634) Zellen. Ausgehend von den ausgesäten 2500 Zellen entspricht das einem Zuwachs um den Faktor 5,8. Zwischen den Einzelbestrahlungsdosen bestehen 24 Stunden nach der letzten Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede. Die Zellzahl liegt bei allen drei Bestrahlungsgruppen etwa bei 10500 (8x 0,5 Gy: 10931 +/- 19; 8x 1 Gy: 10595 +/- 307; 8x 1,5 Gy: 10451 +/- 281), das entspricht einem Zellzuwachs um den Faktor 4,2. Die Wachstumsrate der bestrahlten Zellen liegt damit um den Faktor 1,38 unter dem Kontrollniveau.

Bereits 48 Stunden nach der letzten Bestrahlung zeigen sich bei der Zelllinie U343 Unterschiede zwischen den einzelnen Strahlendosen bezüglich des Zellwachstums, die nach 72 Stunden prägnanter werden. Bezogen auf die Kontrolle (22829 +/- 96) liegt die Wachstumsrate der Bestrahlungsgruppe mit der Einzeldosis von 0,5 Gy (14737 +/- 944) um den Faktor 1,55 niedriger. Die Zellzahl der höher bestrahlten Zellpopulationen liegt zirka bei 13500 Zellen (8x 1 Gy: 13125 +/- 375; 8x 1,5 Gy: 13931 +/- 683). Der Zellzuwachs ist damit um den Faktor 1,69 niedriger als das Kontrollniveau.

Nach 72 Stunden sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Dosen pro Fraktion am deutlichsten. Bezogen auf die Kontrolle (36530 +/- 2374) ist die Wachstumsrate der

Bestrahlungsgruppe mit 0,5 Gy pro Fraktion (21291 +/- 645) um den Faktor 1,72 niedriger, bei der Einzeldosis von 1 Gy (17156 +/- 515) um 2,1 niedriger und bei der Dosis von 1,5 Gy pro Fraktion (16392 +/- 361) um 2,23 niedriger.

Bei der letzten Messung nach 96 Stunden erreicht die Kontrollgruppe 43110 (+/-1121) Zellen und die Bestrahlungsgruppe mit der Einzeldosis von 0,5 Gy 23687 (+/- 224) Zellen. Somit liegt die Proliferationsrate bei 0,5 Gy etwa um den Faktor 1,82 unter dem Niveau der Kontrolle. Bei den Einzeldosen von 1 Gy und 1,5 Gy ergeben sich nach 96 Stunden ungefähr 16000 Zellen (8x 1 Gy: 16279 +/-555; 8x 1,5 Gy: 16071 +/- 970). Das Zellwachstum liegt bei diesen Bestrahlungsgruppen damit um den Faktor 2,7 unter dem Kontrollniveau.

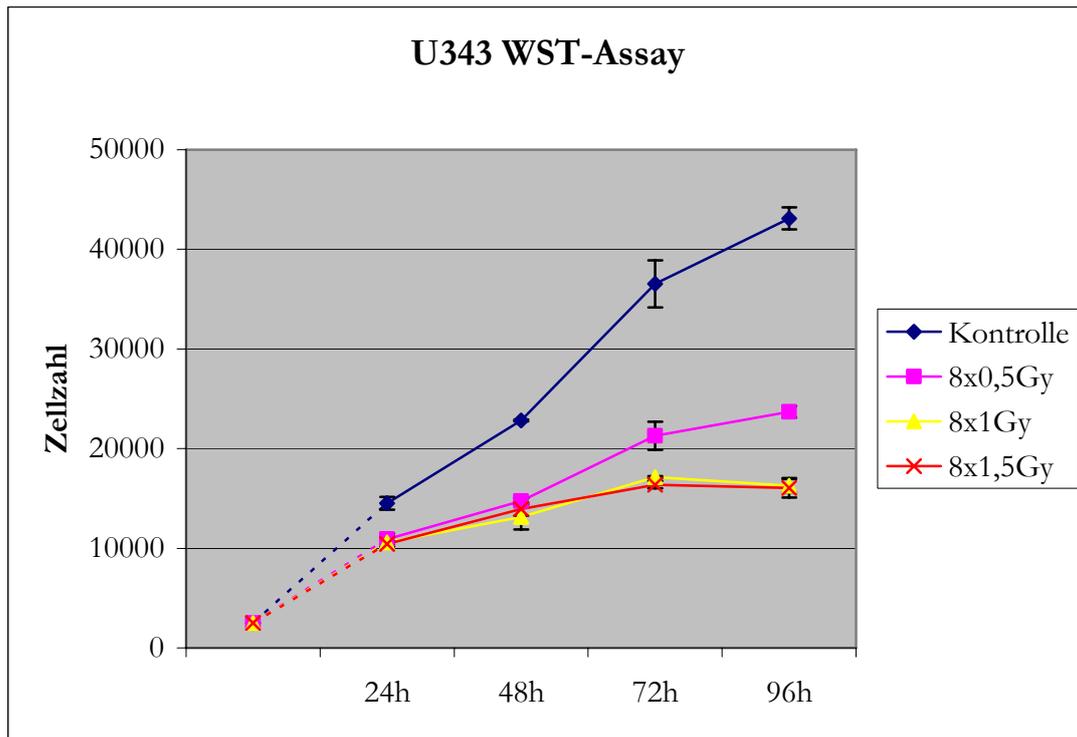
Bei der menschlichen Gliomzelllinie U373 ergibt sich 24 Stunden nach der letzten Bestrahlung ein ähnliches Bild wie bei der Zelllinie U343. Auch hier zeigen die bestrahlten Zellen, unabhängig von der Einzeldosis pro Fraktion, zu diesem frühen Zeitpunkt eine Reduktion der Zellproliferation gegenüber der Kontrolle. Die Kontrollgruppe erreicht 24 Stunden nach Bestrahlung eine Zellzahl von 15759 (+/- 943). Ausgehend von 2500 Zellen entspricht das einem Zuwachs um den Faktor 6,3. Zwischen den Einzelbestrahlungsdosen bestehen zu diesem Messzeitpunkt keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des Zellwachstums. Die Zellzahl liegt bei allen drei Gruppen etwa bei 13000 (8x 0,5 Gy: 12670 +/- 707; 8x 1 Gy: 13902 +/- 410; 8x 1,5 Gy: 12721 +/- 883), das bedeutet eine Zunahme der Zellzahl um den Faktor 5,2. Die Proliferationsrate der bestrahlten Zellen liegt damit um den Faktor 1,21 unter dem Kontrollniveau.

Bei den Messungen nach 48 und 72 Stunden zeigen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Strahlendosen, die nach 96 Stunden am deutlichsten sind. Auch bei der Zelllinie U373 hat die Einzeldosis von 0,5 Gy pro Fraktion einen geringeren proliferationshemmenden Effekt als die Dosen 1 Gy und 1,5 Gy. Im Gegensatz zu der Zelllinie U343 zeigt sich bei der U373 durch Dosissteigerung von 1 Gy auf 1,5 Gy eine weitere Reduktion der Zellzahl, die sich allerdings erst 96 Stunden nach Bestrahlung manifestiert.

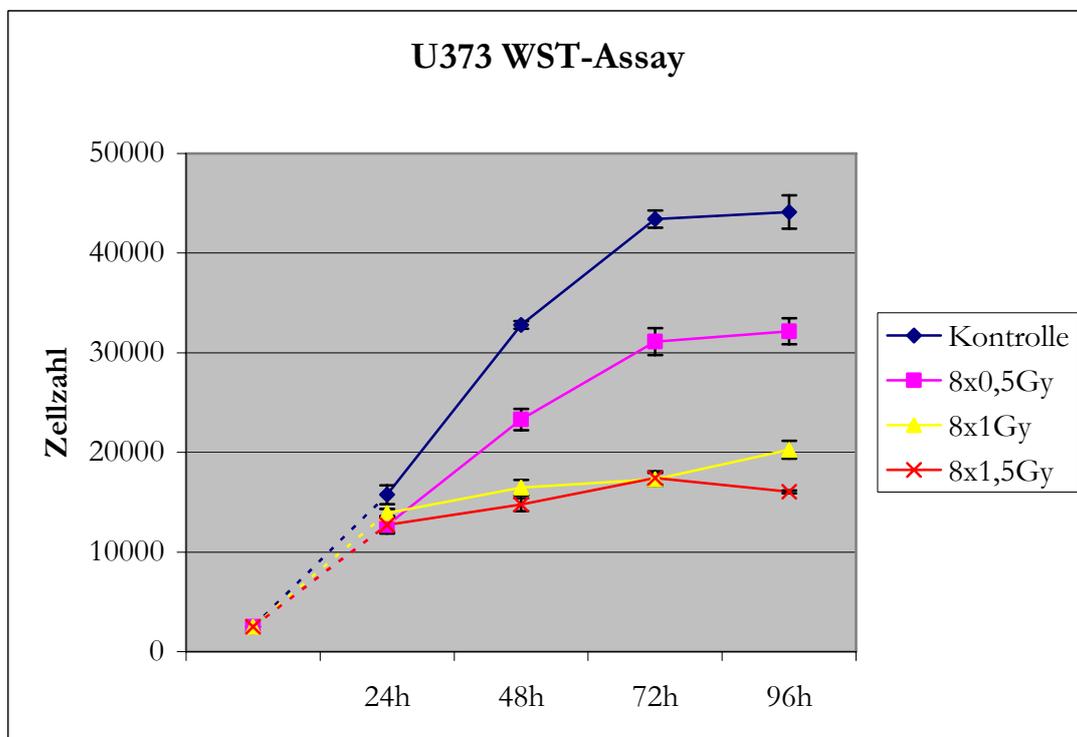
Bei der letzten Messung nach 96 Stunden erreicht die Kontrollgruppe 44122 (+/- 1684) Zellen und die Zellpopulation mit der Dosis von 0,5 Gy pro Fraktion 32158 (+/- 1306) Zellen. Damit liegt die Proliferationsrate der mit 0,5 Gy bestrahlten Zellen um den Faktor 1,37 unter dem Kontrollniveau. Bei den Zellen, die mit 1 Gy pro Fraktion bestrahlt wurden, ergibt die Messung nach 96 Stunden eine Zellzahl von 20255 (+/- 893). Damit liegt die Wachstumsrate um den Faktor 2,18 unter dem Kontrollniveau. Die mit der Einzeldosis von 1,5 Gy bestrahlten Zellen erreichen nach 96 Stunden

eine Zellzahl von 16040 (+/- 137). Das entspricht einer Proliferationsrate, die um den Faktor 2,75 unter dem Niveau der Kontrollgruppe liegt.

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen die Empfindlichkeit der menschlichen Gliomzelllinien U343 und U373 auf hyperfraktionierte Bestrahlung. Beide Zelllinien reagieren auf den Bestrahlungsreiz mit einer reduzierten Proliferation. Bei der Zelllinie U373 korreliert die Stärke der Proliferationsreduktion mit der Höhe der Einzeldosis pro Fraktion. Bei der Dosis von 0,5 Gy wird die Wachstumsrate im Mittel um den Faktor 1,34 gesenkt, bei 1 Gy um 1,97 und bei 1,5 Gy um 2,17. Die Zelllinie U343 zeigt diese dosisabhängige Wachstumsreduktion nur zum Teil. Die Dosis von 1 Gy pro Fraktion hemmt das Zellwachstum zwar stärker als die Dosis von 0,5 Gy, aber eine Dosissteigerung auf 1,5 Gy hat keine weitere Proliferationshemmung zur Folge. Die Wachstumsrate ist bei der Dosis von 0,5 Gy im Mittel um den Faktor 1,62 niedriger, bei 1 Gy und auch bei 1,5 Gy um die Hälfte niedriger. Bei beiden Zelllinien erreicht die Wachstumshemmung durch ionisierende Strahlung nicht unmittelbar nach Bestrahlung sondern erst im Verlauf ihr Maximum.



**Abbildung 8:** Darstellung des Zellwachstums von hyperfraktioniert bestrahlten Zellpopulationen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe; die Zeitangaben beziehen sich auf die Messzeitpunkte nach der letzten Bestrahlung



**Abbildung 9:** Darstellung des Zellwachstums von hyperfraktioniert bestrahlten Zellpopulationen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe; die Zeitangaben beziehen sich auf die Messzeitpunkte nach der letzten Bestrahlung

#### 4.1.3. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ hemmt das Zellwachstum der Gliomzelllinien U343 und U373 abhängig von der Zelllinie unterschiedlich effektiv

In diesem Versuchsansatz wurde die Wirkung der Testsubstanz ZD1839 „Iressa®“ auf das Zellwachstum der menschlichen Gliomzelllinien U343 und U373 untersucht. Es wurden für beide Zelllinien 2500 Zellen pro Versuch ausgesät und über 4 Tage mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  inkubiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden nach Beendigung der Inkubation mit „Iressa®“ mittels WST-Assay. Mit der unbehandelten Kontrollgruppe wurde in dem gleichen Zeitfenster verfahren.

In den Abbildungen 10 und 11 sind die Wachstumsverläufe der Zelllinien U343 und U373 während und 96 Stunden nach der Inkubation mit „Iressa®“ dargestellt. In den beiden Abbildungen wird jeweils eine unbehandelte Kontrollgruppe zum Vergleich dargestellt. Da für den Zeitraum der Inkubation kein WST-Assay zur Zellzahlbestimmung durchgeführt wurde, wird diese Zeitspanne durch die unterbrochene Linie angedeutet. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Messzeitpunkte nach der Inkubation. Als Fehlerindikator wurden die Standardfehler in die Kurve eingetragen.

Bei der Gliomzelllinie U343 zeigt die mit „Iressa®“ behandelte Zellpopulation bereits 24 Stunden nach Inkubationsende eine Reduktion des Zellwachstums gegenüber der Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe erreicht nach 24 Stunden eine Zellzahl von 14507 (+/- 634), die behandelte Gruppe 11097 (+/- 304) Zellen. Damit liegt die Proliferationsrate der behandelten Zellen etwa um den Faktor 1,31 unter dem Kontrollniveau. Ausgehend von den ausgesäten 2500 Zellen wächst die Kontrolle um den Faktor 5,8, die behandelte Versuchsgruppe um 4,44.

Bei der letzten Messung nach 96 Stunden ermittelt sich für die Kontrollgruppe eine Zellzahl von 43110 (+/- 1121) und für die mit „Iressa®“ behandelte Gruppe eine Zellzahl von 32451 (+/- 630). Damit liegt die Wachstumsrate der behandelten Zellen um den Faktor 1,33 unter dem Kontrollniveau. Der proliferationshemmende Effekt von „Iressa®“ bleibt über den Messzeitraum nach Inkubationsende relativ konstant.

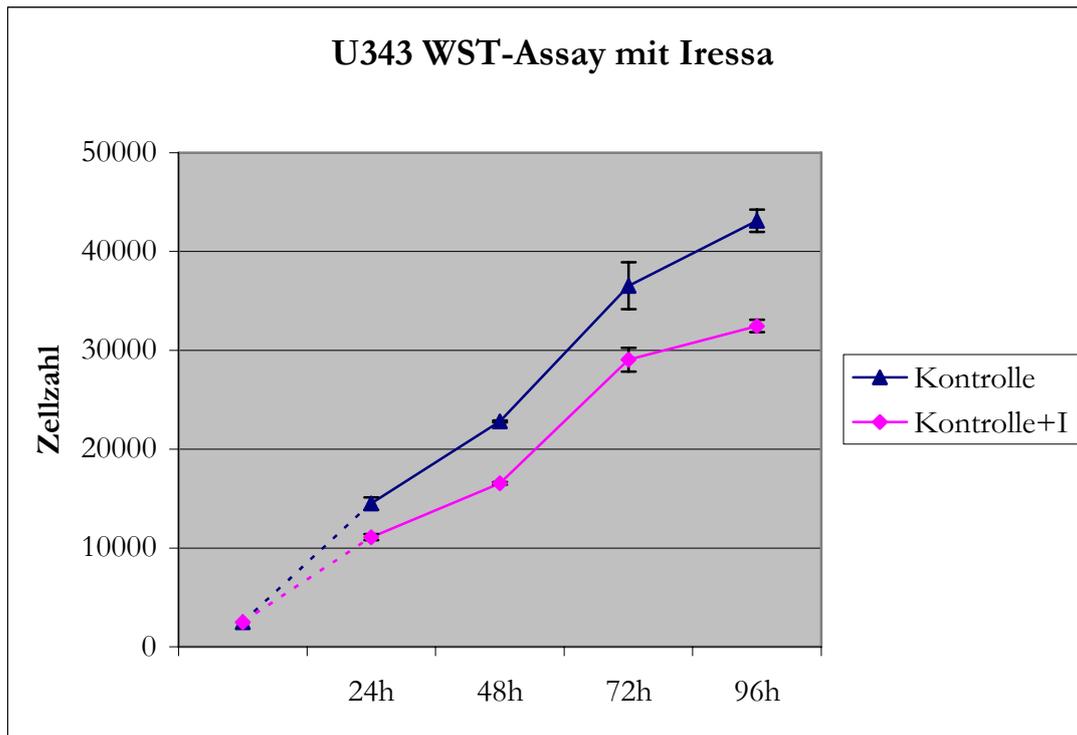
Bei der Zelllinie U373 zeigt die erste Messung nach 24 Stunden, wie bei der Zelllinie U343, eine Reduktion des Zellwachstums bei der behandelten Zellpopulation gegenüber der Kontrolle. Die Messung ergibt nach 24 Stunden für die Kontrolle 15759 (+/- 943) Zellen und für die mit „Iressa®“ behandelte Population 12347 (+/- 227) Zellen. Die Wachstumsrate der behandelten Zellen liegt damit um den Faktor 1,28 unter dem Kontrollniveau. Ausgehend von den ausgesäten

2500 Zellen entspricht das bei der Kontrolle einem Zuwachs um den Faktor 6,3 und bei den behandelten Zellen um 4,94.

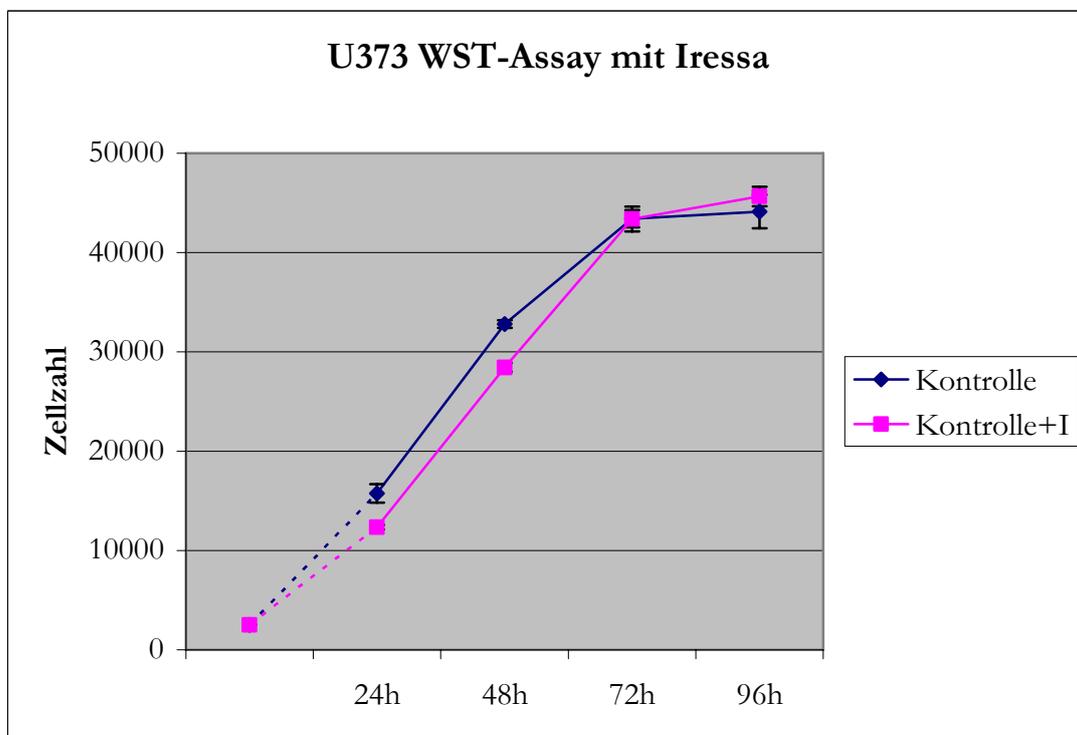
Bei der Zellzahlmessung nach 48 Stunden ist der proliferationshemmende Effekt von „Iressa®“ auf die Zellen noch zu erkennen, in der nächsten Messung nach 72 Stunden ist allerdings kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Kontrolle und der behandelten Gruppe vorhanden. Die Kontrolle erreicht nach 72 Stunden 43411 (+/- 859) Zellen und die behandelte Population 43373 (+/- 1246) Zellen.

Die letzte Bestimmung der Zellzahl 96 Stunden nach Inkubationsende ergibt sogar für die behandelte Gruppe höhere Zellzahlen als für die Kontrolle. Die Kontrolle erreicht 44122 (+/- 1684) Zellen, die behandelte Versuchsgruppe 45562 (+/- 977) Zellen. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant, da sich die Standardfehler der jeweiligen Messwerte überschneiden.

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen die unterschiedliche Effektivität des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 „Iressa®“ auf die Hemmung des Zellwachstums der menschlichen Gliomzelllinien U343 und U373. Bei der Zelllinie U343 zeigt „Iressa®“ über den gesamten Messzeitraum eine relativ konstante Reduktion der Zellproliferation, die auch über die letzte Messung nach 96 Stunden anzuhalten scheint. Die Proliferationsrate liegt hier im Mittel um den Faktor 1,32 unter dem Niveau der Kontrolle. Bei der insgesamt schneller wachsenden Zelllinie U373 wirkt „Iressa®“ weniger effektiv. Zu den ersten beiden Messzeitpunkten ist die Wachstumsrate im Schnitt um den Faktor 1,22 niedriger. Ab der Messung der Zellzahl 72 Stunden nach Inkubation ist kein Unterschied mehr zwischen der Kontrolle und der behandelten Zellpopulation zu erkennen.



**Abbildung 10:** Darstellung des Zellwachstums einer mit  $1 \mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Zellpopulation gegenüber einer Kontrollgruppe; die Zeitangaben beziehen sich auf die Messzeitpunkte nach der Inkubation mit „Iressa®“



**Abbildung 11:** Darstellung des Zellwachstums einer mit  $1 \mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Zellpopulation gegenüber einer Kontrollgruppe; die Zeitangaben beziehen sich auf die Messzeitpunkte nach der Inkubation mit „Iressa®“

#### 4.1.4. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verstärkt die Wirkung ionisierender Strahlung abhängig von der Bestrahlungsdosis und der Zelllinie

In den beiden vorangehenden Versuchen wurde die Strahlensensibilität der verwendeten Zelllinien U343 und U373 demonstriert und die Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 „Iressa®“ auf die Zellproliferation der Gliome *in vitro* aufgezeigt. In diesem Versuchsansatz wurde die Blockade der EGF-Rezeptoren durch „Iressa®“ kombiniert mit hyperfraktionierter Bestrahlung untersucht. Die Zelllinien wurden also simultan mit „Iressa®“ inkubiert und bestrahlt. Es wurden wiederum 2500 Zellen pro Versuch ausgesät und über 4 Tage mit den Einzeldosen 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt. Vor jeder morgendlichen Bestrahlung wurde den Zellen „Iressa®“ in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  zugesetzt und 24 Stunden belassen. Nach der letzten Bestrahlung wurde „Iressa®“ entfernt. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden nach Bestrahlung mittels WST-Assay. Mit den unbestrahlten Kontrollen, jeweils mit und ohne Zugabe von „Iressa®“, wurde in dem gleichen Zeitfenster verfahren.

In den Abbildungen 12 bis 17 sind die Wachstumskurven der beiden Zelllinien unter der simultanen Behandlung mit ionisierender Strahlung und EGFR-Blockade durch ZD1839 „Iressa®“ dargestellt. Die Diagramme sind nach den Zelllinien und den drei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen aufgeteilt. In jeder Abbildung sind neben der kombiniert behandelten Zellpopulation die unbehandelte Kontrollgruppe, eine nur mit „Iressa®“ inkubierte Kontrolle und eine ohne „Iressa®“ bestrahlte Zellpopulation dargestellt. Da für den Zeitraum der Behandlung keine Zellzahlmessungen durchgeführt wurden, wird diese Zeitspanne durch die unterbrochene Linie angedeutet. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Zeitpunkte der Messung nach der letzten Bestrahlung. Als Fehlerindikator wurde der Standardfehler jedes Wertes in die Kurve eingetragen.

Bei der menschlichen Gliomzelllinie U343 zeigt die Zellpopulation, die sowohl mit der Einzeldosis von 0,5 Gy bestrahlt als auch mit „Iressa®“ behandelt wurde, bereits nach 24 Stunden eine Reduktion der Zellzahl gegenüber der Zellpopulation, die nur bestrahlt wurde. Die Versuchsgruppe mit der Kombinationsbehandlung erreicht nach 24 Stunden 8444 (+/- 532) Zellen, die mit der Strahlendosis von 0,5 Gy pro Fraktion 10931 (+/- 19) Zellen. Damit liegt die Proliferationsrate der kombiniert behandelten Gruppe um den Faktor 1,29 unter dem Niveau der nur bestrahlten Zellen. Auch nach 96 Stunden ist die Zellzahl der kombiniert behandelten Gruppe mit 20031 (+/-578) niedriger als die der bestrahlten Zellen mit 23687 (+/- 224). Hier wird die Proliferationsrate durch „Iressa®“ um den Faktor 1,18 reduziert. Für die Strahlendosis von 0,5 Gy pro Fraktion zeigt die Blockade der EGF-Rezeptoren durch ZD1839 „Iressa®“ einen zusätzlich hemmenden Effekt auf

das Zellwachstum. Die Verstärkung der Proliferationshemmung fällt allerdings schwächer aus als die Summation der zuvor beschriebenen Effekte von ionisierender Strahlung und „Iressa®“ vermuten ließ. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

Die Zelllinie U373 zeigt für die Einzeldosis von 0,5 Gy bei der Messung nach 24 Stunden auch eine Verstärkung der Wachstumshemmung durch „Iressa®“. Die Zellzahl der kombiniert behandelten Zellpopulation erreicht 10158 (+/- 365) Zellen und liegt damit um den Faktor 1,25 unter dem Niveau der mit 0,5 Gy bestrahlten Population, die 12670 (+/- 707) Zellen erreicht. Allerdings ist nach 96 Stunden dieser verstärkende Effekt nicht mehr vorhanden. Die kombiniert behandelte Zellgruppe weist sogar nach 96 Stunden mit 33500 (+/- 1378) Zellen eine höhere Zellzahl auf als die bestrahlte Gruppe mit 32158 (+/- 1306) Zellen. Dieser Unterschied ist nicht signifikant, da sich die Standardfehler der beiden Messwerte überschneiden. Bei der Zelllinie U373 erlangt man, für die Strahlendosis von 0,5 Gy pro Fraktion, durch Blockade der EGF-Rezeptoren mittels „Iressa®“ einen zusätzlichen Effekt auf die Proliferationshemmung, der allerdings nach 96 Stunden nicht mehr vorhanden ist. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 13 dargestellt.

Bei der Zelllinie U343 erreicht die Zellzahl nach 24 Stunden sowohl bei der kombiniert behandelten Zellpopulation als auch bei der nur mit 1 Gy bestrahlten Population etwa 10600 Zellen (8x 1 Gy: 10595 +/- 307; 8x 1 Gy +I: 10680 +/- 606). Bei der Messung nach 48 Stunden bricht die Zellzahl bei der Gruppe mit der Kombinationsbehandlung auf 9629 (+/- 1236) Zellen im Vergleich zu der Bestrahlungsgruppe mit 13125 (+/- 374) Zellen ein. Durch „Iressa®“ wird die Proliferationsrate damit zusätzlich um den Faktor 1,36 reduziert. Bereits nach 72 Stunden ist die Zellzahl der beiden Gruppen wieder auf dem gleichen Niveau von etwa 16950 Zellen (8x 1 Gy: 17149 +/- 515; 8x 1,5 Gy +I: 16743 +/- 87). Auch nach 96 Stunden liegt die Zellzahl von beiden Populationen auf dem gleichen Level von zirka 16000 Zellen (8x 1 Gy: 16279 +/- 555; 8x 1 Gy +I: 15708 +/- 679). Die Dosis von 1 Gy kombiniert mit Blockade der EGF-Rezeptoren zeigt bei der Zelllinie U343 nur nach 48 Stunden einen signifikanten Zusatzeffekt auf die Hemmung der Proliferation. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

Bei der Zelllinie U373 liegen die beiden Populationen nach 24 und 48 Stunden jeweils auf dem gleichen Niveau. Erst nach 72 Stunden kann man für die kombiniert behandelte Zellpopulation einen geringen additiven Effekt auf die Hemmung des Zellwachstums beobachten. Die Zellzahl dieser Versuchsgruppe erreicht 15718 (+/- 171) Zellen, die Zellzahl der bestrahlten Population 17294 (+/- 646) Zellen. Die Wachstumsrate wird durch „Iressa®“ damit um den Faktor 1,1 gesenkt. Allerdings ist dieser Effekt nach 96 Stunden nicht mehr vorhanden, die kombiniert bestrahlte Zellpopulation weist sogar nach 96 Stunden mit 22654 (+/- 660) Zellen eine höhere

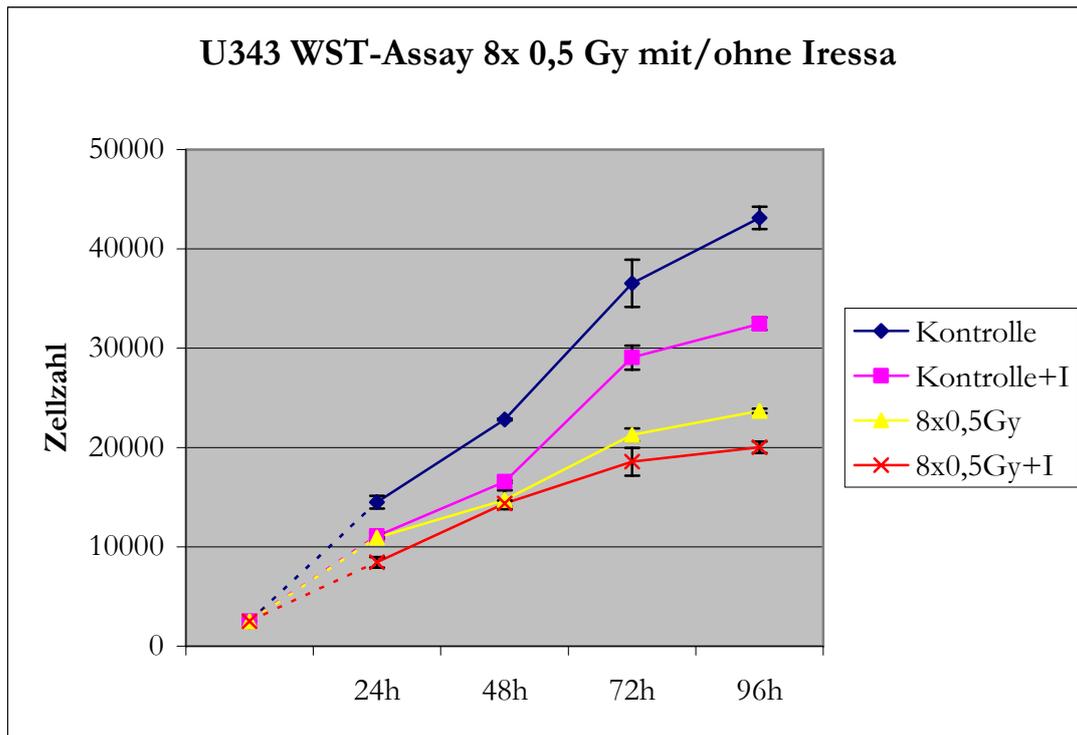
Zellzahl auf als die bestrahlte Gruppe mit 20255 (+/- 893) Zellen. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse dargestellt.

Bei der Zelllinie U343 zeigt die Zellpopulation, die sowohl mit der Einzeldosis von 1,5 Gy bestrahlt und mit „Iressa®“ behandelt wurde, nach 24 Stunden eine geringe Reduktion des Zellwachstums gegenüber der Population, die nur bestrahlt wurde. Bei der kombiniert behandelten Versuchsgruppe erreicht die Zellzahl nach 24 Stunden 9463 (+/- 195), bei der bestrahlten Gruppe 10451 (+/- 281) Zellen. Durch „Iressa®“ wird die Wachstumsrate damit zusätzlich um den Faktor 1,1 gesenkt. Nach 48 Stunden liegen beide Versuchsgruppen auf dem gleichen Niveau von etwa 14000 Zellen (8x 1,5 Gy: 13931 +/- 683; 8x 1,5 Gy +I: 14059 +/- 695). Bei der Messung nach 72 Stunden weist die kombiniert behandelte Zellpopulation wieder eine Reduzierung der Zellzahl gegenüber der bestrahlten Population auf. Die Versuchsgruppe mit der Kombinationsbehandlung erreicht nach 72 Stunden 14342 (+/- 408) Zellen, die Bestrahlungsgruppe 16391 (+/- 360) Zellen. Damit reduziert „Iressa®“ das Zellwachstum zusätzlich um den Faktor 1,14. Bei der letzten Messung nach 96 Stunden liegen die beiden Versuchsgruppen wieder auf dem gleichen Niveau von zirka 16000 Zellen (8x 1,5 Gy: 16071 +/- 970; 8x 1,5 Gy +I: 15906 +/- 1122). Bei der Zelllinie U343 zeigt die Blockade der EGF-Rezeptoren durch ZD1839 „Iressa®“ in vitro, für die Strahlendosis von 1,5 Gy, einen geringen additiven Effekt auf die Hemmung des Zellwachstums. Dieser geringe Effekt manifestiert sich signifikant nur zu zwei Messzeitpunkten. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

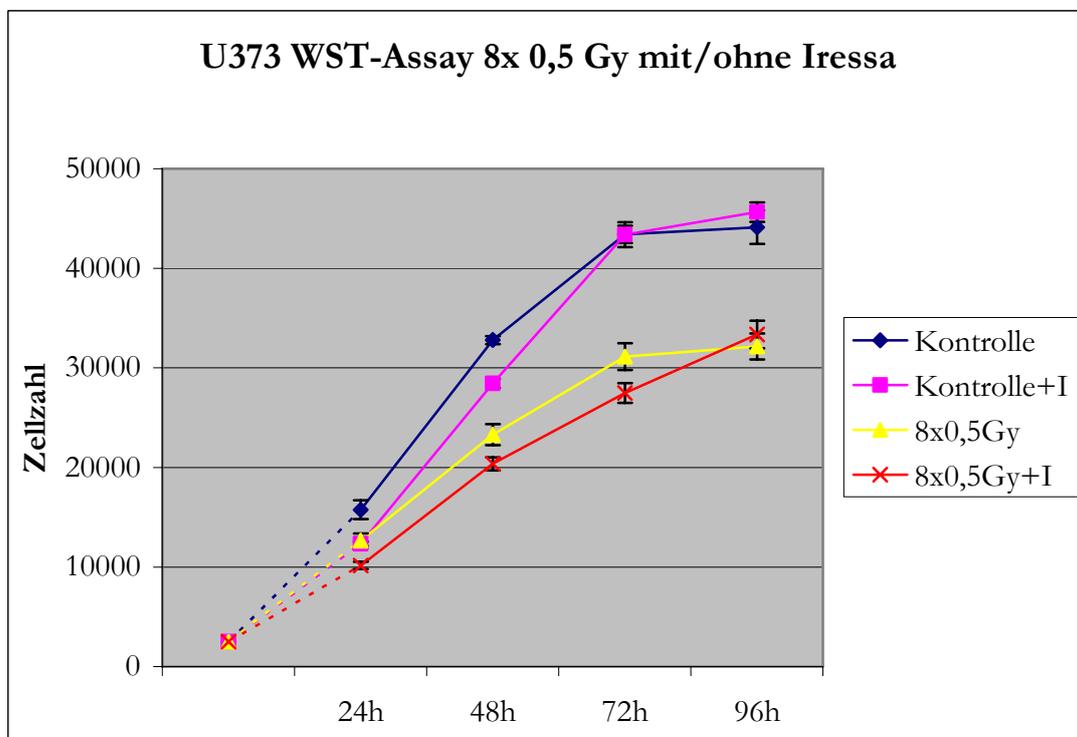
Die Zelllinie U373 zeigt für die Einzeldosis von 1,5 Gy pro Fraktion nach 24 Stunden eine Reduktion der Zellproliferation durch „Iressa®“. Die Zellzahl der kombiniert behandelten Versuchsgruppe erreicht nach 24 Stunden 10322 (+/-285) Zellen und liegt damit um den Faktor 1,23 unter dem Niveau der Bestrahlungsgruppe, die 12721 Zellen (+/- 883) erreicht. Nach 48 Stunden zeigt „Iressa®“ eine Reduktion der Zellproliferation um den Faktor 1,28. Bei der Messung nach 72 Stunden wird der zusätzliche Effekt geringer und nach 96 Stunden ist keine Wirkung durch „Iressa®“ mehr nachweisbar. Die Zellzahlen der Versuchsgruppen liegen beide auf einem Niveau von 16000 Zellen (8x 1,5 Gy: 16040 +/- 137; 8x 1,5 Gy +I: 16000 +/- 434). Bei der Zelllinie U373 erlangt man, für die Strahlendosis von 1,5 Gy, durch Blockade der EGF-Rezeptoren mittels ZD 1839 „Iressa®“ einen zusätzlichen Effekt auf die Hemmung der Proliferation, der allerdings nach 96 Stunden nicht mehr vorhanden ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

Insgesamt reagieren die Zelllinien U343 und U373 auf die Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“, die simultan zu hyperfraktionierter Bestrahlung erfolgte, mit einer Reduktion der Zellproliferation gegenüber der Versuchsgruppe, die nur bestrahlt wurde.

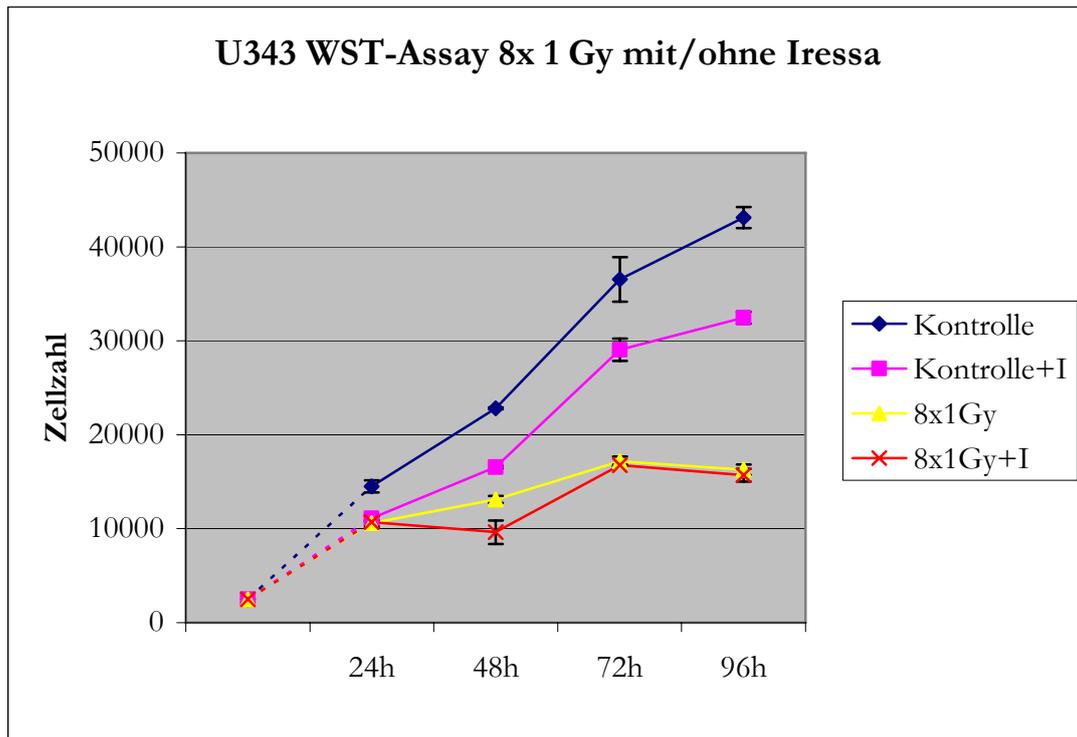
Allerdings hängt das Ausmaß dieser zusätzlichen Reduktion von der Bestrahlungsdosis pro Fraktion und der Zelllinie ab. Für die Bestrahlungsdosis von 0,5 Gy zeigen beide Gliomzelllinien eine deutlich wachstumshemmende Wirkung von „Iressa®“. Bei der Dosis von 1 Gy pro Fraktion zeigt sich die verstärkte Wachstumshemmung bei beiden Zelllinien schwächer und nur noch zu einem Messzeitpunkt signifikant. Die Zelllinie U343 zeigt für die Bestrahlungsdosis von 1,5 Gy ebenfalls nur noch eine geringe additive Wirkung von „Iressa®“. Dagegen wirkt sich die Blockade der EGF-Rezeptoren, zusätzlich zu 1,5 Gy, bei der Zelllinie U373 deutlich auf die Reduktion des Zellwachstums aus.



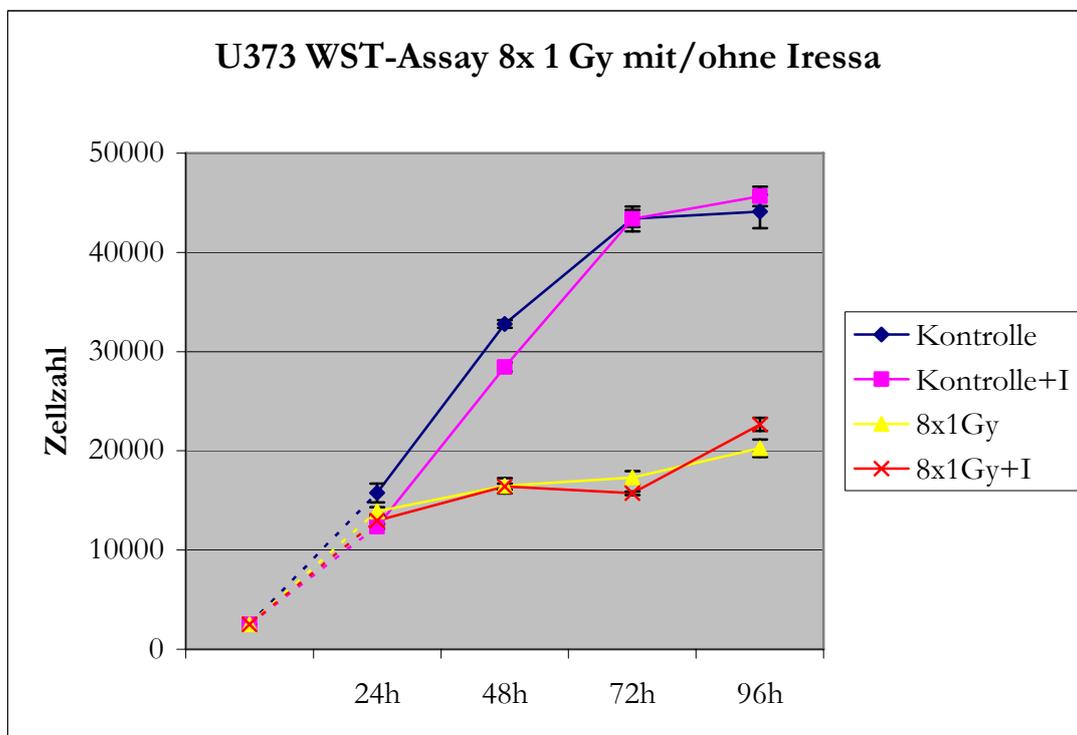
**Abbildung 12:** Darstellung des Zellwachstums einer Zellpopulation, die mit 0,5 Gy bestrahlt und mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelt wurde, im Vergleich zu einer nur mit 0,5 Gy bestrahlten Zellpopulation, einer unbehandelten Kontrolle und einer mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Kontrolle



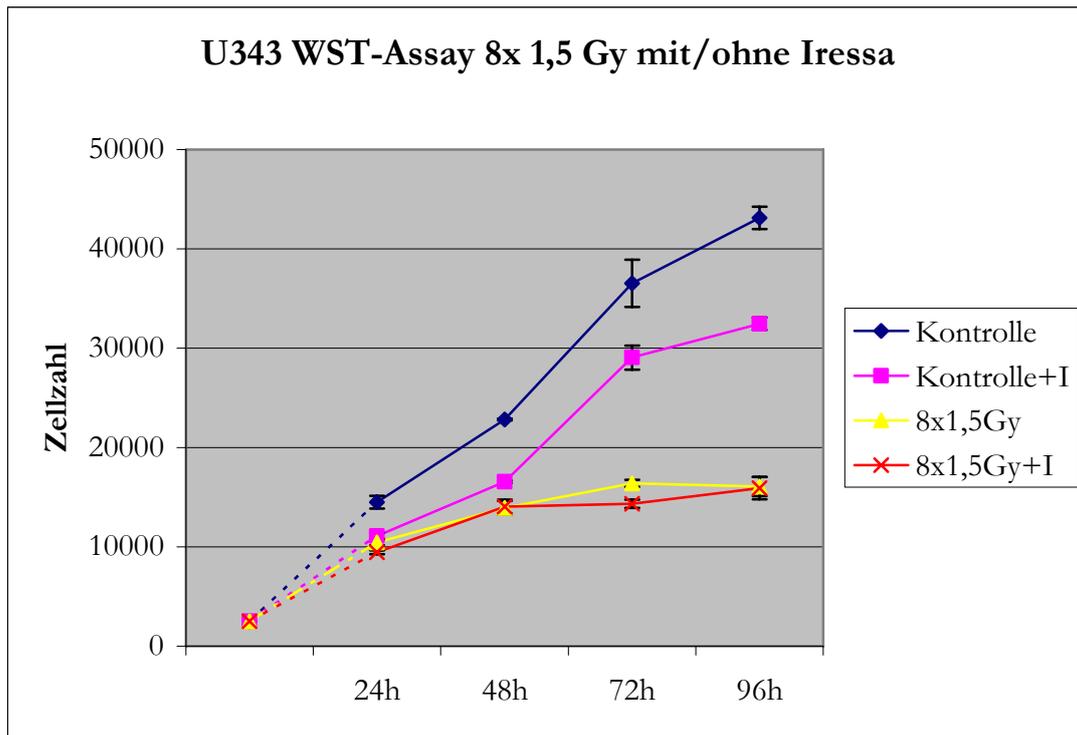
**Abbildung 13:** Darstellung des Zellwachstums einer Zellpopulation, die mit 0,5 Gy bestrahlt und mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelt wurde, im Vergleich zu einer nur mit 0,5 Gy bestrahlten Zellpopulation, einer unbehandelten Kontrolle und einer mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Kontrolle



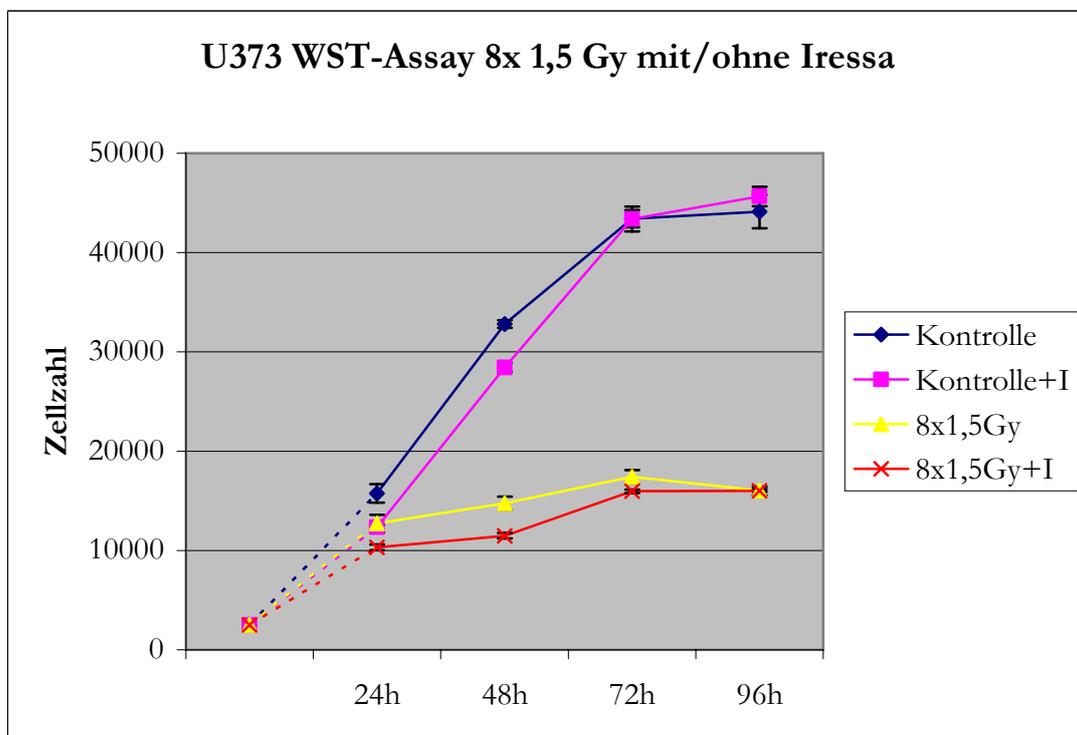
**Abbildung 14:** Darstellung des Zellwachstums einer Zellpopulation, die mit 1 Gy bestrahlt und mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelt wurde, im Vergleich zu einer nur mit 1 Gy bestrahlten Zellpopulation, einer unbehandelten Kontrolle und einer mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Kontrolle



**Abbildung 15:** Darstellung des Zellwachstums einer Zellpopulation, die mit 1 Gy bestrahlt und mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelt wurde, im Vergleich zu einer nur mit 1 Gy bestrahlten Zellpopulation, einer unbehandelten Kontrolle und einer mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Kontrolle



**Abbildung 16:** Darstellung des Zellwachstums einer Zellpopulation, die mit 1,5 Gy bestrahlt und mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelt wurde, im Vergleich zu einer nur mit 1,5 Gy bestrahlten Zellpopulation, einer unbehandelten Kontrolle und einer mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Kontrolle



**Abbildung 17:** Darstellung des Zellwachstums einer Zellpopulation, die mit 1,5 Gy bestrahlt und mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelt wurde, im Vergleich zu einer nur mit 1,5 Gy bestrahlten Zellpopulation, einer unbehandelten Kontrolle und einer mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Kontrolle

## 4.2. Real-Time RT-PCR

Anhand dieser Methode wurde die Expression des EGF-Rezeptors der Gliomzelllinien U343 und U373 unter ionisierender Bestrahlung und Blockade des Rezeptors durch „Iressa®“ auf mRNA-Ebene näher betrachtet.

In dem ersten Versuchsansatz wurde der Einfluss von hyperfraktionierter Bestrahlung auf die mRNA-Expression des EGF-Rezeptors untersucht.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde untersucht, inwieweit der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“, alleine und in Kombination mit hyperfraktionierter Radiatio, die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene beeinflusst.

In beiden Versuchsansätzen wurden die Zelllinien über 4 Tage mit den Einzeldosen 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt. Die Expression wurde 1 Stunde, 3 Stunden und 4 Stunden nach der letzten Bestrahlung mittels RT-PCR ermittelt. Die Quantifizierung der EGFR-Expression erfolgte dabei relativ zu dem „house-keeping-gene“ PBGD.

### 4.2.1. Eichkurven

In mehreren Vorversuchen wurde bei beiden Zelllinien die Effizienz der RT-PCR für die Amplifizierung der cDNA von EGFR und PBGD ermittelt. Die Effizienz der Reaktion errechnet sich aus der folgenden Formel:

$$E=10^{-1/\text{Steigung der Eichkurve}}$$

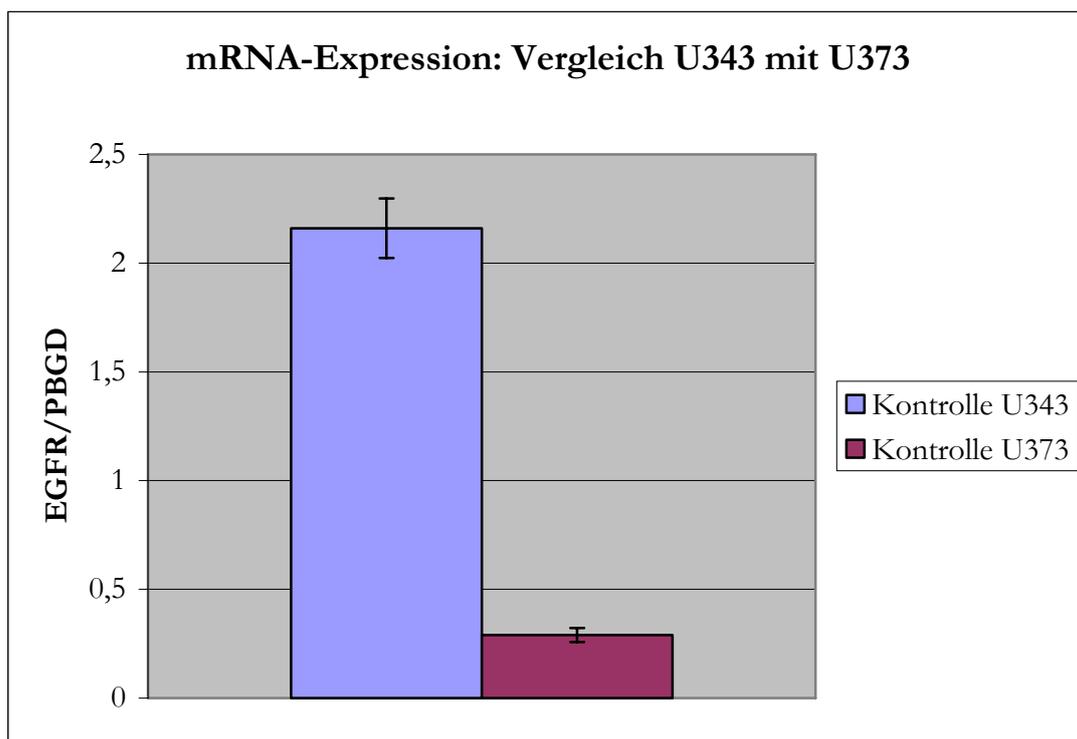
Da sich die Effizienzen der RT-PCR für EGFR und PBGD um mehr als 0,05 unterscheiden, wurde für jedes Produkt eine eigene Eichkurve erstellt ( $E_{(\text{EGFR})} = 1,779$ ;  $E_{(\text{PBGD})} = 1,928$ ).

Für das Erstellen einer Eichkurve wurden bekannte mRNA-Konzentrationen in einer Verdünnungsreihe (100 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,1 ng) mittels RT-PCR amplifiziert und gemessen. Diese Eichkurven wurden in jedem PCR-Lauf als Berechnungsgrundlage herangezogen.

#### 4.2.2. Die Gliomzelllinien U343 und U373 exprimieren den EGF-Rezeptor auf mRNA-Ebene unterschiedlich stark

In Abbildung 18 wird die relative EGFR-Expression der Zelllinie U343 gegenüber der relativen EGFR-Expression der Zelllinie U373 dargestellt. Als Fehlerindikator wurde der Standardfehler der Mittelwerte in das Diagramm eingetragen.

Die Kontrollgruppe der Gliomzelllinie U343 exprimiert deutlich mehr mRNA für den EGF-Rezeptor im Vergleich zu der Zelllinie U373. Das Niveau der relativen EGFR-Expression auf mRNA-Ebene liegt bei der Zelllinie U343 bei einem Wert von 2,16 (+/- 0,14), bei der Zelllinie U373 auf dem Niveau von 0,29 (+/- 0,03). Die Zelllinie U343 zeigt damit die 7,4-fache Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene.



**Abbildung 18:** Vergleich der relativen EGFR-Expression der Zelllinien U343 und U373

### 4.2.3. Hyperfraktionierte Bestrahlung beeinflusst die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene

In diesem Versuchsansatz wurde die Wirkung von hyperfraktionierter Radiatio auf die mRNA-Expression des membranständigen EGF-Rezeptors untersucht.

Es wurden von den verwendeten Zelllinien  $1 \times 10^6$  Zellen pro Versuch ausgesät und über 4 Tage hyperfraktioniert mit den jeweiligen Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy bestrahlt. Um Änderungen in der Expression auf mRNA-Ebene zu erfassen, wurde 1 Stunde, 3 Stunden und 4 Stunden nach der letzten Bestrahlung mRNA aus den Zellen isoliert. Anschließend wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels PCR die entsprechende cDNA für EGFR und PBGD amplifiziert und gemessen. Mit der unbehandelten Kontrollgruppe wurde in dem gleichen Zeitfenster verfahren.

In den Abbildungen 19 bis 24 sind die relativen EGFR-Expressionen als Quotient EGFR/PBGD für beide Zelllinien und jede Bestrahlungsdosis dargestellt. In jedem Diagramm wird den bestrahlten Zellen die Kontrollgruppe zum Vergleich gegenübergestellt. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler jedes Wertes im Diagramm eingetragen. Weiterhin ist zu beachten, dass für die Diagramme der beiden Zelllinien, aufgrund der verschiedenen Werte, unterschiedliche Maßstäbe für die Ordinate gewählt wurden.

Bei der Gliomzelllinie U343 bewirkt die Einzeldosis von 0,5 Gy pro Fraktion einen Anstieg der EGFR-Expression nach 1 Stunde gegenüber der Kontrolle. Der Quotient EGFR/PBGD liegt nach 1 Stunde bei einem Wert von 3,3 (+/- 0,21), der Quotient der Kontrolle liegt bei 2,16 (+/- 0,14). Nach 3 und 4 Stunden fällt die mRNA-Expression für EGFR wieder auf das Kontrollniveau ab (3 Stunden: 2,53 +/- 0,18; 4 Stunden: 2,51 +/- 0,68). In Abbildung 19 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die Zelllinie U373 reagiert auf die Einzeldosis von 0,5 Gy pro Fraktion mit einer verringerten EGFR-Expression. Ausgehend von dem Niveau der Kontrolle (Kontrolle: 0,29 +/- 0,03), sinkt der Quotient EGFR/PBGD nach 1 Stunde leicht auf einen Wert von 0,22 (+/- 0,06). Auch nach 3 Stunden bleibt der Quotient auf dem niedrigen Level (3 Stunden: 0,2 +/- 0,08) und nähert sich nach 4 Stunden wieder dem Kontrollwert (4 Stunden: 0,28 +/- 0,01) an.

Die Änderungen der mRNA-Expression für den EGF-Rezeptor sind hier, aufgrund der Überschneidungen der Standardfehler, als Tendenz aufzufassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

Die hyperfraktionierte Bestrahlung mit der Einzeldosis von 1 Gy zeigt bei der Zelllinie U343 die größte Auswirkung auf die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene. Ausgehend von dem Niveau der Kontrolle (2,16 +/- 0,14) steigt der Quotient EGFR/PBGD nach 1 Stunde auf einen Wert von 4,02 (+/- 0,62). Nach 3 Stunden erreicht der Quotient mit 6,3 (+/-1,18) sein Maximum, bevor er nach 4 Stunden wieder auf einen Wert von 3,89 (+/- 0,48) fällt. Die Abbildung 21 demonstriert die beschriebenen Ergebnisse.

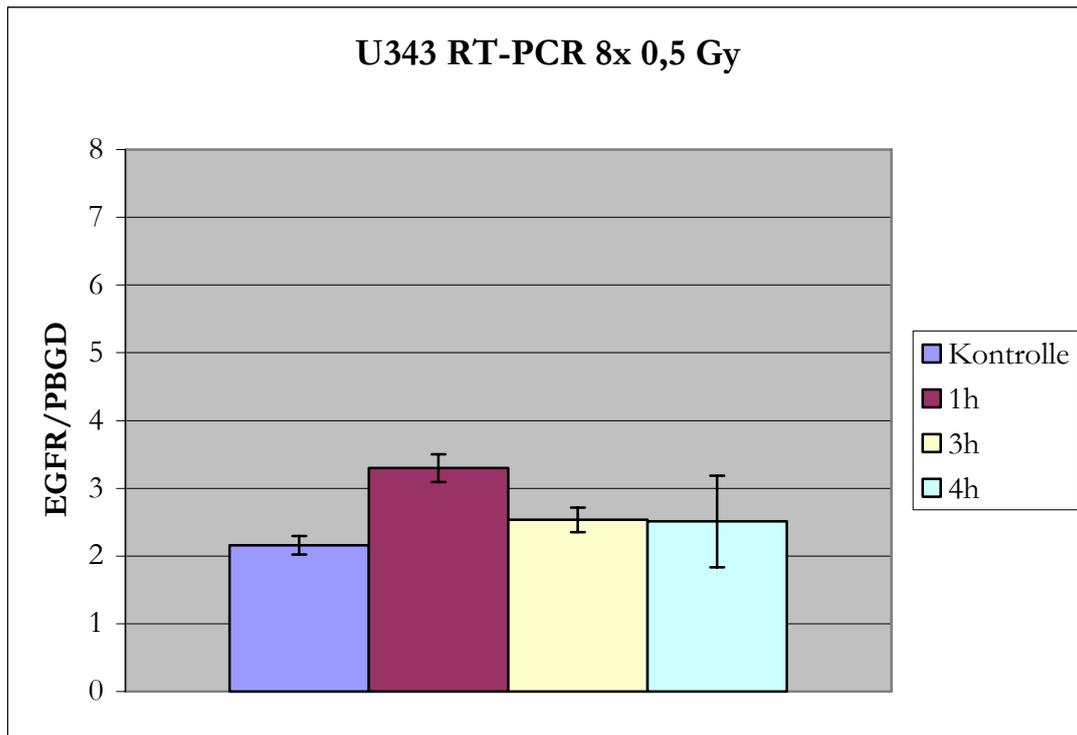
Bei der Gliomzelllinie U373 bewirkt die hyperfraktionierte Radiatio mit der Einzeldosis von 1 Gy ebenfalls einen Anstieg der mRNA-Expression für EGFR nach 1 Stunde. Der Quotient EGFR/PBGD steigt auf 0,4 (+/- 0,09). Allerdings sinkt der Quotient bereits nach 3 Stunden wieder auf einen Wert von 0,34 (+/- 0,11) ab. Nach 4 Stunden (0,23 +/- 0,08) liegt die EGFR-Expression sogar unter dem Kontrollniveau. Wie bereits bei der Einzeldosis von 0,5 Gy sind die Änderungen der EGFR-Expression auf mRNA-Ebene, aufgrund der Überschneidung der Standardfehler, als Tendenz aufzufassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

Die Zelllinie U343 zeigt bei der Einzeldosis von 1,5 Gy nach 1 Stunde wieder einen Anstieg der EGFR-Expression. Der Quotient EGFR/PBGD liegt nach 1 Stunde bei 3,8 (+/- 0,85). Im Gegensatz zu der Dosis von 1 Gy sinkt der Quotient bereits nach 3 Stunden wieder auf einen Wert von 1,75 (+/- 0,71). Dieses Niveau wird auch nach 4 Stunden gehalten (1,79 +/- 0,42). In Abbildung 23 sind die Ergebnisse dargestellt.

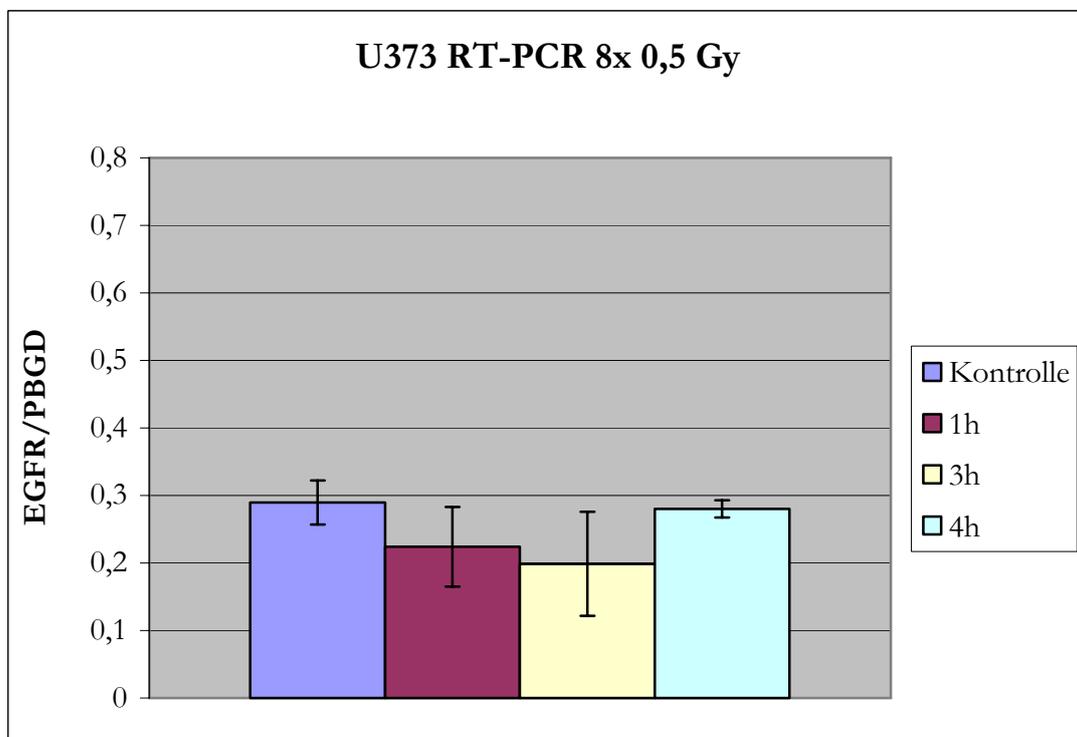
Die hyperfraktionierte Bestrahlung mit der Einzeldosis von 1,5 Gy bewirkt bei der Zelllinie U373 einen geringen Anstieg der mRNA-Expression für den EGF-Rezeptor nach 1 Stunde (0,34 +/- 0,05). Nach 3 Stunden zeigt sich keine Änderung in der Expression (0,37 +/- 0,04). Nach 4 Stunden fällt die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene wieder auf 0,24 (+/- 0,02) ab. Wie bereits für 0,5 Gy und 1 Gy sind die Änderungen in der Expression, aufgrund der Überschneidung der Standardfehler, als Tendenz aufzufassen. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 24 dargestellt.

Insgesamt beeinflusst hyperfraktionierte Bestrahlung bei beiden Gliomzelllinien U343 und U373 die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene. Allerdings sind die Bestrahlungseffekte auf den Rezeptor bei der Zelllinie U343 deutlich einheitlicher und signifikanter. Die Zelllinie U343 zeigt, unabhängig von der Strahlendosis, einen Anstieg der mRNA-Expression für EGFR nach 1 Stunde, der nach 3 bzw. 4 Stunden wieder abfällt. Bei der Zelllinie U373 hingegen hat die niedrige Dosis von 0,5 Gy nach 1 Stunde eine verringerte EGFR-Expression zur Folge, während es bei 1 Gy und 1,5 Gy ebenfalls nach 1 Stunde zu einem Anstieg der Expression kommt. Die Änderungen

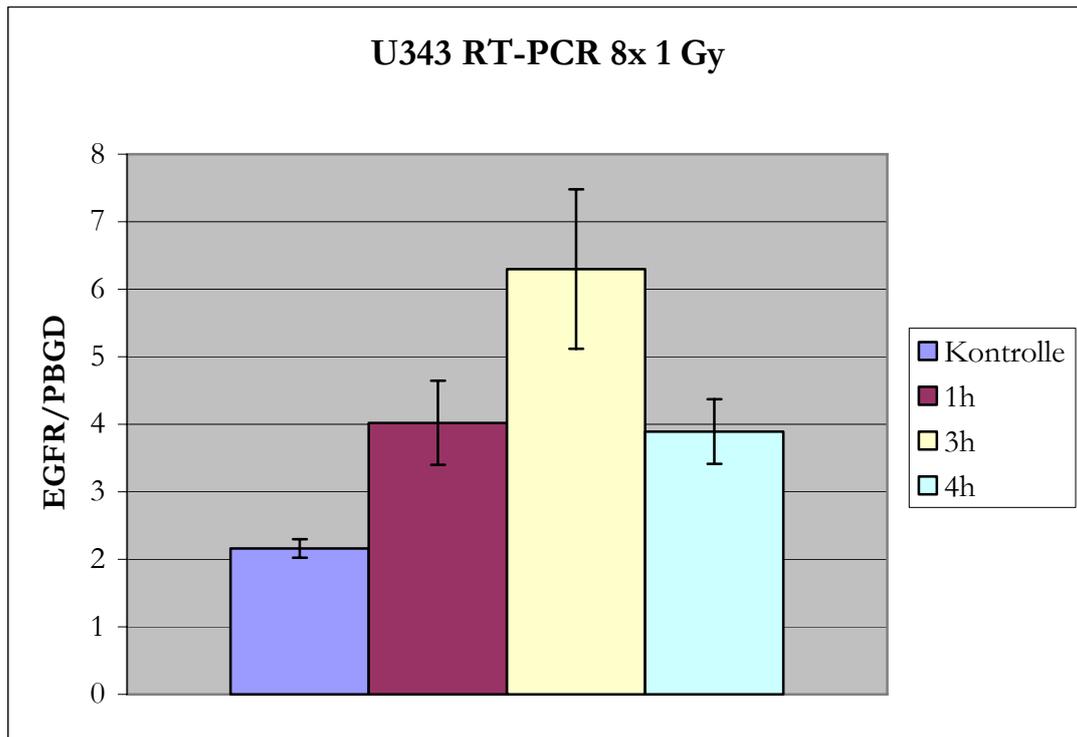
in der Expression sind bei der Zelllinie U373 weniger signifikant und deswegen als Tendenz zu betrachten.



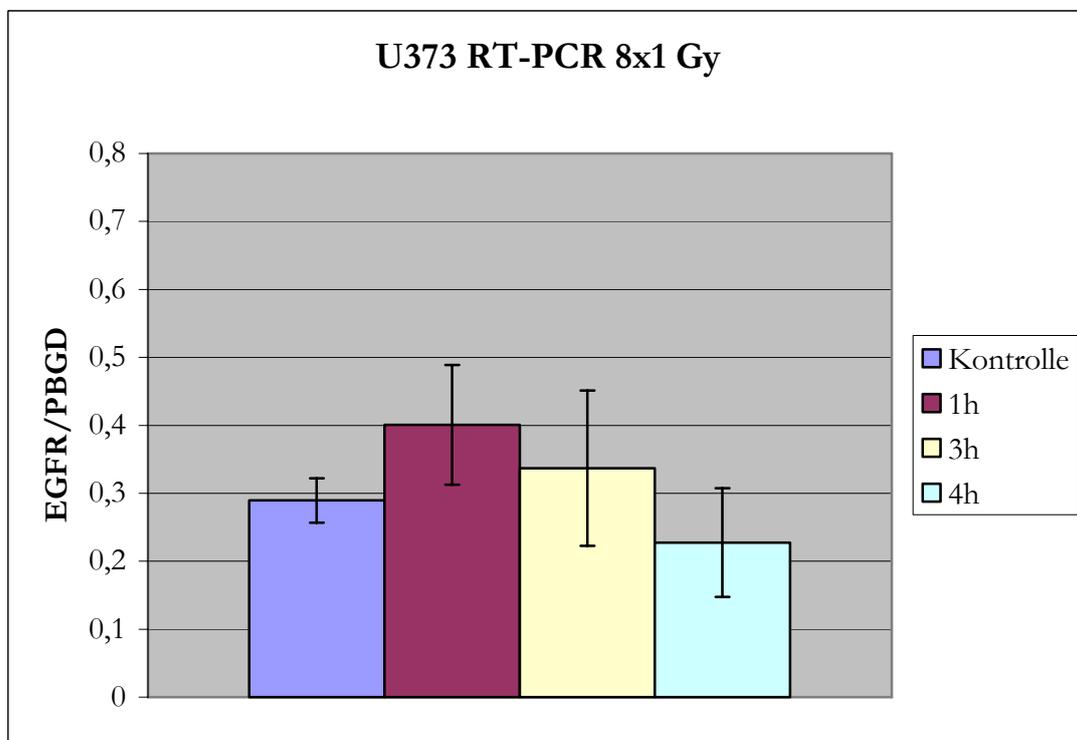
**Abbildung 19:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer mit 0,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlten Zellpopulation, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



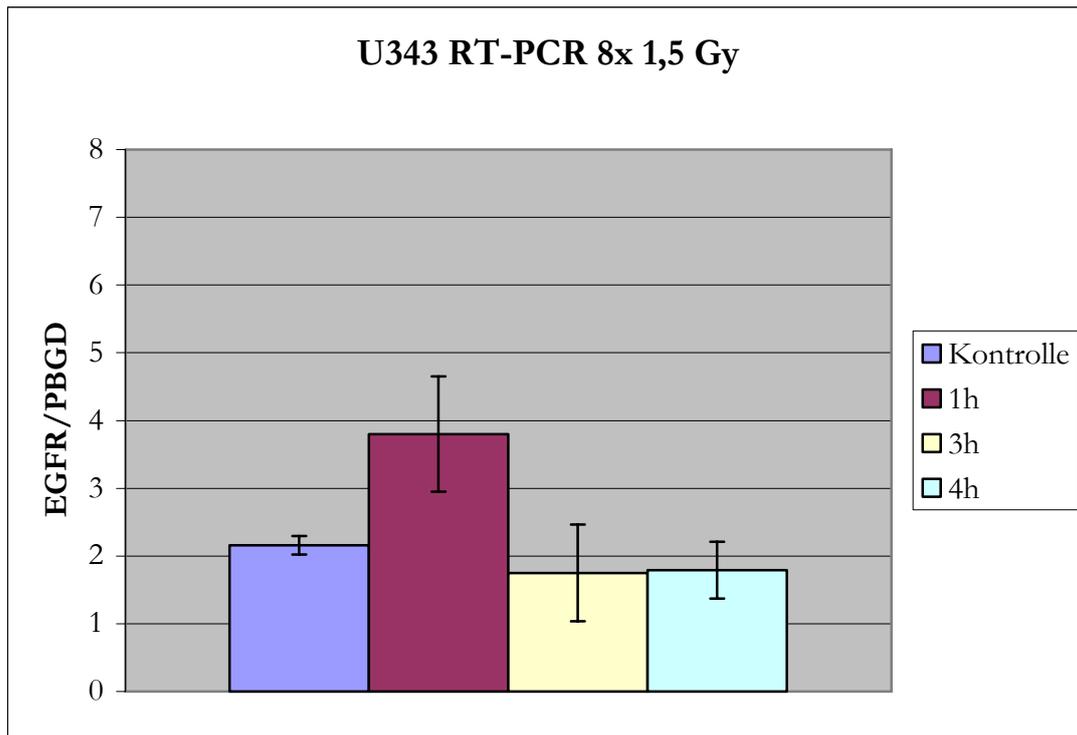
**Abbildung 20:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer mit 0,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlten Zellpopulation, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



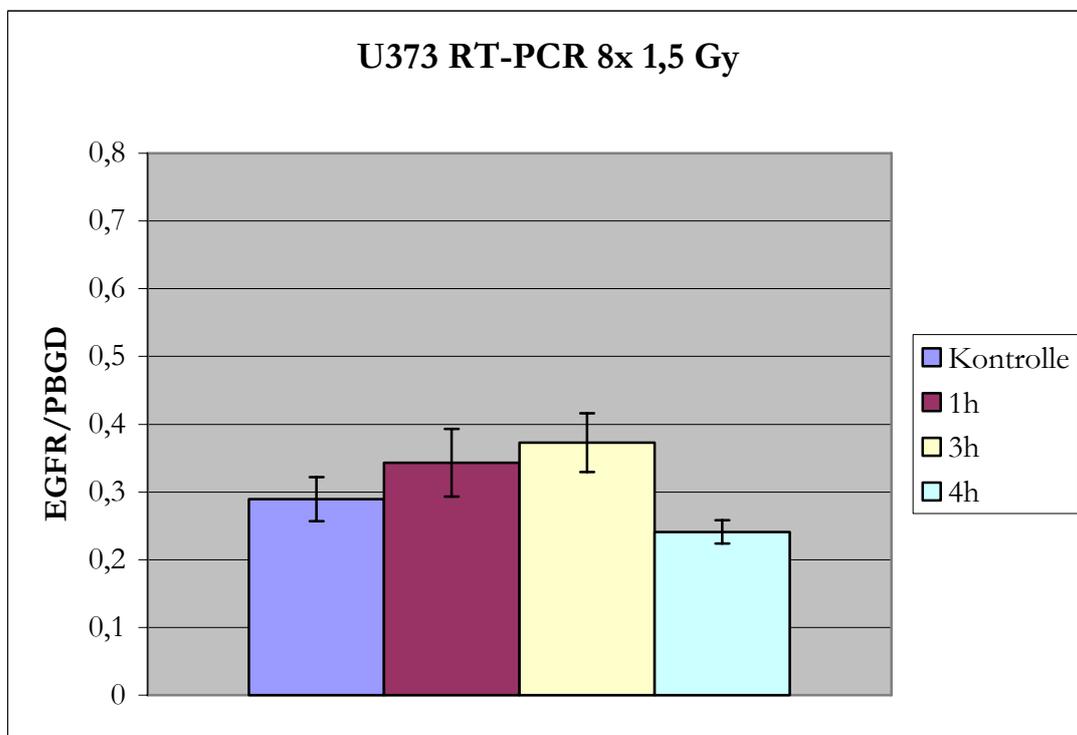
**Abbildung 21:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer mit 1 Gy hyperfraktioniert bestrahlten Zellpopulation, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



**Abbildung 22:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer mit 1 Gy hyperfraktioniert bestrahlten Zellpopulation, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



**Abbildung 23:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer mit 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlten Zellpopulation, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



**Abbildung 24:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer mit 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlten Zellpopulation, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung

#### 4.2.4. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verändert die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene bei den Gliomzelllinien U343 und U373

In diesem Versuchsansatz wurde untersucht, welchen Einfluss die Blockade des EGF-Rezeptors durch den Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ auf die mRNA-Expression des EGF-Rezeptors hat.

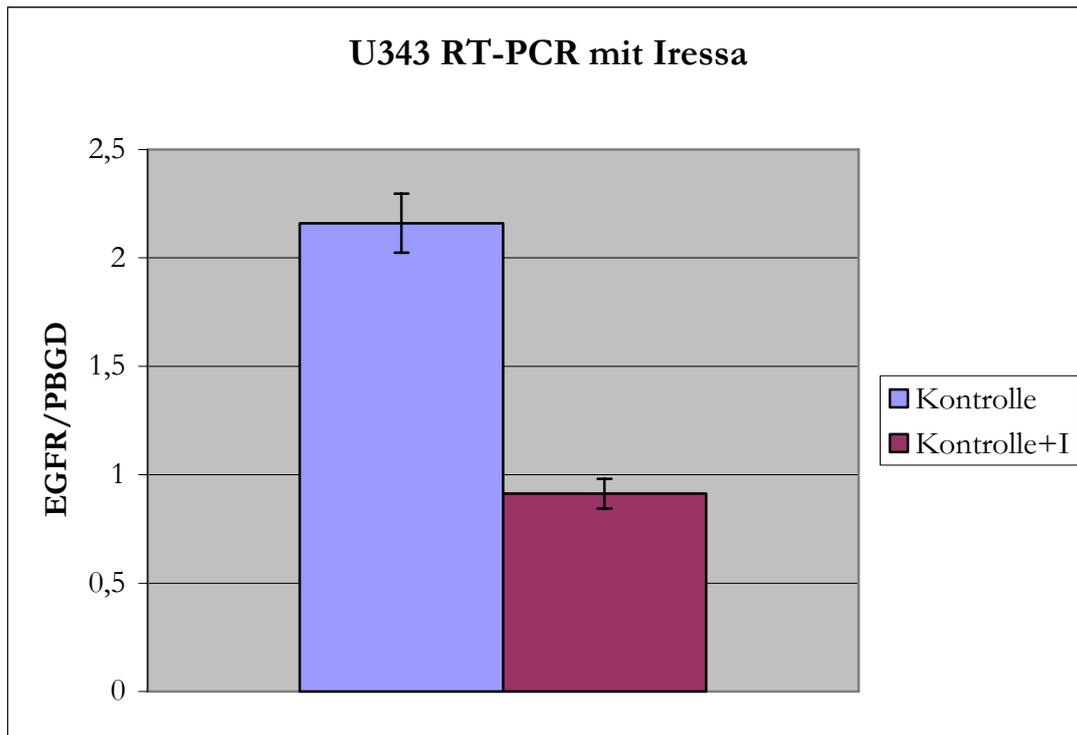
Es wurden für beide Gliomzelllinien U343 und U373  $1 \times 10^6$  Zellen pro Versuch ausgesät und über 4 Tage mit der Testsubstanz „Iressa®“ in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  inkubiert. Anschließend wurde die mRNA aus den Zellen isoliert, cDNA synthetisiert und mittels PCR die entsprechende cDNA für EGFR und PBGD amplifiziert und gemessen. Mit der unbehandelten Kontrollgruppe wurde in dem gleichen Zeitfenster verfahren.

In der Abbildung 25 ist die Expression von EGFR relativ zu der von PBGD für die Zelllinie U343 dargestellt. Gleiches gilt in der Abbildung 26 für die Zelllinie U373. In beiden Diagrammen wird der mit „Iressa®“ behandelten Gruppe eine unbehandelte Kontrollgruppe gegenübergestellt. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler der Mittelwerte im Diagramm eingetragen.

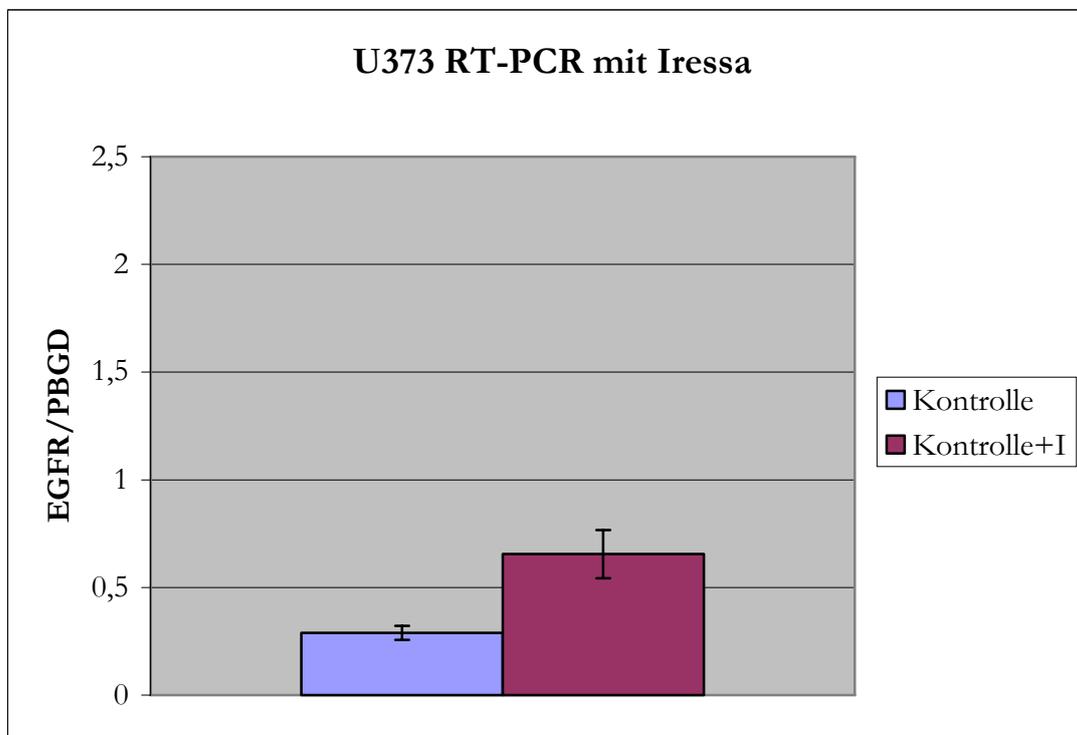
Die Hemmung des EGF-Rezeptors durch den Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ bewirkt bei beiden Zelllinien Änderungen in der Expression des Rezeptors auf mRNA-Ebene. Die Expressionsänderungen manifestieren sich allerdings in entgegengesetzter Weise. Während bei der Zelllinie U343 die Rezeptorblockade durch „Iressa®“ eine Reduktion der EGFR-Expression auf mRNA-Ebene zur Folge hat, kommt es bei der Zelllinie U373 zu einem Anstieg der mRNA-Expression für den EGF-Rezeptor.

Das Niveau der relativen EGFR-Expression wird bei der Zelllinie U343, ausgehend von 2,16 (+/- 0,14), durch Blockade des EGF-Rezeptors auf 0,91 (+/- 0,07) gesenkt. Die Zelllinie U373 zeigt, ausgehend von 0,29 (+/- 0,03), einen Niveauanstieg durch „Iressa®“ auf 0,65 (+/- 0,11).

Die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene liegt bei der Zelllinie U343 auch nach Rezeptorblockade mittels „Iressa®“ auf einem höheren Level als bei der Zelllinie U373.



**Abbildung 25:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD der Kontrollgruppe im Vergleich zu einer mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Zellpopulation der Zelllinie U343



**Abbildung 26:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD der Kontrollgruppe im Vergleich zu einer mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ behandelten Zellpopulation der Zelllinie U373

#### **4.2.5. Hyperfraktionierte Bestrahlung kombiniert mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verändert die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene abhängig von der Zelllinie**

Nachdem in den beiden vorangehenden Versuchen gezeigt wurde, dass sowohl „Iressa®“ als auch hyperfraktionierte Radiatio Einfluss auf die mRNA-Expression des EGF-Rezeptors haben, wurde in diesem Versuchsansatz die Wirkung von hyperfraktionierter Bestrahlung kombiniert mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ auf die Rezeptorexpression untersucht.

Es wurden von den verwendeten Zelllinien U343 und U373  $1 \times 10^6$  Zellen pro Versuch ausgesät und über Tage 4 Tage hyperfraktioniert mit den jeweiligen Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy bestrahlt. Simultan wurde den Zellen vor jeder morgendlichen Bestrahlung „Iressa®“ in einer Konzentration von  $1 \mu\text{mol/l}$  zugesetzt und 24 Stunden belassen. Nach der letzten Bestrahlung wurde „Iressa®“ entfernt. Um Änderungen in der Expression auf mRNA-Ebene zu erfassen, wurde 1 Stunde, 3 Stunden und 4 Stunden nach der letzten Bestrahlung mRNA aus den Zellen isoliert. Anschließend wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und mittels PCR die entsprechende cDNA für EGFR und PBGD amplifiziert und gemessen. Mit der unbehandelten Kontrollgruppe wurde in dem gleichen Zeitfenster verfahren.

In den Abbildungen 27 bis 32 sind die relativen EGFR-Expressionen als Quotient EGFR/PBGD für beide Zelllinien unter der simultanen Behandlung mit ionisierender Bestrahlung und Blockade des EGF-Rezeptors mittels „Iressa®“ dargestellt. In jedem Diagramm wird den behandelten Zellen die Kontrollgruppe zum Vergleich gegenübergestellt. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler jedes Wertes im Diagramm eingetragen. Weiterhin ist zu beachten, dass für die Diagramme der beiden Zelllinien, aufgrund der verschiedenen Werte, unterschiedliche Maßstäbe für die Ordinate gewählt wurden.

Bei der Gliomzelllinie U343 bewirkt die Einzeldosis von 0,5 Gy pro Fraktion kombiniert mit  $1 \mu\text{M}$  „Iressa®“ eine verminderte EGFR-Expression gegenüber der Kontrolle. Nach 1 Stunde sinkt der Quotient EGFR/PBGD auf einen Wert von 0,78 ( $\pm 0,06$ ). Nach 3 Stunden fällt das Niveau des Quotienten auf einen Wert von 0,54 ( $\pm 0,03$ ) ab. Bereits nach 4 Stunden steigt die EGFR-Expression wieder auf 1,06 ( $\pm 0,11$ ) an. Damit liegt die kombiniert behandelte Zellpopulation zu jedem Messzeitpunkt unter dem Niveau der Kontrolle ( $2,16 \pm 0,14$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 verdeutlicht.

Die Zelllinie U373 reagiert auf die Bestrahlung mit 0,5 Gy pro Fraktion kombiniert mit  $1 \mu\text{M}$  „Iressa®“ mit einem Anstieg der EGFR-Expression. Nach 1 Stunde lassen sich zwar noch keine

Veränderungen der Expression gegenüber der Kontrolle feststellen (Kontrolle: 0,29 +/- 0,03; 1 Stunde: 0,3 +/- 0,11), aber nach 3 Stunden steigt der Quotient EGFR/PBGD auf einen Wert von 0,48 (+/- 0,18) an. Dieses Niveau wird auch nach 4 Stunden mit einem Wert von 0,43 (+/- 0,17) gehalten. Die beschriebenen Änderungen der mRNA-Expression für den EGF-Rezeptor sind hier, aufgrund der Überschneidungen der Standardfehler, als Tendenz aufzufassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

Die Kombination aus hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Einzeldosis von 1 Gy und der Inkubation mit „Iressa®“ bewirkt bei der Zelllinie U343 eine verminderte EGFR-Expression auf mRNA-Ebene. Ausgehend von der Kontrolle (2,16 +/- 0,14) sinkt der Quotient EGFR/PBGD nach 1 Stunde auf einem Wert von 1,58 (+/- 0,34). Auch nach 3 Stunden liegt der Quotient mit 1,43 (+/- 0,13) auf diesem niedrigen Niveau, bevor er nach 4 Stunden wieder anzusteigen scheint (4 Stunden: 1,81 +/- 0,35). Wie bei der Einzeldosis von 0,5 Gy liegt die Expression des EGF-Rezeptors zu jedem gemessenen Zeitpunkt unter dem Kontrollniveau. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse dargestellt.

Bei der Zelllinie U373 bewirkt die Einzeldosis von 1 Gy pro Fraktion kombiniert mit 1 µM „Iressa®“ wie bereits bei 0,5 Gy einen Anstieg der EGFR-Expression. Im Vergleich zu der Kontrolle (0,29 +/- 0,03) liegt der Quotient EGFR/PBGD nach 1 Stunde mit einem Wert von 0,61 (+/- 0,21) deutlich höher. Auch nach 3 Stunden hält der Quotient mit einem Wert 0,6 (+/- 0,25) dieses Niveau. Der weitere Anstieg der Expression nach 4 Stunden auf 0,76 (+/- 0,27) ist wegen der Überschneidung der Standardfehler nicht signifikant. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

Die Zelllinie U343 zeigt bei der Kombination aus hyperfraktionierter Bestrahlung mit 1,5 Gy pro Fraktion und Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ eine reduzierte Expression des EGF-Rezeptors. Nach 1 Stunde sinkt der Quotient EGFR/PBGD im Vergleich zu der Kontrolle (2,16 +/- 0,14) auf einen Wert von 0,87 (+/- 0,18) ab. Bereits nach 3 Stunden steigt der Quotient wieder an und wird auch nach 4 Stunden auf diesem Level gehalten (3 Stunden: 1,38 +/- 0,21; 4 Stunden: 1,45 +/- 0,24). Damit liegt die EGFR-Expression auf mRNA-Ebene wie bei den Einzeldosen von 0,5 Gy und 1 Gy zu jedem Zeitpunkt unter dem Kontrollniveau. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse verdeutlicht.

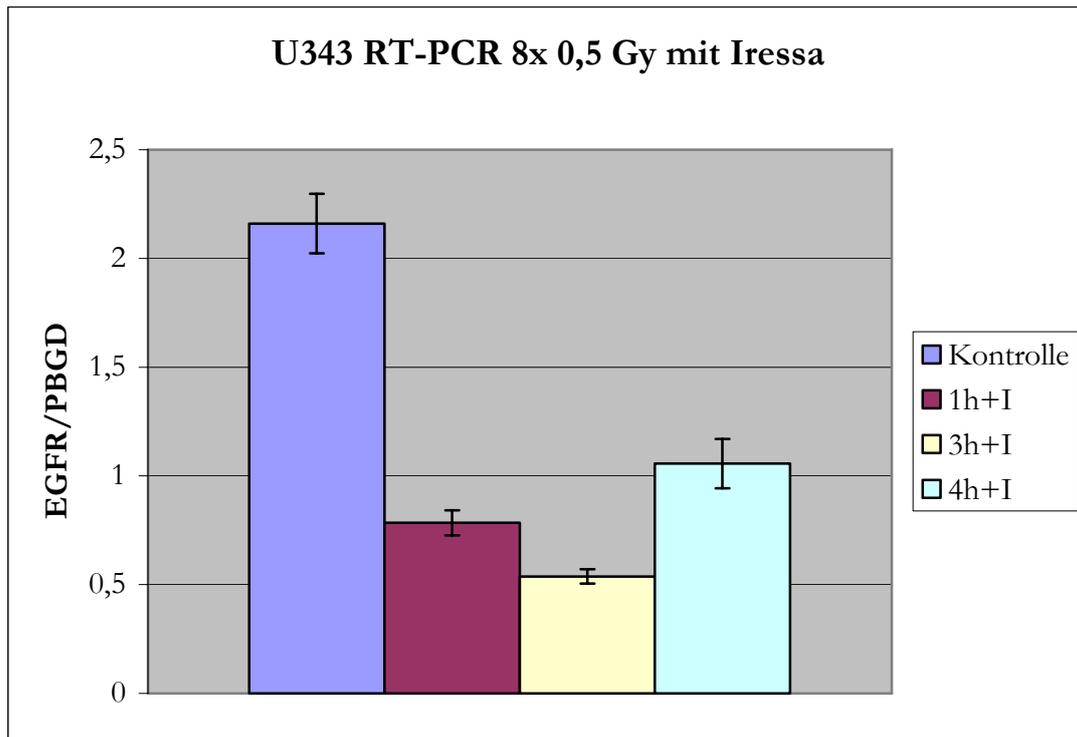
Die Kombination aus hyperfraktionierter Bestrahlung mit der Einzeldosis von 1,5 Gy und der Inkubation mit „Iressa®“ bewirkt bei der Zelllinie U373 eine vermehrte EGFR-Expression. Nach 1 Stunde liegt der Quotient EGFR/PBGD mit einem Wert von 0,68 (+/- 0,11) im Vergleich zu

der Kontrolle ( $0,29 \pm 0,03$ ) deutlich höher. Nach 3 und 4 Stunden scheint das Niveau der Expression wieder abzusinken (3 Stunden:  $0,53 \pm 0,22$ ; 4 Stunden  $0,49 \pm 0,19$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

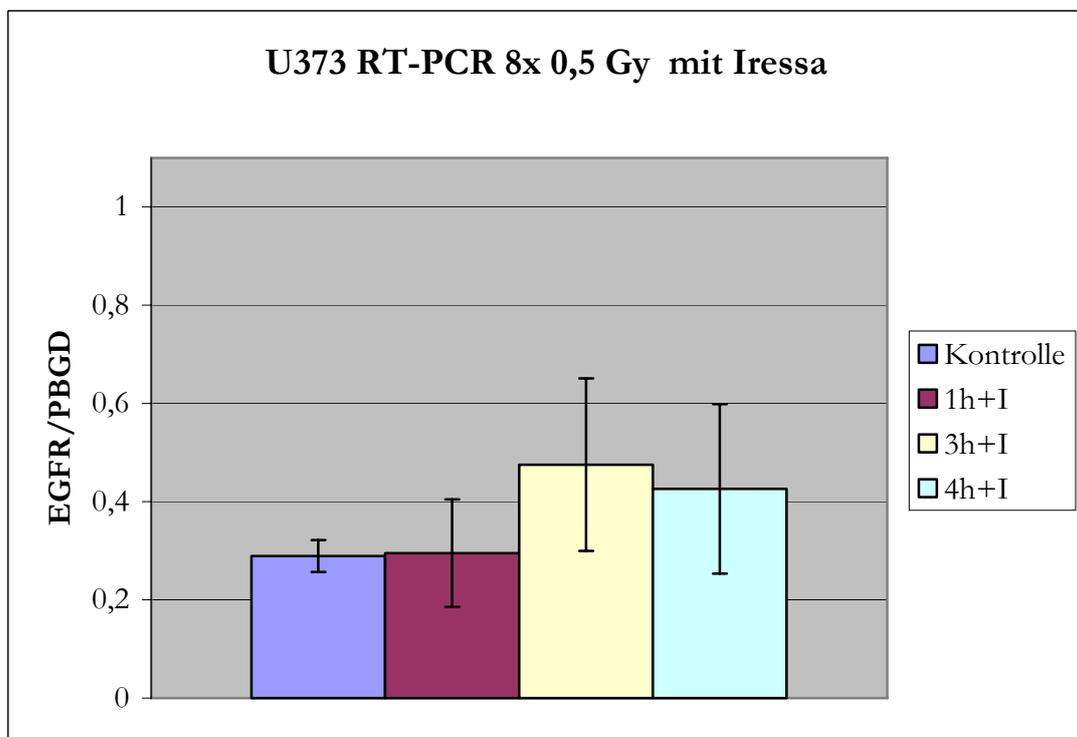
Die Kombination aus hyperfraktionierter Bestrahlung und der Blockade des EGF-Rezeptors mittels „Iressa®“ bewirkt bei beiden verwendeten Gliomzelllinien U343 und U373 Änderungen in der Expression des Rezeptors auf mRNA-Ebene. Allerdings reagieren die Zelllinien unterschiedlich auf diese Kombinationsbehandlung.

Bei der Zelllinie U343 sinkt die Expression, unabhängig von der Einzeldosis pro Fraktion, nach 1 Stunde ab und steigt nach 3 oder 4 Stunden wieder leicht an. Das Kontrollniveau wird aber bei keiner Dosis erreicht. Am niedrigsten ist die Expression unter Radiatio mit der Einzeldosis von 0,5 Gy.

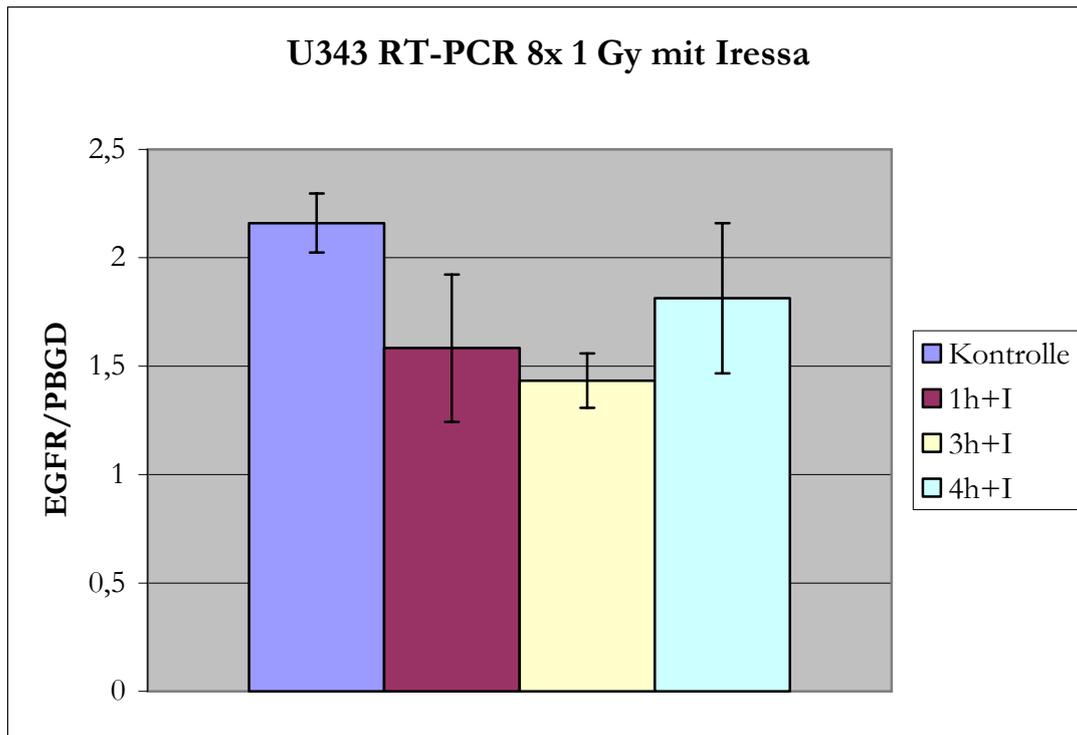
Die Zelllinie U373 zeigt dagegen einen Anstieg der Expression bei jeder Bestrahlungsdosis. Den größten Anstieg der Expression des EGF-Rezeptors findet man bei der Einzeldosis von 1 Gy pro Fraktion.



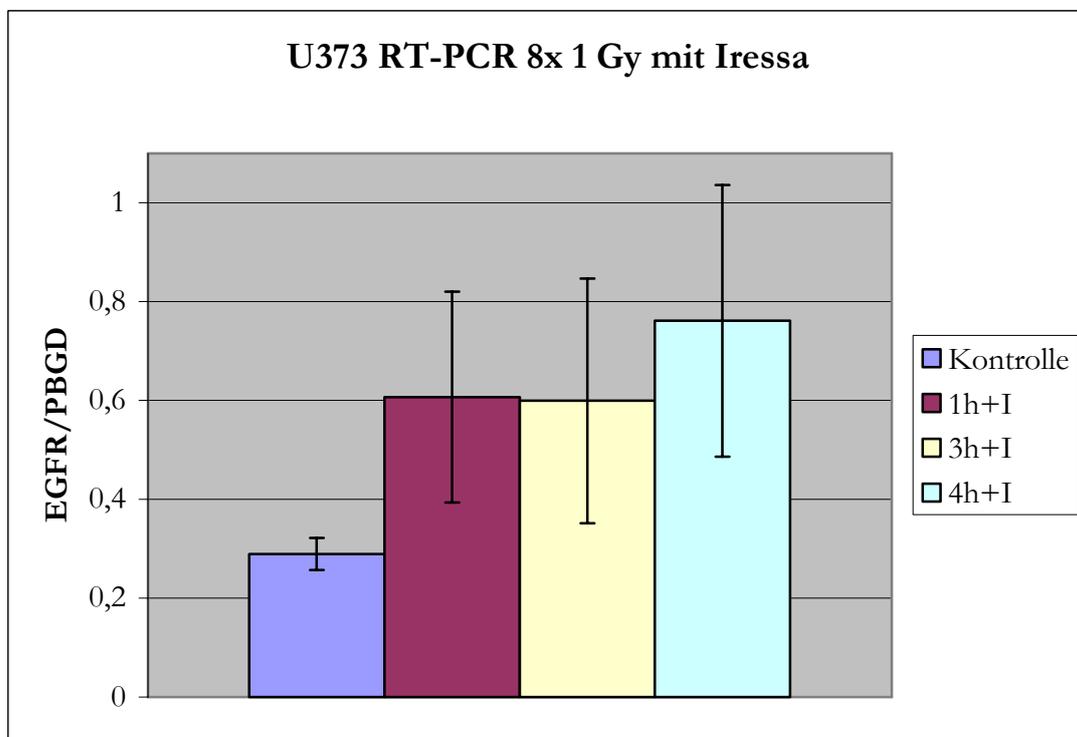
**Abbildung 27:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 0,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ behandelt wurde, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



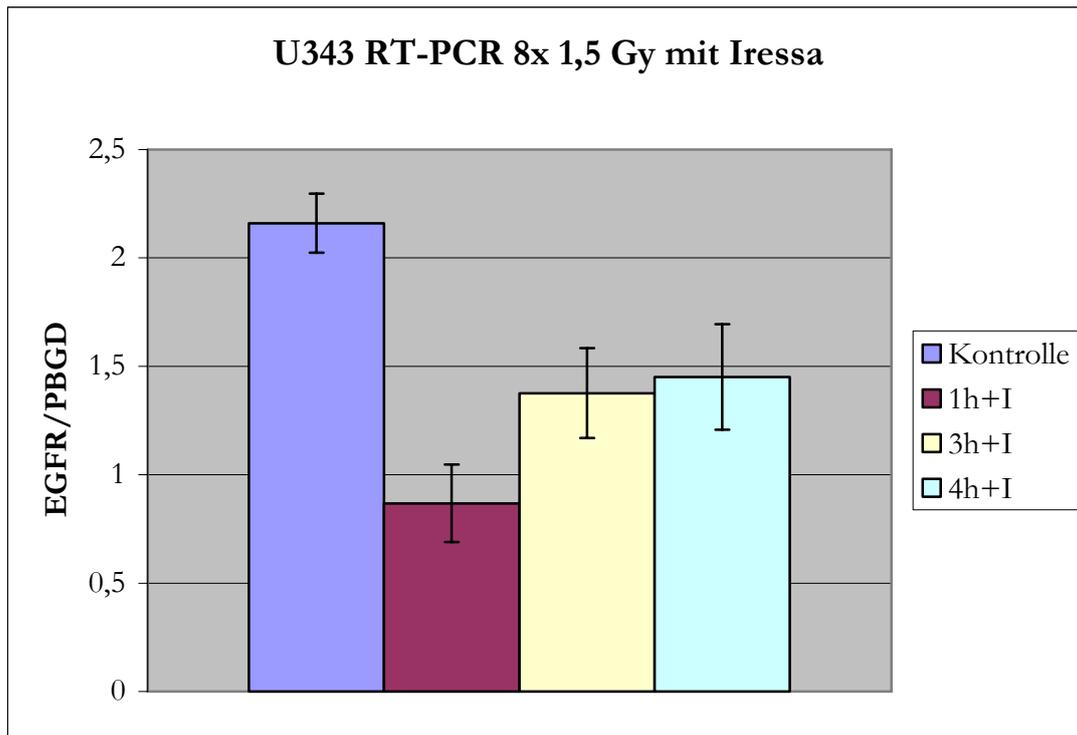
**Abbildung 28:** : Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 0,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ behandelt wurde, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



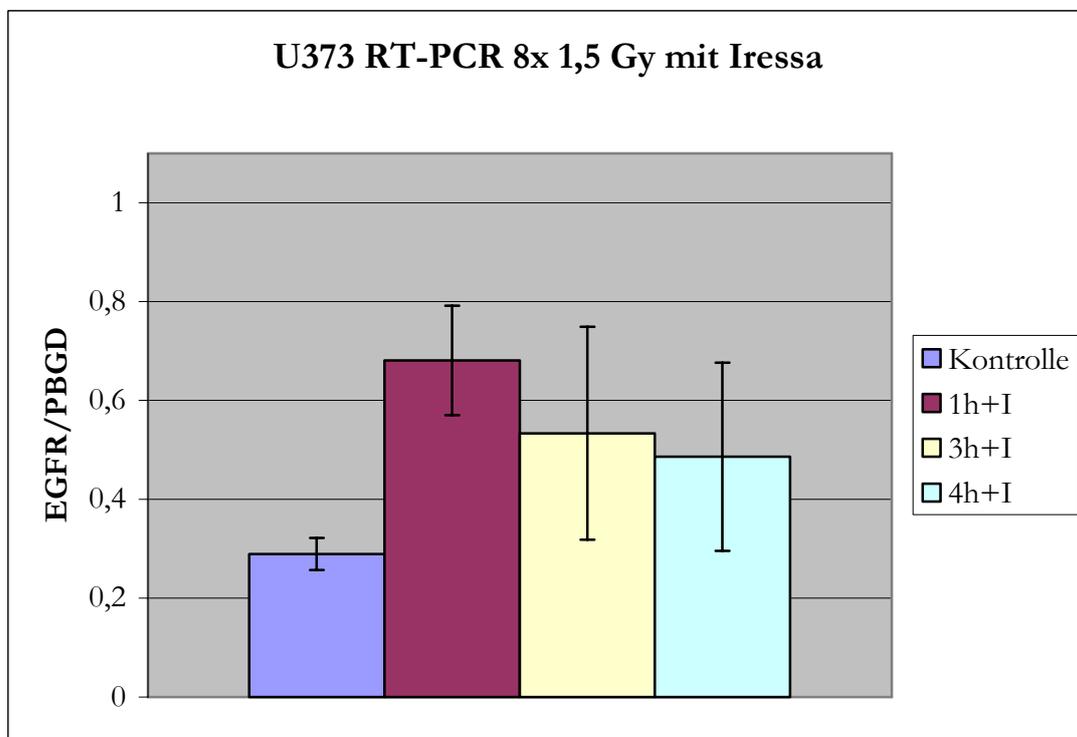
**Abbildung 29:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ behandelt wurde, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



**Abbildung 30:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ behandelt wurde, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



**Abbildung 31:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ behandelt wurde, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung



**Abbildung 32:** Darstellung des Quotienten EGFR/PBGD einer Kontrollgruppe im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ behandelt wurde, gemessen an den angegebenen Zeitpunkten nach der letzten Bestrahlung

### 4.3. Western Blot

Mittels dieser Methode wurde die Expression des EGF-Rezeptors der Gliomzelllinien U343 und U373 sowohl unter ionisierender Bestrahlung als auch unter Blockade des Rezeptors durch den Tyrosinkinaseinhibitor ZD 1839 „Iressa®“ auf Proteinebene betrachtet.

In der ersten Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit hyperfraktionierte Bestrahlung die Expression des EGF-Rezeptors auf der Proteinebene beeinflusst.

Die zweite Versuchsreihe ging der Frage nach, welche Auswirkung die Applikation von „Iressa®“ allein und in Kombination mit hyperfraktionierter Bestrahlung auf die Proteinexpression des EGF-Rezeptors hat.

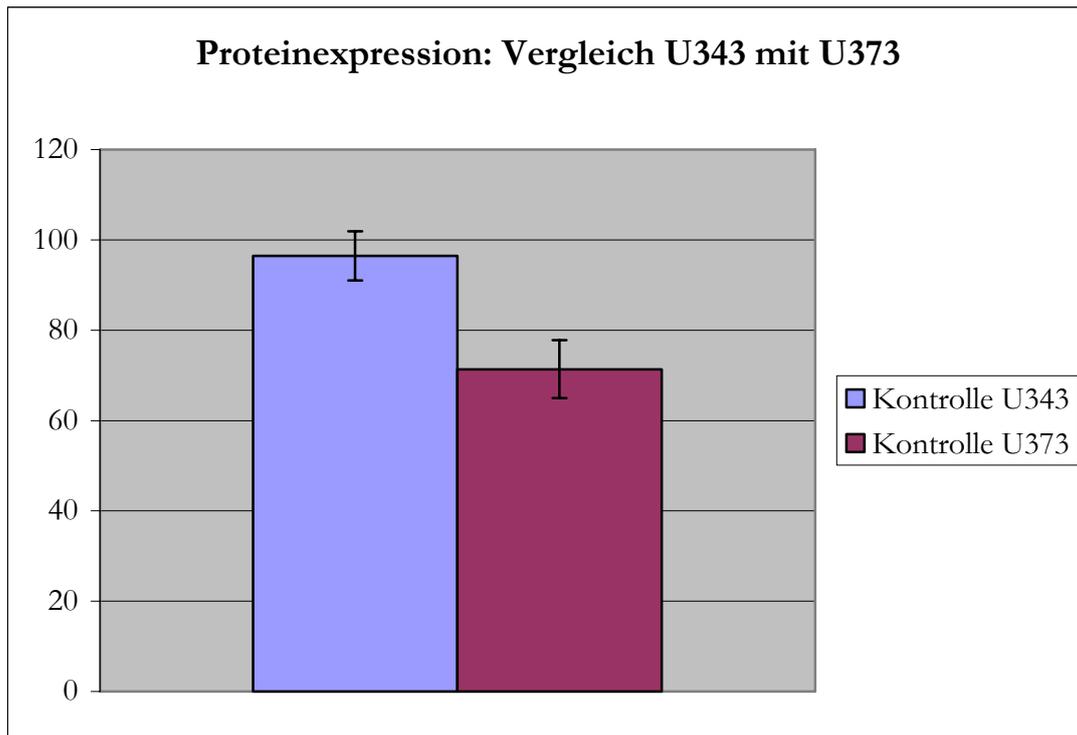
Die Gliomzelllinien wurden in jeder Versuchsreihe mit den Einzeldosen 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy über 4 Tage hyperfraktioniert bestrahlt. Die Expression des EGF-Rezeptors auf Proteinebene wurde 1 Stunde und 3 Stunden nach der letzten Bestrahlung ermittelt. Die Quantifizierung der EGFR-Expression erfolgte durch densitometrische Messung der Proteinbanden in Relation zu dem Hintergrund.

#### 4.3.1. Die Gliomzelllinien U343 und U373 exprimieren den EGF-Rezeptor auf Proteinebene unterschiedlich stark

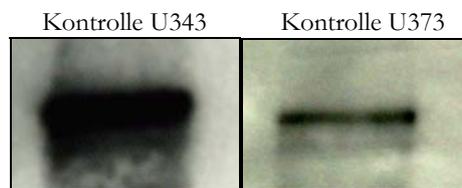
In Abbildung 33 wird die EGFR-Expression von unbestrahlten Zellen der beiden Zelllinien U343 und U373 auf Proteinebene verglichen. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler der Werte eingetragen. Die Abbildung 34 zeigt den Vergleich anhand des jeweiligen Western Blot Bildes.

Wie die Ergebnisse der PCR vermuten lassen, zeigt die Zelllinie U343 auch auf der Proteinebene eine stärkere EGFR-Expression als die Zelllinie U373. Anhand der densitometrischen Messung der Banden erhält man für die Zelllinie U343 einen Wert von 96,47 (+/- 5,44) und für die U373 einen Wert von 71,36 (+/- 6,4). Die Proteinexpression ist bei der Zelllinie U343 damit um den Faktor 1,35 höher als bei der U373.

Allerdings ist der Unterschied in der EGFR-Expression auf Proteinebene deutlich geringer als auf mRNA-Ebene.



**Abbildung 33:** Vergleich der EGFR-Expression auf Proteinebene der Zelllinien U343 und U373



**Abbildung 34:** Western Blots der Kontrollen von U343 und U373

### 4.3.2. Hyperfraktionierte Bestrahlung beeinflusst die Expression des EGF-Rezeptors auf Proteinebene

In diesem Versuchsansatz wurde der Einfluss von hyperfraktionierter Radiatio auf die Proteinexpression des EGF-Rezeptors untersucht. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Versuch ausgesät und über 4 Tage mit den jeweiligen Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy bestrahlt. Die Expression des Rezeptors wurde 1 Stunde und 3 Stunden nach der letzten Bestrahlung mittels Western Blot bestimmt. Mit der unbehandelten Kontrollgruppe wurde in dem gleichen Zeitfenster verfahren

In den Abbildungen 35 bis 46 sind die Ergebnisse für beiden Zelllinien jeweils als Diagramm und in Form der Western Blot Bilder dargestellt. In jedem Diagramm wird den bestrahlten Zellen eine unbehandelte Kontrollgruppe zum Vergleich gegenübergestellt. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler der Mittelwerte in jedem Diagramm eingetragen.

Bei der Gliomzelllinie U343 bewirkt die Einzeldosis von 0,5 Gy gegenüber der Kontrolle (96,47 +/- 5,44) eine Abnahme der Proteinexpression. Eine Stunde nach Bestrahlung hat sich die Proteinexpression ungefähr halbiert (45,35 +/- 8,93). Auch wenn der Wert nach 3 Stunden (53,33 +/- 5,76) nicht signifikant höher ist, kann man eine ansteigende Tendenz vermuten. In Abbildung 35 sind die Ergebnisse als Diagramm dargestellt und in Abbildung 36 das entsprechende Western Blot Bild.

Die Zelllinie U373 reagiert auf die Einzeldosis von 0,5 Gy vergleichbar mit der Zelllinie U343. Eine Stunde nach Bestrahlung hat sich die Proteinexpression im Vergleich zu der Kontrolle etwa halbiert (1 Stunde: 30,86 +/- 2,3; Kontrolle: 71,36 +/- 6,4). Nach 3 Stunden sieht man wieder eine Zunahme der Proteinexpression auf einen Wert von 48,44 (+/- 1,08). Im Gegensatz zu der Zelllinie U343 ist diese Zunahme signifikant und nicht nur als Tendenz zu werten. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 37 und 38 dargestellt.

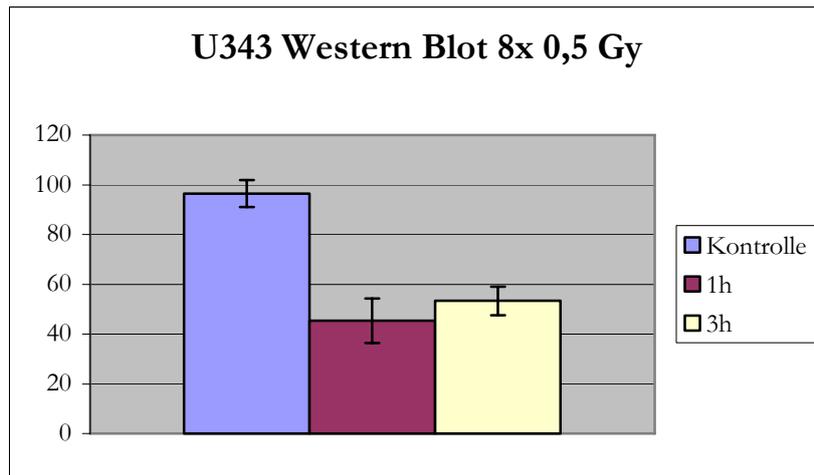
Die hyperfraktionierte Bestrahlung mit der Einzeldosis von 1 Gy bewirkt bei der Gliomzelllinie U343 ebenfalls eine Abnahme der Proteinexpression. Im Vergleich zu der Kontrolle (96,47 +/- 5,44) verringert sich die Expression nach 1 Stunde etwa auf ein Drittel (30,02 +/- 2,0). Bei der Dosis von 1 Gy steigt die Proteinexpression nach 3 Stunden diesmal signifikant auf einen Wert von 46,4 (+/- 3,1) an. In den Abbildungen 39 und 40 sind die Ergebnisse als Diagramm und in Form des Western Blot Bildes demonstriert.

Die Zelllinie U373 zeigt bei der Bestrahlung mit der Einzeldosis von 1 Gy wie bereits bei 0,5 Gy eine Abnahme der Proteinexpression. Im Vergleich zu der Kontrolle (71,36 +/- 6,4) verringert sich die Expression 1 Stunde nach Bestrahlung auf einen Wert von 29,47 (+/- 1,28). Auch bei dieser Dosis zeigt sich nach 3 Stunden wieder eine Zunahme der Proteinexpression auf 37,79 (+/- 1,65). In Abbildung 41 sind die Ergebnisse als Diagramm dargestellt und in Abbildung 42 das entsprechende Western Blot Bild.

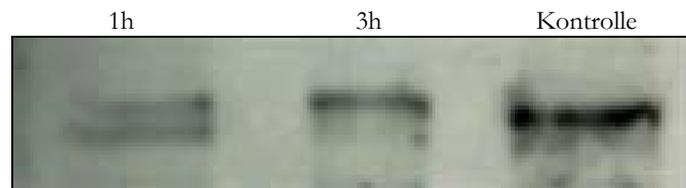
Wie bereits bei den Einzeldosen von 0,5 Gy und 1 Gy zeigt die Zelllinie U343 auch bei einer Dosis von 1,5 Gy eine Reduktion der Proteinexpression im Vergleich zu der Kontrolle. Allerdings ist die Expression nach 1 Stunde (68,22 +/- 3,12) auf einem deutlich höheren Niveau als bei den kleineren Einzeldosen. Auch nach 3 Stunden beobachtet man hier eine steigende Expression (81,04 +/- 0,84), die schon fast das Niveau der unbestrahlten Kontrolle erreicht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 43 und 44 dargestellt.

Die Gliomzelllinie U373 zeigt auch bei Bestrahlung mit der Dosis von 1,5 Gy pro Fraktion eine abnehmende Proteinexpression. Im Vergleich zu der Kontrolle (71,36 +/- 6,4) ist die Expression nach 1 Stunde mit einem Wert von 28,44 (+/- 5,28) deutlich niedriger: Nach 3 Stunden steigt der Wert tendenziell an (34,18 +/- 11,26). Allerdings ist dieser Anstieg nach 3 Stunden im Gegensatz zu den kleineren Einzeldosen nicht signifikant. In Abbildung 45 sind die Ergebnisse als Diagramm dargestellt und in Abbildung 46 das entsprechende Western Blot Bild.

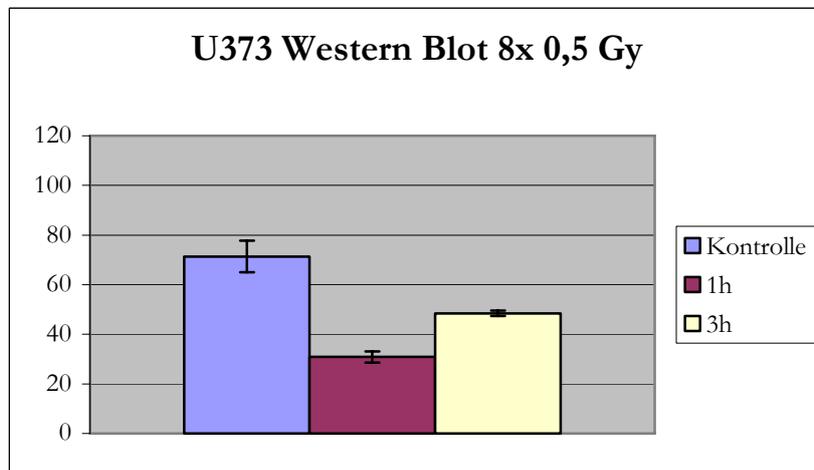
Insgesamt bewirkt hyperfraktionierte Bestrahlung bei den Gliomzelllinien U343 und U373 eine verringerte Expression des EGF-Rezeptors auf Proteinebene. Bei beiden Zelllinien ist die Expression sowohl 1 Stunde als auch 3 Stunden nach Bestrahlung signifikant unter dem Niveau der unbestrahlten Kontrolle, wobei die Expression nach 3 Stunden wieder ansteigt. Bei der Zelllinie U343 ist die Reduktion der Rezeptorexpression besonders 1 Stunde nach Radiatio abhängig von der verabreichten Strahlendosis. Dabei kommt es bei einer Dosis von 1 Gy pro Fraktion zu der größten Verringerung der Expression, bei 1,5 Gy pro Fraktion zu der geringsten. Die Zelllinie U373 zeigt Veränderungen in der Proteinexpression relativ unabhängig von der Strahlendosis.



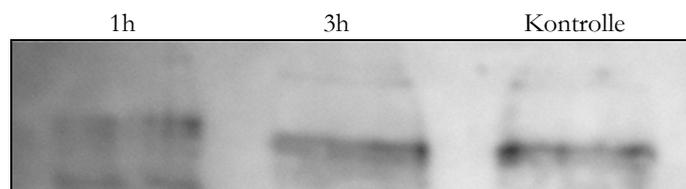
**Abbildung 35:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 0,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt wurde



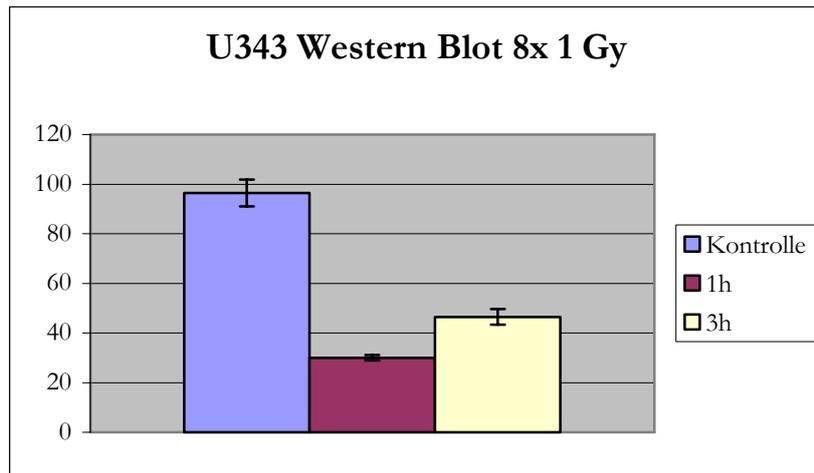
**Abbildung 36:** Western Blot der Zelllinie U343: 8x 0,5 Gy



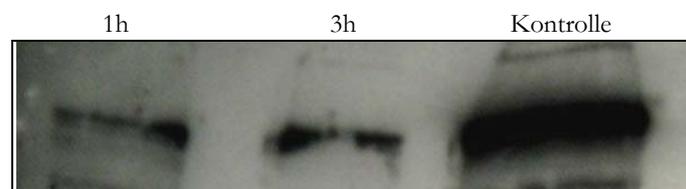
**Abbildung 37:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 0,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt wurde



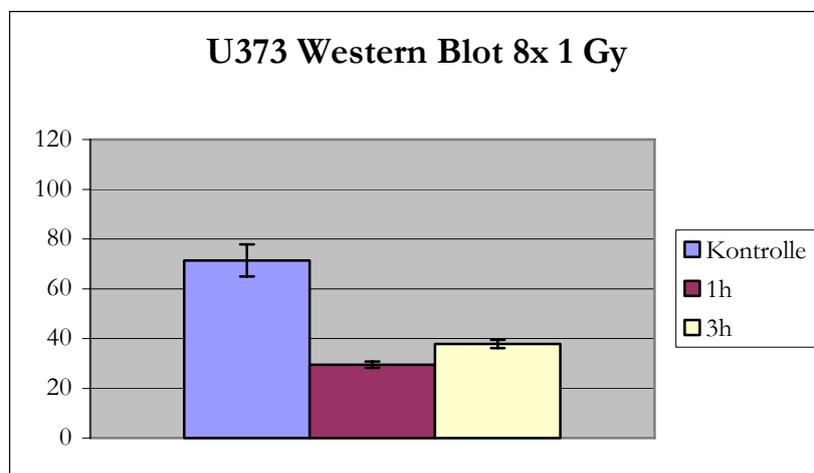
**Abbildung 38:** Western Blot der Zelllinie U373: 8x 0,5 Gy



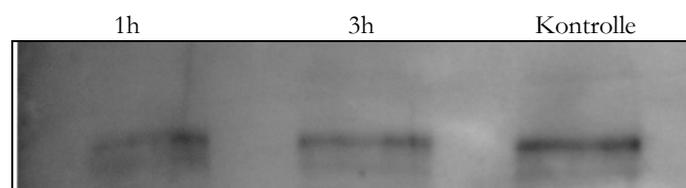
**Abbildung 39:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1 Gy hyperfraktioniert bestrahlt wurde



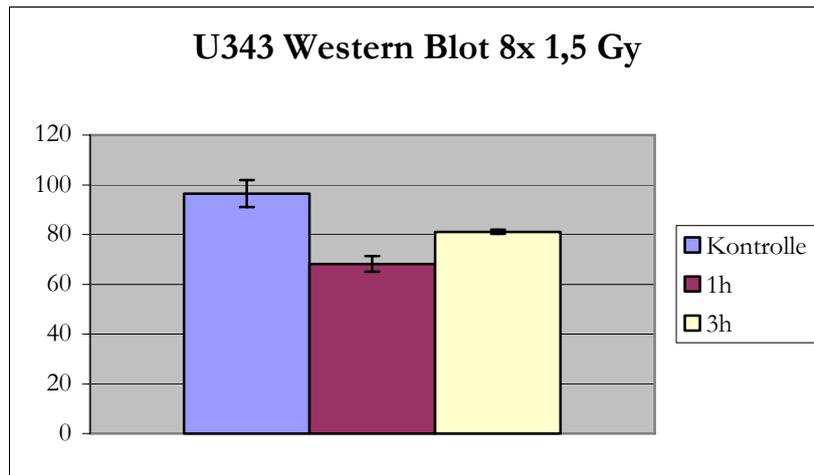
**Abbildung 40:** Western Blot der Zelllinie U343: 8x 1 Gy



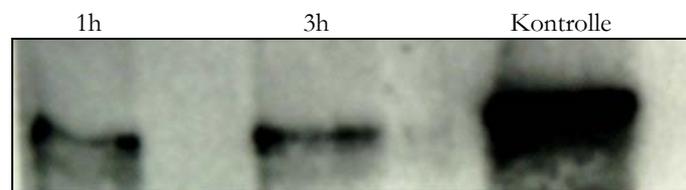
**Abbildung 41:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1 Gy hyperfraktioniert bestrahlt wurde



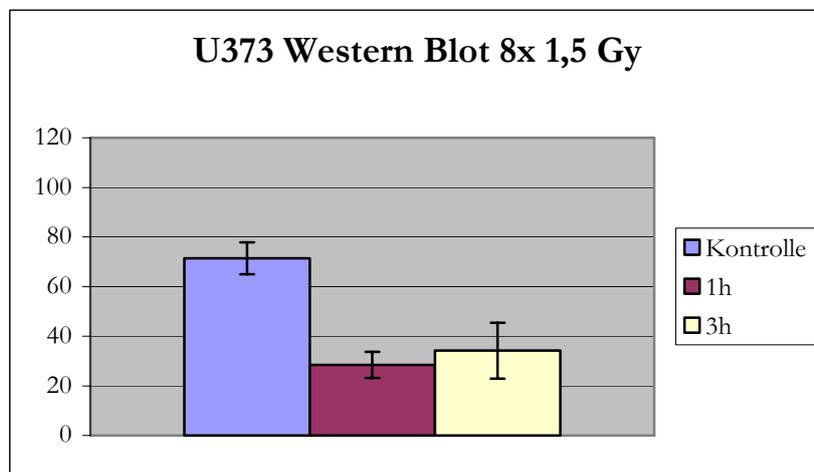
**Abbildung 42:** Western Blot der Zelllinie U373: 8x 1 Gy



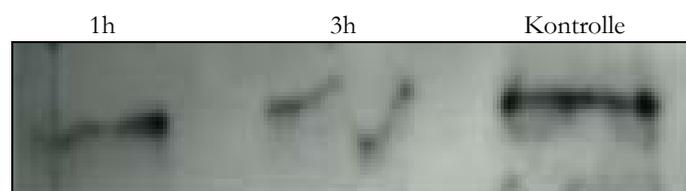
**Abbildung 43:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt wurde



**Abbildung 44:** Western Blot der Zelllinie U343: 8x 1,5 Gy



**Abbildung 45:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt wurde



**Abbildung 46:** Western Blot der Zelllinie U373: 8x 1,5 Gy

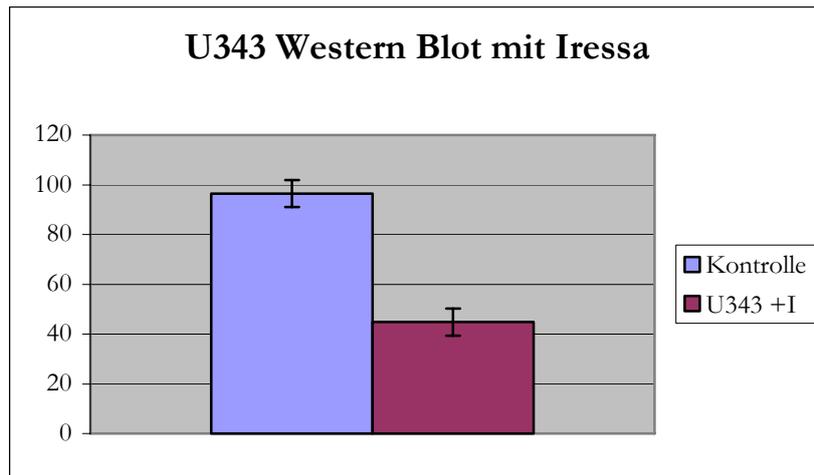
### 4.3.3. Der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verringert die Expression des EGF-Rezeptors auf Proteinebene bei den Gliomzelllinien U343 und U373

In diesem Versuchsansatz wurde die Auswirkung der Blockade des EGF-Rezeptors durch den Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ auf Proteinebene untersucht.

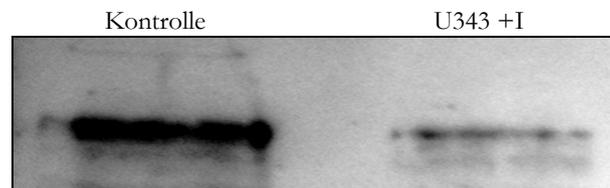
Es wurden für beide Zelllinien  $1 \times 10^6$  Zellen pro Versuch ausgesät und über 4 Tage mit der Testsubstanz „Iressa®“ in einer Konzentration von  $1 \mu\text{mol/l}$  inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Western Blot ermittelt.

In der Abbildung 47 ist das Ergebnis der Zelllinie U343 als Diagramm dargestellt und in der Abbildung 48 das entsprechende Western Blot Bild. Das Ergebnis der Zelllinie U373 ist in der Abbildung 49 als Diagramm und in Abbildung 50 in Form des Western Blot dargestellt. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler der Mittelwerte in jedem Diagramm eingetragen.

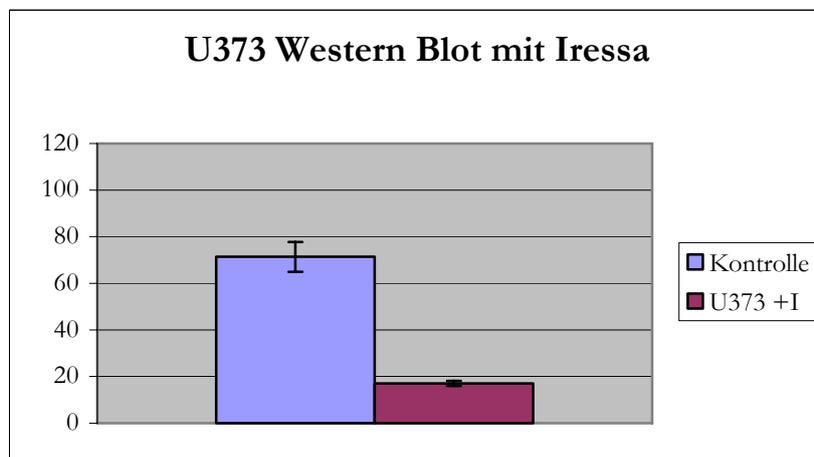
Die Blockade des EGF-Rezeptors durch den Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ bewirkt bei beiden Gliomzelllinien U343 und U373 eine Reduktion der Rezeptorexpression auf Proteinebene. Ausgehend von der Kontrolle ( $96,47 \pm 5,55$ ) bewirkt die Inkubation mit „Iressa®“ bei der Zelllinie U343 etwa eine Halbierung der EGFR-Expression auf einen Wert von  $44,85 \pm 5,44$ ). Die Zelllinie U373 zeigt die Reduktion der Rezeptorexpression noch stärker. Ausgehend von der Kontrolle ( $71,36 \pm 6,4$ ) wird die Expression etwa auf ein Viertel ( $17,01 \pm 1,13$ ) verringert.



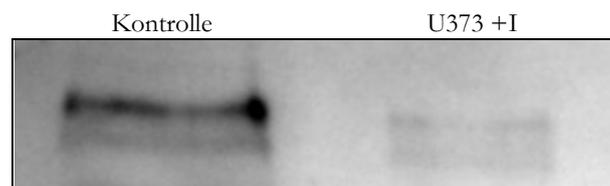
**Abbildung 47:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343; Kontrolle im Vergleich zu einer mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ behandelten Zellpopulation



**Abbildung 48:** Western Blot der Zelllinie U343 mit „Iressa®“



**Abbildung 49:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373; Kontrolle im Vergleich zu einer mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ behandelten Zellpopulation



**Abbildung 50:** Western Blot der Zelllinie U373 mit „Iressa®“

#### **4.3.4. Hyperfraktionierte Bestrahlung kombiniert mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ verändert die Proteinexpression des EGF-Rezeptors**

In diesem Versuchsansatz wurde die Wirkung einer kombinierten Behandlung, bestehend aus hyperfraktionierter Bestrahlung und der Applikation des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 „Iressa®“, auf die Proteinexpression des EGF-Rezeptors untersucht.

Es wurden von den verwendeten Zelllinien  $1 \times 10^6$  Zellen pro Versuch ausgesät und über 4 Tage hyperfraktioniert mit den Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy bestrahlt. Simultan wurde den Zellen vor jeder morgendlichen Bestrahlung „Iressa®“ in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  zugesetzt und 24 Stunden belassen. Nach der letzten Bestrahlung wurde „Iressa®“ entfernt. Die Expression des EGF-Rezeptors auf Proteinebene wurde 1 Stunde und 3 Stunden nach der letzten Bestrahlung mittels Western Blot ermittelt. Mit der unbehandelten Kontrollgruppe wurde in dem gleichen Zeitfenster verfahren.

In den Abbildungen 51 bis 62 sind die Ergebnisse der beiden Zelllinien jeweils als Diagramm und in Form der Western Blot Bilder dargestellt. In jedem Diagramm wird den simultan behandelten Zellen eine unbehandelte Kontrollgruppe zum Vergleich gegenübergestellt. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler der Mittelwerte im Diagramm eingetragen.

Bei der Gliomzelllinie U343 bewirkt die Einzeldosis von 0,5 Gy pro Fraktion kombiniert mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ eine Abnahme der Proteinexpression gegenüber der Kontrolle (96,47  $\pm$  5,44). Eine Stunde nach Bestrahlung liegt die Proteinexpression bei einem Wert von 66,12 ( $\pm$  5,03). Nach 3 Stunden steigt die EGFR-Expression auf einen Wert von 80,23 ( $\pm$  2,12) an, liegt allerdings immer noch unter dem Kontrollniveau. In Abbildung 51 sind die Ergebnisse als Diagramm dargestellt und in Abbildung 52 das entsprechende Western Blot Bild.

Die Zelllinie U373 zeigt bei der Kombinationsbehandlung mit der Einzeldosis von 0,5 Gy eine Abnahme der EGFR-Expression, die sich allerdings erst nach 3 Stunden manifestiert. Eine Stunde nach der letzten Bestrahlung liegt die Proteinexpression auf dem Niveau der Kontrolle (1 Stunde: 70,05  $\pm$  3,9; Kontrolle: 71,36  $\pm$  6,4). Nach 3 Stunden hat sich die Expression mit einem Wert von 39,88 ( $\pm$  3,9) deutlich verringert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 53 und 54 dargestellt.

Wie bereits bei der Dosis von 0,5 Gy bewirkt die Einzeldosis von 1 Gy in der Kombinationsbehandlung eine abnehmende EGFR-Expression bei der Zelllinie U343. Sowohl nach 1 als auch nach 3 Stunden hat sich die Proteinexpression bezogen auf die Kontrolle (96, 47

+/- 5,44) etwa halbiert (1 Stunde: 45,18 +/- 2,31; 3 Stunden: 36,71 +/- 2,84). In den Abbildungen 55 und 56 sind die Ergebnisse graphisch verdeutlicht.

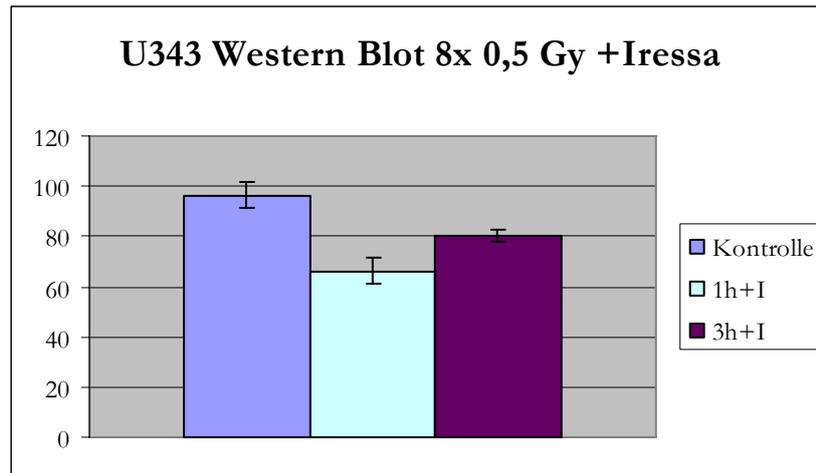
Die Zelllinie U373 zeigt bei der Dosis von 1 Gy pro Fraktion kombiniert mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ eine Abnahme der Proteinexpression nach 1 Stunde im Vergleich zu der Kontrolle (1 Stunde: 53,89 +/- 7,17; Kontrolle: 71,36 +/- 6,4). Nach 3 Stunden liegt die EGFR-Expression wieder auf dem Kontrollniveau (67,26 +/- 0,99). In Abbildung 57 sind die Ergebnisse als Diagramm und in Abbildung 58 in Form des Western Blot Bildes dargestellt.

Bei der Zelllinie U343 zeigt sich bei der Einzeldosis von 1,5 Gy kombiniert mit 1  $\mu\text{M}$  „Iressa®“ wieder eine Abnahme der EGFR-Expression. Sowohl 1 als auch 3 Stunden nach Bestrahlung liegt die Proteinexpression deutlich unter dem Niveau der Kontrolle (1 Stunde: 54,19; 3 Stunden: 62,12 +/- 10,77; Kontrolle: 96,47 +/- 5,44). In den Abbildungen 59 und 60 sind die Ergebnisse dargestellt.

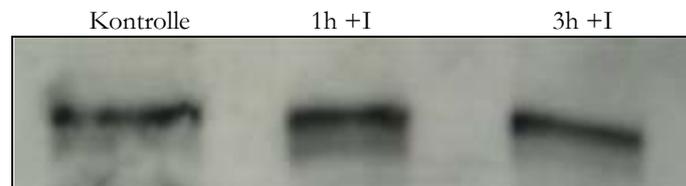
Bei der Zelllinie U373 bewirkt die Einzeldosis von 1,5 Gy in der Kombinationsbehandlung eine Reduktion der Rezeptorexpression. Im Vergleich zu der Kontrolle (76,36 +/- 6,4) hat sich die Expression nach 1 und 3 Stunden etwa halbiert (1 Stunde: 36,58 +/- 7,71; 3 Stunden: 27,98 +/- 5,31). In der Abbildung 61 sind die Ergebnisse als Diagramm und in Abbildung 62 in Form des Western Blot Bildes dargestellt.

Insgesamt bewirkt die Kombination aus hyperfraktionierter Bestrahlung und Blockade des EGF-Rezeptors mittels „Iressa®“ bei den Gliomzelllinien U343 und U373 eine Reduktion der EGFR-Expression auf Proteinebene. Bei der Zelllinie U343 ist die Proteinexpression sowohl 1 Stunde als auch 3 Stunden nach Bestrahlung signifikant unter dem Niveau der Kontrolle. Am deutlichsten erkennt man die Abnahme der Expression bei der Einzeldosis von 1 Gy pro Fraktion.

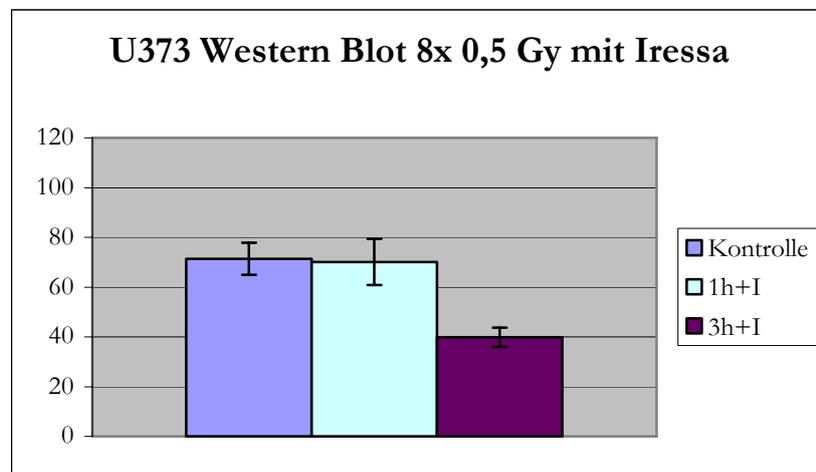
Die Zelllinie U373 reagiert weniger einheitlich auf diese Kombinationsbehandlung. Bei der Dosis von 0,5 Gy pro Fraktion zeigt sich die Expressionsverringerung erst nach 3 Stunden, bei 1 Gy pro Fraktion nur nach 1 Stunde. Nur bei der Einzeldosis von 1,5 Gy ist sowohl nach 1 Stunden als auch nach 3 Stunden die EGFR-Expression unter dem Kontrollniveau. Bei dieser Dosis ist der Effekt von „Iressa®“ auch am deutlichsten zu erkennen.



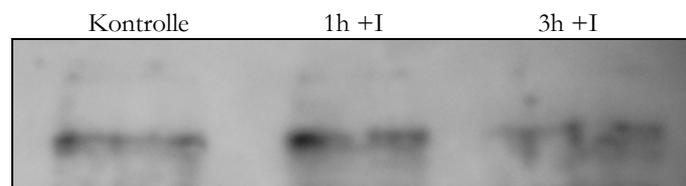
**Abbildung 51:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 0,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ inkubiert wurde



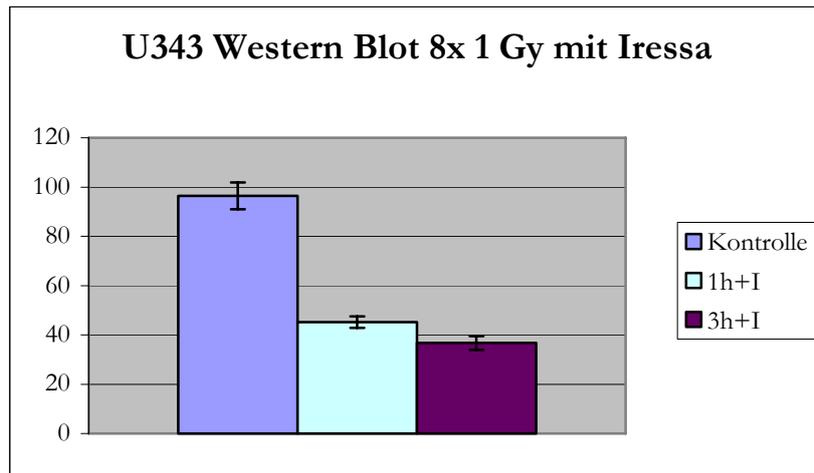
**Abbildung 52:** Western Blot der Zelllinie U343: 8x 0,5 Gy + „Iressa®“



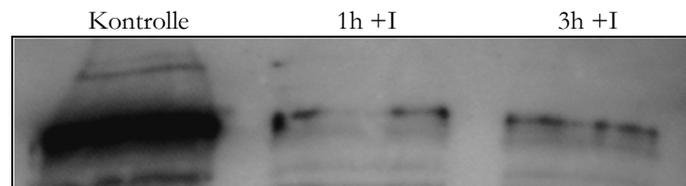
**Abbildung 53:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 0,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ inkubiert wurde



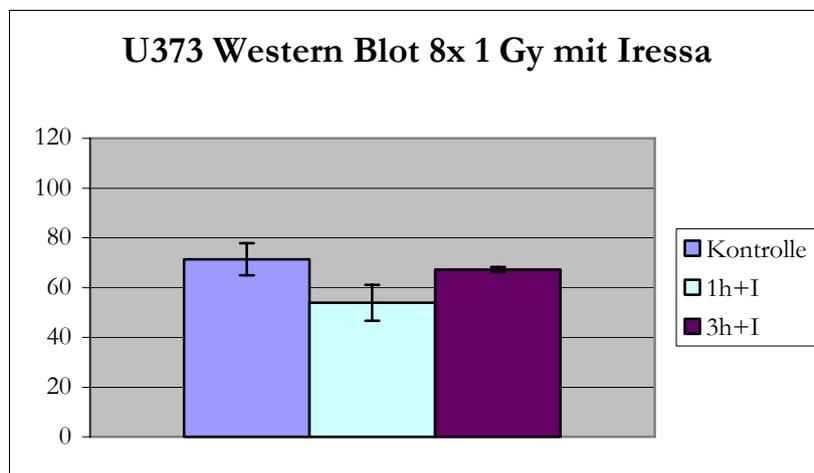
**Abbildung 54:** Western Blot der Zelllinie U373: 8x 0,5 Gy + „Iressa®“



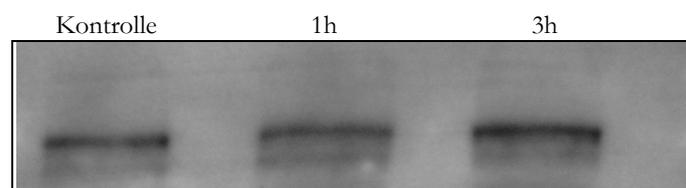
**Abbildung 55:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ inkubiert wurde



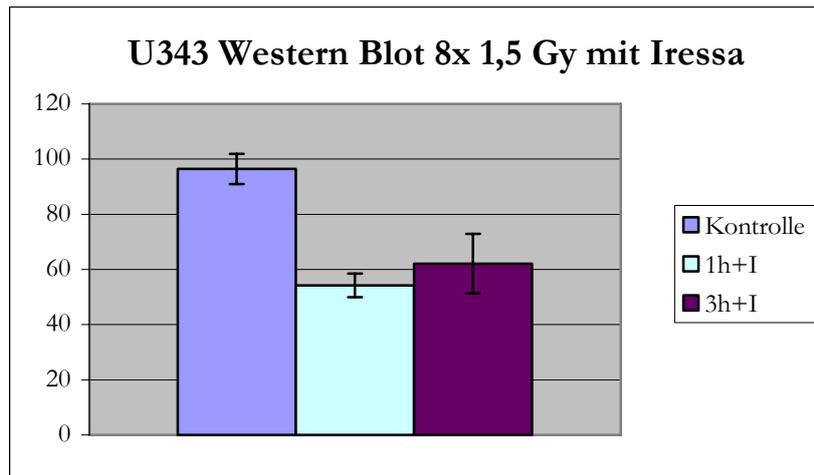
**Abbildung 56:** Western Blot der Zelllinie U343: 8x 1 Gy + „Iressa®“



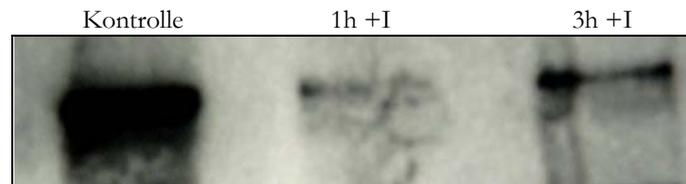
**Abbildung 57:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ inkubiert wurde



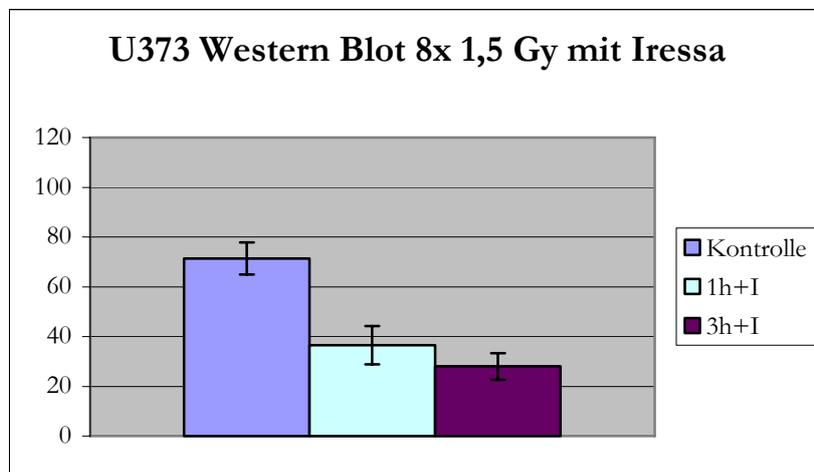
**Abbildung 58:** Western Blot der Zelllinie U373: 8x 1 Gy + „Iressa®“



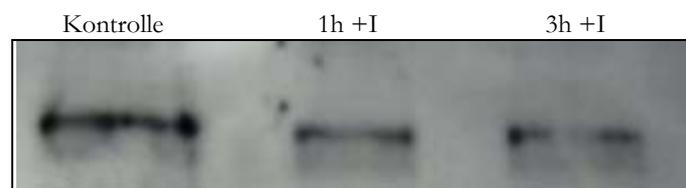
**Abbildung 59:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U343; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ inkubiert wurde



**Abbildung 60:** Western Blot der Zelllinie U343: 8x 1,5 Gy + „Iressa®“



**Abbildung 61:** Darstellung der densitometrischen Auswertung des Western Blot der Zelllinie U373; Kontrolle im Vergleich zu einer Zellpopulation, die mit 1,5 Gy hyperfraktioniert bestrahlt und mit 1  $\mu$ M „Iressa®“ inkubiert wurde



**Abbildung 62:** Western Blot der Zelllinie U373: 8x 1,5 Gy + „Iressa®“

## 5. DISKUSSION

### 5.1. High-grade Gliome und ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung ist seit Jahrzehnten ein fester Bestandteil in der Standardtherapie von high-grade Gliomen. Als vorherrschender Mechanismus der bestrahlungsinduzierten Zytotoxizität wird der postmitotische oder reproduktive Zelltod angesehen (RADFORD, 1986; STEEL et al., 1989; BEDFORD, 1991). In diesem Modell werden nicht oder falsch reparierte DNA-Doppelstrangbrüche als entscheidendes Ereignis betrachtet, welches zur Inaktivierung der Zellen während der Mitose führt. Beschädigte Zellen müssen dabei nicht direkt zugrunde gehen sondern können noch mehrere Zellzyklen durchlaufen, bevor die genetische Instabilität kritisch wird (SEYMOUR et al., 1986).

Neueren Erkenntnissen zufolge leistet die Apoptose einen wichtigen Beitrag für den bestrahlungsinduzierten Zelltod. Es hat sich dabei gezeigt, dass verschiedene Signaltransduktions-Pathways in der Vermittlung der Apoptose beteiligt sind. Welcher Pathway letztendlich zur Apoptose führt hängt von der Zelllinie, der Art des Reizes und der Beeinflussung durch andere apoptose-regulierende Faktoren ab. Obwohl Schäden in der DNA eine wichtige Rolle spielen, sind sie nicht alleine für die bestrahlungsinduzierte Apoptose verantwortlich (WATTERS, 1999; VERHEIJ et BARTELINK, 2000).

Die in Kapitel 4.1.2. beschriebenen Ergebnisse des WST-Assays zeigen die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Zellproliferation der verwendeten Gliomzelllinien U343 und U373. Beide Zelllinien reagierten auf die viertägige, hyperfraktionierte Bestrahlung mit den Einzeldosen von 0,5 Gy, 1 Gy und 1,5 Gy pro Fraktion mit einer Reduktion der Zellzahl gegenüber den Kontrollen, die über den gesamten Beobachtungszeitraum von 96 Stunden nach Bestrahlung anhielt. Während das Ausmaß der reduzierten Proliferation bei der Zelllinie U373 mit der Höhe der applizierten Strahlendosis korrelierte, zeigte die Zelllinie U343 diesen Effekt nur bis zu der Dosis von 1 Gy. Die Steigerung der Dosis auf 1,5 Gy pro Fraktion brachte keine Vorteile bezüglich der Zellzahlreduktion. Die insgesamt schneller wachsende Zelllinie U373 scheint damit auf ionisierende Strahlung, insbesondere auf höhere Dosen, empfindlicher zu reagieren als die Zelllinie U343. Auch wenn bei beiden Zelllinien die Proliferation durch ionisierende Strahlung zwar bei jeder Dosis verringert wurde, wuchsen die Zellen unter hyperfraktionierter Bestrahlung weiter.

Durch diesen Versuch kann man allerdings keine Aussage darüber treffen, aus welchem Grund die Zellzahl durch Bestrahlung reduziert wurde. Die Zellzahlreduktion ist lediglich als Resultat komplexer zellulärer Prozesse zu werten, die durch ionisierende Strahlung ausgelöst werden. Durch

Bestrahlung beschädigte Zellen können in der G2-M-Phase des Zellzyklus verharren, vermutlich in dem Versuch die geschädigte DNA zu reparieren (ILIAKIS, 1997). Neben dem Zellzyklusarrest zählen sowohl Zelltod durch Apoptose oder reproduktive Mechanismen als auch Reparaturprozesse und Proliferation zu den Folgen von ionisierender Strahlung (SCHMIDT-ULLRICH et al., 2000).

Die bestrahlungsinduzierte Steigerung der Proliferation scheint dabei eine entscheidende Rolle in der verminderten Strahlensensibilität von Tumoren zu spielen.

In verschiedenen Arbeitsgruppen wurde die Bedeutung des EGF-Rezeptors und dessen Aktivierung für die gesteigerte Proliferation durch ionisierende Strahlung verdeutlicht. Diese Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Bestrahlung von menschlichen Karzinomzelllinien die Aktivierung des EGF-Rezeptors induziert und dadurch wiederum zu einer Aktivierung des MAP-Kinase Pathways führt (SCHMIDT-ULLRICH et al., 1997; CARTER et al., 1998; KAVANAGH et al., 1998). Die MAP-Kinase ihrerseits ist bedeutend für die Aktivierung der p90 S6 Kinase (DE CESARE et al., 1998) und der Induktion von Transkriptionsfaktoren zur Förderung der Proteinsynthese und Mitogenese (DAVIS, 1995; REARDON et al., 1999; SCHMIDT-ULLRICH et al., 2000). Zusätzlich zu dem MAP-Kinase Pathway kann ionisierende Strahlung den phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-Akt Pathway aktivieren, der zu der Stimulation der p70 S6 Kinase führt (SARKARIA et al., 1998). Sowohl p90 S6 Kinase als auch p70 S6 Kinase sind unmittelbar an Transkriptionsprozessen zur Förderung der Zellproliferation beteiligt (BOTTAZZI et al., 1999; BRUNET et al., 1999; TAKUWA et al., 1999; TREINIES et al., 1999).

Dent et al. konnten zeigen, dass die Bestrahlung von Karzinomzelllinien an zwei Zeitpunkten zu einer Aktivierung des EGF-Rezeptors führt. An dem ersten Zeitpunkt kommt es durch ionisierende Strahlung unmittelbar zur Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase. Dieser ersten Aktivierung folgt eine zweite, die durch die bestrahlungsinduzierte Freisetzung von TGF $\alpha$  getriggert wird (DENT et al., 1999).

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors scheint über den MAP-Kinase Pathway eine zytoprotektive Wirkung auf Tumorzellen zu haben, die mit einer verstärkten Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung und zytotoxischen Substanzen einhergeht, obwohl die genauen intrazellulären Mechanismen bislang nicht vollständig geklärt sind (BALABAN et al., 1996; GOKHALE et al., 1997; GOLDKORN et al., 1997; SCHMIDT-ULLRICH et al., 1997; CONTESSA et al., 1999; HAGAN et al., 2000). Ionisierende Strahlung scheint damit über die Aktivierung des EGF-Rezeptors und dessen Signalpathways selbstlimitierend auf die eigene Zytotoxizität zu wirken.

## 5.2. High-grade Gliome und der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“

Mitte der siebziger Jahre gelang es Kohler und Milstein erstmals mit Hilfe eines Hybridoms monoklonale Antikörper (MAbs) mit einer vorab definierten Spezifität zu produzieren (KÖHLER et MILSTEIN, 1975). Dieser Fortschritt war Anfang der achtziger Jahre die Ausgangsbasis von J. Mendelsohn, D. Sato und T. Kawamoto für die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern, welche die Bindung von Wachstumsfaktoren an den EGF-Rezeptor blockieren sollten, um die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase und damit auch die Zellproliferation zu hemmen. In den Jahren 1983 und 1984 gelang es zwei monoklonale Maus-Antikörper (MAb 225 und MAb 528) herzustellen, die sowohl in Zellkultur als auch in Xenograft-Tumoren die Proliferation von EGFR-exprimierenden Zellen hemmen konnten (KAWAMOTO et al., 1983; SATO et al., 1983; GILL et al., 1984; MASUI et al., 1984). Bis heute wurde eine Reihe verschiedener monoklonaler Antikörper entwickelt. Darunter auch der monoklonale Mensch-Maus-Chimären Antikörper C225 Cetuximab, der sowohl in vitro als auch in vivo Versuchen seine antitumorale Wirksamkeit auf EGFR-exprimierende Tumorzellen unter Beweis stellen konnte (GOLDSTEIN et al., 1995; CIARDIELLO et al., 1996; PREWETT et al., 1996; PREWETT et al., 1998; BASELGA, 2001; ELLER et al., 2002). Neben monoklonalen Antikörpern erlangten vor allem niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren wie ZD1839 „Iressa®“ Bedeutung, die durch spezifische Hemmung der Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors die Signalübertragung über den Rezeptor verhindern (CIARDIELLO, 2000; ARTEAGA et JOHNSON, 2001; BLACKLEDGE et AVERBUCH, 2004). In präklinischen Studien hat sich die Wirksamkeit des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 „Iressa®“ in verschiedenen kultivierten Tumorzelllinien und menschlichen Xenograft-Tumoren sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Chemo- und Radiotherapie gezeigt (CIARDIELLO et al., 2000; CIARDIELLO et al., 2001; SIROTNAK et al., 2001; WILLIAMS et al., 2002).

Die in Kapitel 4.1.3. beschriebenen Ergebnisse des WST-Assays zeigen die Wirkung der viertägigen Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ auf die Zellproliferation der verwendeten Gliomzelllinien U343 und U373. Da sich bei verschiedenen Karzinomzelllinien ein antiproliferativer Effekt von „Iressa®“ dosisabhängig für Konzentrationen zwischen 0,1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zeigte (CIARDIELLO et al., 2000), wurde in dieser Arbeit eine „Iressa®“-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gewählt. Beide Zelllinien reagierten auf die viertägige Inkubation mit einer Reduktion der Zellzahl gegenüber den Kontrollen. Während bei der Zelllinie U343 die reduzierte Proliferation über den gesamten Beobachtungszeitraum von 96 Stunden nach Inkubationsende anhielt, konnte man bei der Zelllinie U373 diese nachhaltige Wachstumsreduktion nur bis zu 72 Stunden nach Inkubation beobachten.

Aufgrund des Versuchsaufbaus lassen sich keine präzisen Aussagen über den Grund der Zellzahlreduktion treffen. Die Proliferationshemmung kann sowohl Ausdruck eines Zellzyklusarrestes als auch einer gesteigerten Apoptoserate sein. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass es in Karzinomzelllinien nach Applikation von „Iressa®“ zu einer Verschiebung des Zellzyklus kommt, die mit einer Reduktion der Zellen in der S-Phase und einem Anstieg der Zellen in der G1- oder G0-Phase einhergeht (HUANG et al., 2002; RABEN et al., 2002). Der Zellzyklusarrest in der G1-Phase wird nach Inkubation mit „Iressa®“ durch Akkumulation von p27<sup>KIP1</sup>, einem Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinase 2, induziert (BUSSE et al., 2000; DI GENNARO et al., 2003; SHINTANI et al., 2004). Anhand von menschlichen Mamma-, Kolon- und Ovarialarzinomzelllinien konnten Ciardiello et al. belegen, dass die Wachstumshemmung durch „Iressa®“ hauptsächlich in einem zytostatischen Effekt begründet ist und die Apoptoserate erst bei höherer „Iressa®“-Dosierung (0,1 µM bis 1 µM) um das zwei- bis vierfache ansteigt (CIARDIELLO et al., 2000). In anderen in vitro Studien an Mamma- und Lungenkarzinomzellen wurde die Proliferationsreduktion nach Applikation von „Iressa®“ sowohl auf zytostatische Effekte als auch auf Apoptose zurückgeführt (ANIDO et al., 2003; CAMPIGLIO et al., 2004; CHANG et al., 2004). Die genannten Studienergebnisse verdeutlichen, dass die Blockade des EGF-Rezeptors und den nachfolgenden Signalkaskaden einen Eingriff in ein komplexes Netzwerk darstellt und auf verschiedene Arten die Zellproliferation und das Zellüberleben beeinflussen kann. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die Wachstumshemmung der Gliomzelllinien U343 und U373 durch die Inkubation mit „Iressa®“ sowohl in einem Zellzyklusarrest und bei dafür sensiblen Zellen auch in einer Steigerung der Apoptose begründet liegt.

Die durch Blockade des EGF-Rezeptors verursachte Proliferationshemmung der Gliomzelllinien U343 und U373 verdeutlicht damit in dieser Arbeit die Schlüsselrolle dieses Rezeptors in der Kontrolle des Tumorwachstums. Die hier beschriebene Wachstumshemmung der verwendeten Gliomzelllinien wurde auch in zahlreichen Studien an verschiedenen epithelialen, EGFR-exprimierenden Tumorzelllinien und Xenograft-Tumoren beobachtet (CIARDIELLO et al., 2000; ANDERSON et al., 2002; WAKELING et al., 2002; VICENTINI et al., 2003). Obwohl in dieser Arbeit die 1 µM Inkubation mit „Iressa®“ bei der Gliomzelllinie U343 zu einer Reduktion der Proliferation führte, konnten Sundberg et al. in ihrer Studie auf diese Zelllinie keinen antiproliferativen Effekt durch „Iressa®“ feststellen (SUNDBERG et al., 2003). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Gliomzelllinie U343 könnte die Länge der Inkubation mit „Iressa®“ sein. Während in dieser Arbeit die Zellen 96 Stunden mit dem Tyrosinkinaseinhibitor inkubiert wurden, dauerte die Inkubation bei der Sundberg-Gruppe nur 48 Stunden.

Die antiproliferative Wirkung von „Iressa®“ hielt in dieser Arbeit bei beiden Zelllinien über den Inkubationszeitraum hinaus an. Die Zelllinie U373 zeigte bis mindestens 48 Stunden nach Entzug des Tyrosinkinaseinhibitors eine signifikant niedrigere Wachstumsrate als die Kontrolle. Bei der Zelllinie U343 hielt die Proliferationshemmung sogar über den gesamten Beobachtungszeitraum von 96 Stunden nach Inkubationsende an. In anderen Zellkultur-Studien wurde ebenfalls eine nachhaltige Wachstumshemmung beobachtet, die bis mindestens 24 Stunden nach Entfernung von „Iressa®“ aus dem Kulturmedium nachweisbar war (RABEN et al., 2002). Wakeling et al. konnten in so genannten Auswaschversuchen sogar zeigen, dass die Stimulation mit EGF bis mindestens 24 Stunden nach Beendigung der Inkubation mit „Iressa®“ nicht zu einer Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors führt (WAKELING et al., 2002). Dieser anhaltende antiproliferative Effekt wird in neueren Studien damit erklärt, dass die Applikation von Tyrosinkinaseinhibitoren vom Quinazolin-Typ zur Bildung von inaktiven Rezeptor-Ligand-Komplexen führt (LICHTNER et al., 2001). Obwohl die Mechanismen dieser anhaltenden Proliferationshemmung bislang nicht vollständig aufgeklärt sind, scheint die Applikation von Tyrosinkinaseinhibitoren wie „Iressa®“ Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten der Zelle zu haben, die über die reversible Blockade des EGF-Rezeptors hinaus andauern. Die Untersuchung der Expression des EGF-Rezeptors nach Inkubation mit „Iressa®“ könnte ein weiterer Schritt für das Verständnis der intrazellulären Mechanismen sein, die durch diese Rezeptorblockade ausgelöst werden.

### **5.3. High-grade Gliome und die Kombination aus ionisierender Strahlung und dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“**

Die Entdeckung, dass ionisierende Strahlung die Aktivierung des EGF-Rezeptors induzieren und damit über den MAP-Kinase Pathway zu einer gesteigerten Proliferation führen kann (SCHMIDT-ULLRICH et al., 1997; DENT et al., 1999; SCHMIDT-ULLRICH et al., 1999), hat viele Arbeitsgruppen dazu veranlasst, Bestrahlung mit einer EGF-Rezeptorblockade zu kombinieren. Um die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und damit auch die Signalübertragung zu hemmen, bieten sich sowohl monoklonale Anti-EGFR-Antikörper als auch Tyrosinkinaseinhibitoren an. Mehrere in vitro Studien haben gezeigt, dass die Kombination aus dem monoklonalen Antikörper C225 Cetuximab und Bestrahlung die Strahlensensibilität in verschiedenen epithelialen Tumoren wie Kopf-Hals-Tumoren, Kolon- Ovarial- und Plattenepithelkarzinomen erhöht (HUANG et al., 1999; SALEH et al., 1999; BIANCO et al., 2000). Die strahlensensibilisierende Wirkung von Cetuximab wurde auch in zahlreichen in vivo Studien an verschiedenen Xenograft-Tumoren beobachtet (BIANCO et al., 2000; HUANG et al., 2000; MILAS et al., 2000; NASU et al., 2001; BUCHSBAUM et al., 2002). Eine additive

oder synergistische Wirkung zu ionisierender Strahlung konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an verschiedenen Karzinomzelllinien und Xenograft-Tumoren für den Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ festgestellt werden (WILLIAMS et al., 2001; BIANCO et al., 2002; RABEN et al., 2002; SHE et al., 2003; SOLOMON et al., 2003).

Die in Kapitel 4.1.4. beschriebenen Ergebnisse des WST-Assays zeigen die Wirkung der Kombinationsbehandlung, bestehend aus hyperfraktionierter Bestrahlung und simultaner Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“, auf die Zellproliferation der Gliomzelllinien U343 und U373. Beide Zelllinien reagierten auf die viertägige Kombinationsbehandlung mit einer Reduktion der Zellzahl gegenüber der Bestrahlungsgruppe, deren Ausmaß allerdings von der applizierten Strahlendosis abhängig war. Eine Verstärkung der Bestrahlungseffektivität durch „Iressa®“ zeigten beide Zelllinien am deutlichsten bei der kleinsten Dosis von 0,5 Gy pro Fraktion. Bei den höheren Einzeldosen hatte „Iressa®“ auf die Zelllinie U343 einen geringeren strahlensensibilisierenden Effekt. Die Zelllinie U373 zeigte bei der Dosis von 1 Gy auch nur eine geringe synergistische Wirkung durch „Iressa®“, während bei der höheren Dosis von 1,5 Gy ein deutlicher Synergieeffekt zu beobachten war.

Die strahlensensibilisierende Wirkung einer Blockade des EGF-Rezeptors ist in der Bedeutung dieses Rezeptors und seiner Signalkaskaden in der Entstehung und Entwicklung von malignen Tumoren begründet und wird vielfältig in der Literatur diskutiert.

Die Blockade des EGF-Rezeptors durch monoklonale Antikörper oder Tyrosinkinaseinhibitoren kann einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase erzeugen (PENG et al., 1996; WU et al., 1996; BUSSE et al., 2000), Apoptose induzieren (MANDAL et al., 1998; LIU et al., 2000) und die Synthese von Wachstumsfaktoren und Zytokinen verhindern, welche die Angiogenese stimulieren (PETTIT et al., 1997; PEROTTE et al., 1999; BRUNS et al., 2000; CIARDIELLO et al., 2001).

In vielen Studien wird die strahlensensibilisierende Wirkung von „Iressa®“ mit einer Störung des Zellzyklus erklärt, die zu einer Reduktion der Zellen in der S-Phase und einem Anstieg in die radiosensiblen G0-G1- oder G2-M-Phasen führt (BIANCO et al., 2002; HUANG et al., 2002; SHINTANI et al., 2003). Einige Arbeitsgruppen stellten fest, dass eine EGFR-Blockade durch „Iressa®“ oder Cetuximab die bestrahlungsinduzierte Apoptose fördert (WU et al., 1995; HUANG et al., 1999; BIANCO et al., 2002; HUANG et al., 2002). Des Weiteren wird durch die Kombination aus Bestrahlung und Blockade des EGF-Rezeptors die Expression von Wachstumsfaktoren wie TGF $\alpha$  (transforming growth factor alpha), VEGF (vascular endothelial growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor) und Zytokinen wie Interleukin 8 gehemmt, die eine essentielle Bedeutung für die Angiogenese haben (HUANG et al., 2000; BIANCO et al., 2002; HUANG et al., 2002). Eine weitere Erklärung für die Verstärkung der

Bestrahlungseffektivität durch EGFR-Blockade wird in der Reparaturhemmung von bestrahlungsinduzierten DNA-Schäden gesehen (HUANG et HARARI, 2000; SHINTANI et al., 2003).

Die dargestellten Studienergebnisse verdeutlichen, dass die Blockade des EGF-Rezeptors die Strahlensensibilität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei verschiedenen Tumoren erhöht. Die genauen Mechanismen sind bislang nicht vollständig geklärt und hängen wahrscheinlich von vielen Faktoren wie z.B. der Tumorart und der applizierten Strahlendosis ab.

Eine strahlensensibilisierende Wirkung durch „Iressa®“ wurde auch bei der Gliomzelllinie U251 beobachtet (STEA et al., 2003).

Die verwendeten Gliomzelllinien U343 und U373 zeigten die strahlensensibilisierende Wirkung durch „Iressa®“ besonders bei der kleinen Dosis von 0,5 Gy pro Fraktion. Mit Ausnahme der Dosis von 1,5 Gy bei der Zelllinie U373 war der Synergieeffekt bei den höheren Bestrahlungsdosen deutlich geringer. Eine Erklärung für diesen dosisabhängigen Synergieeffekt von „Iressa®“ kann aufgrund des Versuchsaufbaus nicht gegeben werden. Man kann allerdings die Vermutung anstellen, dass die bestrahlungsinduzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors unter anderem von der Zelllinie und der applizierten Strahlendosis beeinflusst wird. In den verwendeten Gliomzelllinien scheint die bestrahlungsinduzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors besonders bei kleinen Bestrahlungsdosen Bedeutung für die erhöhte Strahlenresistenz zu haben. Demnach fällt der Synergieeffekt von Bestrahlung und Rezeptorblockade mittels „Iressa®“ bei diesen kleinen Strahlendosen am deutlichsten aus.

Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse, dass durch „Iressa®“ die Strahlensensibilität der verwendeten Gliomzelllinien besonders bei kleinen Bestrahlungsdosen erhöht wird, auch wenn der dosisabhängige Effekt nicht vollständig erklärt werden kann.

#### 5.4. Die Expression des EGF-Rezeptors unter ionisierender Strahlung

Der EGF-Rezeptor wird sowohl mit der Entwicklung als auch der Progression der meisten epithelialen Tumoren in Verbindung gebracht (SALOMON et al., 1995). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors in Tumoren führt zu einer Stimulation von Proliferation, Angiogenese und Metastasierung sowie einer Reduktion der Apoptoserate (HUANG et HARARI, 1999; WOODBURN, 1999). Zudem liegt in einer Vielzahl von soliden Tumoren eine Überexpression des EGF-Rezeptors vor, die mit einem fortgeschrittenem Krankheitsstadium und einer schlechteren Prognose verbunden ist (SALOMON et al., 1995). Diese Überexpression wird mit einer Resistenz gegenüber Hormontherapie, zytotoxischen Substanzen und Strahlentherapie assoziiert (WOSIKOWSKI et al., 1997; AKIMOTO et al., 1999; WOODBURN, 1999). Die geringe Sensibilität oder Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung wurde in mehreren präklinischen Studien mit der Rezeptor-Überexpression verbunden (HARARI et HUANG, 2001). Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls bei high-grade Gliomen gefunden (BARKER et al., 2001; CHAKRAVARTI et al., 2004).

Die Bedeutung des EGF-Rezeptors in der Resistenzentwicklung von verschiedenen Tumoren gegenüber ionisierender Strahlung führt zu der Frage, welchen Einfluss ionisierende Strahlung auf die Expression des Rezeptors selbst hat.

Die in den Kapiteln 4.2.3. und 4.3.2. beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss hyperfraktionierter Bestrahlung auf die Expression des EGF-Rezeptors der Gliomzelllinien U343 und U373. Die Expression wurde sowohl mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene als auch mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht. Beide Zelllinien zeigten 1 und 3 Stunden nach dem Bestrahlungsreiz eine Reduktion der EGFR-Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen. Die Ergebnisse der RT-PCR waren weniger einheitlich. Die Zelllinie U343 reagierte auf jede Bestrahlungsdosis nach 1 Stunde mit einem Anstieg der mRNA-Expression für EGFR, die nach 3 oder 4 Stunden meist wieder auf das Kontrollniveau abfiel. Bei der Zelllinie U373 kam es bei der Dosis von 0,5 Gy nach 1 Stunde tendenziell zu einem Abfall der mRNA-Expression, die erst nach 4 Stunden wieder auf das Kontrollniveau anstieg. Bei den höheren Dosen waren die Ergebnisse mit denen der Zelllinie U343 vergleichbar. Eine Stunde nach Bestrahlung stieg die mRNA-Expression an und fiel nach 3 oder 4 Stunden wieder ungefähr auf das Niveau der Kontrolle ab.

Die Überexpression des EGF-Rezeptors in Tumoren beruht auf verschiedenen Mechanismen. Einer dieser Mechanismen ist die autokrine Stimulation des EGF-Rezeptors durch Überproduktion der Wachstumsfaktoren EGF und TGF $\alpha$  (SPORN et TODARO, 1980; SPORN et ROBERTS, 1985). Die Co-Expression dieser Wachstumsfaktoren und des Rezeptors selbst ist charakteristisch

für die autokrine Wachstumsregulierung. Dieser autokrine „loop“, bestehend aus EGF, TGF $\alpha$  und dem EGF-Rezeptor, wurde in einer Reihe von Karzinomen und Karzinomzelllinien gefunden, in denen er die Proliferation der malignen Zellen fördert (MORISHIGE et al., 1991; MOROCZ et al., 1991; CHING et al., 1993; GLYNNE-JONES et al., 1996; TANG et al., 1997; NARITA et al., 2001).

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch TGF $\alpha$  spielt auch in der Bestrahlung von malignen Tumoren eine wichtige Rolle. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten an menschlichen Plattenepithelkarzinomzelllinien zeigen, dass Bestrahlung über die Aktivierung des EGF-Rezeptors den MAP-Kinase Pathway stimuliert (SCHMIDT-ULLRICH et al., 1997; CARTER et al., 1998; KAVANAGH et al., 1998). Kurze Zeit darauf beobachteten Dent et al., dass dieser ersten bestrahlungsinduzierten Aktivierung des EGF-Rezeptors eine zweite Rezeptoraktivierung folgt. Während die erste Aktivierung direkt durch Bestrahlung innerhalb von 10 Minuten über eine Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors ausgelöst wird, erfolgt die zweite nach 90 bis 240 Minuten durch bestrahlungsinduzierte Freisetzung von TGF $\alpha$  (DENT et al., 1999).

Nach Aktivierung des EGF-Rezeptors und seiner Signalkaskaden wird der Rezeptor-Ligand-Komplex durch Endocytose internalisiert (CHEN et al., 1989). Abhängig von dem gebundenen Liganden kann der Rezeptor durch Recycling wieder der Zelloberfläche zugeführt oder abgebaut werden. Die Bindung des Liganden TGF $\alpha$  führt dabei zu einem Recycling des EGF-Rezeptors (LENFERINK et al., 1998; WATERMAN et al., 1998).

Die Gliomzelllinien U343 und U373 zeigten eine Reduktion der EGFR-Proteinexpression 60 und 180 Minuten nach der letzten Bestrahlung, die mit der bestrahlungsinduzierten Aktivierung der Rezeptoren erklärt werden kann. Nach der ersten Aktivierung wurden die EGF-Rezeptoren internalisiert und damit weniger stark auf der Zelloberfläche exprimiert. Die reduzierte Proteinexpression nach 60 Minuten entspricht damit einem Zustand nach erfolgter Aktivierung, in dem der Ausgangszustand der Expression noch nicht vollständig wieder erreicht ist. Die verringerte Expression nach 180 Minuten lässt sich als Resultat der zweiten, TGF $\alpha$ -getriggerten Aktivierung der EGF-Rezeptoren und folgender Internalisierung interpretieren. Die stets höhere Proteinexpression nach 180 Minuten im Vergleich zu 60 Minuten kann darauf zurückgeführt werden, dass die Aktivierung durch TGF $\alpha$  das Recycling der EGF-Rezeptoren bewirkt und die Rezeptoren damit schneller wieder der Zelloberfläche zugeführt werden.

Die Ergebnisse der RT-PCR verdeutlichen, dass ionisierende Strahlung und damit verbunden auch die Änderungen in der Proteinexpression Einfluss auf die mRNA-Expression des EGF-Rezeptors haben. Man kann vermuten, dass die mRNA- und die Proteinexpression sich gegenseitig

beeinflussen und durch weitere, eventuell übergeordnete Regulationsmechanismen kontrolliert werden.

Bis auf eine Ausnahme zeigten die verwendeten Gliomzelllinien auf die hyperfraktionierte Bestrahlung eine Zunahme der mRNA-Expression nach 60 Minuten. In Mammakarzinomzellen und epidermalen Keratinozyten wurde ebenfalls festgestellt, dass ionisierende Strahlung zu einer gesteigerten mRNA-Expression des EGF-Rezeptors führt (PETER et al., 1993; SCHMIDT-ULLRICH et al., 1994). In diesen Arbeiten wird die Expressionserhöhung allerdings über einen längeren Zeitraum beobachtet und ist auch mit einer gesteigerten Proteinexpression verbunden.

Eine Erklärung für die Abnahme der mRNA-Expression nach Bestrahlung mit der Dosis von 0,5 Gy pro Fraktion bei der Zelllinie U373 kann momentan nicht gegeben werden.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse jedoch, dass die Expression des EGF-Rezeptors durch verschiedene und komplexe Regulationsmechanismen gesteuert werden muss, die allerdings bislang nicht vollständig bekannt sind und auch zelltyp-spezifisch sein können.

### **5.5. Die Expression des EGF-Rezeptors unter Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“**

Die antiproliferative Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 „Iressa®“ wurde bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen (CIARDIELLO et al., 2000; NARUSE et al., 2002; WAKELING et al., 2002; VICENTINI et al., 2003). Aus diesem Grund ist es interessant, welchen Einfluss die Blockade des EGF-Rezeptors mittels „Iressa®“ auf die Expression des Rezeptors selbst hat.

Die in den Kapiteln 4.2.4. und 4.3.3. beschriebenen Ergebnisse zeigen die Wirkung einer viertägigen Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ auf die Expression des EGF-Rezeptors der Gliomzelllinien U343 und U373. Die Expression wurde sowohl mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene als auch mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht. Beide Zelllinien reagierten auf die „Iressa®“-Inkubation mit einer Reduktion der Proteinexpression des EGF-Rezeptors im Vergleich zu den Kontrollen. Die Zelllinie U343, die EGFR stärker exprimiert, verringerte durch „Iressa®“ die Proteinexpression auf die Hälfte, die Zelllinie U373 auf ein Viertel verglichen mit den Kontrollen. Während die Ergebnisse der beiden Gliomzelllinien auf Proteinebene vergleichbar waren, hatte die Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor unterschiedliche Effekte auf die mRNA-Expression. Die Zelllinie U343 reagierte, entsprechend dem Ergebnis auf Proteinebene, mit einer Reduktion der mRNA-Expression für den EGF-Rezeptor. Im Gegensatz dazu bewirkte die Inkubation mit „Iressa®“ bei der Zelllinie U373 einen

Anstieg der mRNA-Expression. Auffällig ist, dass sich die mRNA-Expression beider Zelllinien durch „Iressa®“ annäherte, obwohl die Kontrolle der Zelllinie U343 eine 7,4-fache höhere Expression zeigte.

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Blockade des EGF-Rezeptors dessen Expression sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene beeinflusst. Daraus kann man schließen, dass ein intakter EGF-Rezeptor über die Aktivierung seiner Tyrosinkinase und der nachfolgenden Signalkaskaden an der Regulation seiner eigenen Expression beteiligt ist. Die Diskrepanz zwischen der Protein- und mRNA-Expression bei der Zelllinie U373 zeigt, dass die EGFR-Expression noch weiteren Regulationssystemen unterliegen muss, welche die Bildung der Rezeptoren aus der vorhandenen mRNA kontrollieren.

Die autokrine Stimulation des EGF-Rezeptors durch Überproduktion der Liganden EGF und TGF $\alpha$  führt nicht nur zu einer gesteigerten Proliferation der malignen Zellen sondern nimmt auch Einfluss auf die Expression des Rezeptors (MCCULLOCH et al., 1998; SETH et al., 1999). In mehreren Studien wurde belegt, dass die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF die Menge an EGF-Rezeptor mRNA steigert (CLARK et al., 1985; EARP et al., 1986; KUDLOW et al., 1986; FERNANDEZ-POL et al., 1987), diese Steigerung aber nicht auf eine erhöhte Gentranskription zurückzuführen ist (KUDLOW et al., 1986). Verschiedene Arbeiten unterstützen die These, dass die Regulation der EGFR-Expression nicht über die Transkription sondern posttranskriptionell gesteuert wird. Der EGF-induzierte mRNA-Anstieg für den EGF-Rezeptor wird sowohl in einer Plattenepithelkarzinom- als auch einer Mammakarzinomzelllinie durch gesteigerte Stabilität der vorhandenen mRNA erreicht (JINNO et al., 1988; FERNANDEZ-POL et al., 1989). Die Zugabe von Schilddrüsenhormonen zu der A431 Plattenepithelkarzinomzelllinie reduziert dagegen die Stabilität der EGFR-mRNA (KESAVAN et al., 1991). Neben dem Wachstumsfaktor EGF beeinflusst auch der Wachstumsfaktor TGF $\alpha$  die Expression des EGF-Rezeptors. Sowohl in einer Mammakarzinom- als auch einer Nierenkarzinomzelllinie konnte nachgewiesen werden, dass Stimulation mit TGF $\alpha$  ebenfalls zu einem Anstieg der mRNA für den EGF-Rezeptor führt (FERNANDEZ-POL et al., 1989; ATLAS et al., 1992).

Die molekularen Mechanismen der Expressionsregulation des EGF-Rezeptors sind auch bis heute nicht vollständig aufgeklärt und immer noch Gegenstand zahlreicher Forschungen. Seth et al. untersuchten den Einfluss von EGF und TGF $\alpha$  auf die Regulation der EGFR-Expression in verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass beide Wachstumsfaktoren über unterschiedliche Mechanismen die Expression des EGF-Rezeptors hoch regulieren. Beide Liganden erhöhen in unterschiedlichem Ausmaß sowohl die Stabilität als auch die Transkription der EGFR-mRNA. Während der Haupteffekt von TGF $\alpha$  in der

posttranskriptionellen Stabilitätssteigerung besteht, erhöht EGF vornehmlich die Transkription (SETH et al., 1999). Die Wachstumsfaktoren EGF und TGF $\alpha$  beeinflussen aber nicht nur die Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene sondern auch auf Proteinebene. In diesem Zusammenhang konnten Seth et al. zeigen, dass besonders durch EGF die Gesamtproteinmenge des EGF-Rezeptors signifikant reduziert wird, obwohl die Synthese von neuen Rezeptoren gefördert wird. Trotz dieser Neusynthese kommt es durch EGF hauptsächlich zu einem Untergang des EGF-Rezeptors auf Proteinebene (SETH et al., 1999). In verschiedenen Plattenepithelkarzinom- und Mammakarzinomzellen wurde ebenfalls beobachtet, dass Stimulation mit EGF eine Abnahme der EGFR-Proteinmenge bewirkt (KAWAMOTO et al., 1983; CLARK et al., 1985; KUDLOW et al., 1986; BILOUS et al., 1992).

Die Blockade des EGF-Rezeptors durch den Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ führt zu einer Unterbrechung der autokrinen Stimulation des Rezeptors und beeinträchtigt damit auch die Regulation der Expression.

Beide Gliomzelllinien zeigten auf die Inkubation mit „Iressa®“ eine Reduktion der Proteinexpression des EGF-Rezeptors. Daraus kann man schließen, dass die Rezeptorblockade zu einer Abnahme der Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt, die sowohl durch verstärkten Proteinabbau als auch verringerte Neusynthese bedingt sein könnte.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Zelllinien U343 und U373 bezüglich der mRNA-Expression verdeutlichen, dass die Expression des EGF-Rezeptors durch weitere Regulationssysteme gesteuert werden muss, die bislang nicht vollständig bekannt sind und auch zelltyp-spezifisch sein können. Die Beobachtung, dass sich die mRNA-Expression beider Gliomzelllinien durch „Iressa®“ annäherte, lässt eine Art Grundexpression der mRNA des EGF-Rezeptors vermuten.

Auch wenn die genauen molekularen Mechanismen, welche die Expression des EGF-Rezeptors steuern, bislang nicht vollständig geklärt sind, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Blockade des Rezeptors durch den Tyrosinkinaseinhibitor „Iressa®“ die Rezeptorexpression beeinflusst.

### **5.6. Die Expression des EGF-Rezeptors unter Kombination aus ionisierender Bestrahlung und Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“**

Der synergistische Effekt der Kombination aus dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“ und ionisierender Bestrahlung wurde bereits in mehreren Studien an verschiedenen Karzinomzelllinien und Xenograft-Tumoren beschrieben (BIANCO et al., 2002; SHE et al., 2003; STEA et al., 2003; SOLOMON et al., 2003). Aus diesem Grund ist es interessant, welche Auswirkungen die Blockade des EGF-Rezeptors mittels „Iressa®“ kombiniert mit Bestrahlung auf die Expression des Rezeptors selbst hat.

Die in den Kapiteln 4.2.5. und 4.3.4. beschriebenen Ergebnisse zeigen die Wirkung einer Kombinationsbehandlung, bestehend aus hyperfraktionierter Bestrahlung und simultaner Inkubation mit dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“, auf die Expression des EGF-Rezeptors der Gliomzelllinien U343 und U373. Die Expression wurde sowohl mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene als auch mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht. Beide Zelllinien reagierten auf die kombinierte Behandlung mit einer Reduktion der Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen. Auf mRNA-Ebene zeigten die beiden Gliomzelllinien wieder eine konträre Reaktionsweise. Während bei der Zelllinie U343 die mRNA-Expression bei jeder Dosis signifikant unter dem Niveau der Kontrolle lag, wurde bei der Zelllinie U373 eine gesteigerte mRNA-Expression beobachtet.

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Blockade des EGF-Rezeptors in Kombination mit hyperfraktionierter Bestrahlung die Expression des Rezeptors sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene beeinflusst. Die Reduktion der EGFR-Proteinexpression kann in diesem Versuch allerdings nicht auf die bestrahlungsinduzierte Aktivierung des Rezeptors mit anschließender Internalisierung zurückgeführt werden. Die Blockade des EGF-Rezeptors mittels „Iressa®“ verhindert die durch Liganden oder Bestrahlung induzierte Autophosphorylierung und damit auch die Internalisierung des Rezeptors. Die Abnahme der Proteinexpression scheint wie im vorangehenden Versuch das Resultat der Rezeptorblockade zu sein. Man kann vermuten, dass ein funktionsfähiger EGF-Rezeptor an der Regulation seiner eigenen Expression beteiligt ist. Die Blockade der Rezeptorfunktion durch den Tyrosinkinaseinhibitor „Iressa®“ führt zu einer Unterbrechung der autokrinen Stimulation und beeinträchtigt damit auch die Regulation der Rezeptorexpression.

Die Änderungen in der EGFR-Expression auf mRNA-Ebene sind mit den Ergebnissen bei alleiniger Inkubation mit „Iressa®“ vergleichbar und verdeutlichen, dass die Blockade des Rezeptors auch dessen Expression beeinträchtigt.

Die autokrine Stimulation des EGF-Rezeptors durch die Wachstumsfaktoren EGF und TGF $\alpha$  fördert nicht nur die Proliferation der malignen Zellen sondern beeinflusst auch die Expression des EGF-Rezeptors (MCCULLOCH et al., 1998; SETH et al., 1999). In mehreren Studien wurde belegt, dass die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren EGF und TGF $\alpha$  die Menge an EGF-Rezeptor mRNA erhöht (BJORGE et KUDLOW, 1987; FERNANDEZ-POL et al., 1989; SETH et al., 1999). Die Unterbrechung dieser autokrinen Stimulation durch „Iressa®“ kann die Reduktion der mRNA-Expression bei der Gliomzelllinie U343 erklären. Auch wenn die bestrahlungsinduzierte Freisetzung von TGF $\alpha$  unabhängig von der Funktion des EGF-Rezeptors ist (DENT et al., 1999), kann der Wachstumsfaktor den blockierten Rezeptor nicht stimulieren und dadurch die Expression nicht beeinflussen.

Die Zelllinie U373 zeigte auf die Kombinationsbehandlung im Gegensatz zu der Zelllinie U343 eine gesteigerte mRNA-Expression. Auch wenn für dieses Ergebnis momentan keine eindeutige Erklärung gegeben werden kann, wird jedoch deutlich, dass die Expression des EGF-Rezeptors durch weitere Regulationsmechanismen gesteuert werden muss, die bislang nicht bekannt sind und auch zelltyp-abhängig sein können.

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse den Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors „Iressa®“ auf die Expression des EGF-Rezeptors.

Die Expression des EGF-Rezeptors wird durch ein kompliziertes, bislang nicht komplett verstandenes Netzwerk gesteuert, in das viele zellinterne als auch externe Faktoren beeinflussend einwirken können. Zu den externen Faktoren, welche die Expression des EGF-Rezeptors modulieren, zählen unter anderem die Wachstumsfaktoren EGF und TGF $\alpha$ , Hormone sowie Interferon alpha und gamma (MUKKU, 1984; BERNSTEIN et al., 1988; LINGHAM et al., 1988; SALOMON et al., 1989; HAMBURGER et PINNAMANENI, 1991; MCCULLOCH et al., 1998; YANG et al., 2004). Um ein tieferes Verständnis für die komplizierten Regulationsmechanismen, welche die Expression des EGF-Rezeptors kontrollieren, zu erlangen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

### 5.7. Ausblick

Das Ziel der Tumorforschung ist die Entwicklung neuer Therapieansätze, die gezielt in den Stoffwechsel maligner Zellen eingreifen, um eine spezifische Zerstörung des Tumorgewebes zu gewährleisten. Neuartige Substanzen wie der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 „Iressa®“, die selektiv den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) blockieren, bieten neue Möglichkeiten der Behandlung von soliden Tumoren. Die viel versprechenden Studien, in denen der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 seine antitumorale Wirksamkeit und sein günstiges Nebenwirkungsprofil unter Beweis stellen konnte, haben 2002 in Japan und 2003 in den USA zur Zulassung von „Iressa®“ als Therapie des inoperablen oder rezidivierenden Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms geführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die antiproliferative Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors ZD1839 auf die Gliomzelllinien U343 und U373. Die Proliferation der beiden Zelllinien wurde durch „Iressa®“ sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit hyperfraktionierter Bestrahlung reduziert. Die Bedeutung des Tyrosinkinaseinhibitors für die Therapie von malignen Gliomen muss zunächst in vivo und darauf folgend in klinischen Studien untersucht werden. Die gezielte Manipulation des EGF-Rezeptors stellt wahrscheinlich erst den Beginn neuer therapeutischer Behandlungsoptionen dar, die eine effektive Tumorkontrolle bei minimaler Toxizität erzielen. An der Regulation und Steuerung von zellulären Prozessen, welche die maligne Transformation einer Zelle induzieren und fördern können, sind neben dem EGF-Rezeptor auch andere Rezeptoren der Zellmembran beteiligt. Hierzu zählen unter anderem der PDGF-Rezeptor (Platelet-Derived Growth Factor) und die FGF-Rezeptoren (Fibroblast Growth Factor). Die simultane Blockade mehrerer Wachstumsfaktorrezeptoren könnte in Zukunft die Behandlung von soliden Tumoren und damit auch von malignen Gliomen verbessern.

Das Vorhandensein verschiedener Rezeptoren, welche die Tumorgenese und -Progression beeinflussen können, liefert eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Effektivität der Proliferationshemmung durch den Tyrosinkinaseinhibitor bei den verwendeten Gliomzelllinien. Durch Co-Expression mehrerer Wachstumsfaktorrezeptoren könnte die antitumorale Wirkung einer EGFR-Blockade gemildert werden, indem die Zelle über andere Rezeptoren die Proliferation und das Zellüberleben sichert.

Sowohl die Zellproliferation als auch die Expression des EGF-Rezeptors unterliegen komplexen Regulationsmechanismen, die bislang nicht vollständig bekannt sind und deren Entschlüsselung sicherlich neue Perspektiven in der Tumorthherapie eröffnet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Blockade des EGF-Rezeptors durch den Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839

„Iressa®“ die Expression des Rezeptors selbst beeinflusst. Die Änderungen in der Expression verdeutlichen die Möglichkeit der Zelle auf die Rezeptorblockade zu reagieren. Dieses Ergebnis leistet damit einen Beitrag für das Verständnis der komplexen Regulationssysteme der EGFR-Expression.

Um an diese Arbeit anzuknüpfen, käme eine Untersuchung der Expression von anderen Wachstumsfaktorrezeptoren unter der Behandlung mit ionisierender Strahlung und „Iressa®“ in Betracht. Dieser Ansatz könnte das Verständnis der hier gezeigten Ergebnisse vertiefen und Erklärungsansätze für die zum Teil konträren Reaktionen der verwendeten Gliomzelllinien U343 und U373 liefern.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:2884-90.
- 2 Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997;410:83-6.
- 3 Anderson NG, Ahmad T, Chan K, Dobson R, Bundred NJ. ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR-positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression. *Int J Cancer* 2001;94:774-82.
- 4 Anido J, Matar P, Albanell J, Guzman M, Rojo F, Arribas J, Averbuch S, Baselga J. ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:1274-83.
- 5 Arteaga CL, Johnson DH. Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa). *Curr Opin Oncol* 2001;13:491-8. Review.
- 6 Atlas I, Mendelsohn J, Baselga J, Fair WR, Masui H, Kumar R. Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor alpha. *Cancer Res* 1992;52:3335-9.
- 7 Balaban N, Moni J, Shannon M, Dang L, Murphy E, Goldkorn T. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1314:147-56.
- 8 Bancroft CC, Chen Z, Yeh J, Sunwoo JB, Yeh NT, Jackson S, Jackson C, Van Waes C. Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Int J Cancer* 2002;99:538-48.
- 9 Barker AJ, Gibson KH, Grundy W, Godfrey AA, Barlow JJ, Healy MP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Scarlett L, Henthorn L, Richards L. Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:1911-4.

- 10 Barker FG 2nd, Simmons ML, Chang SM, Prados MD, Larson DA, Sneed PK, Wara WM, Berger MS, Chen P, Israel MA, Aldape KD. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:410-8.
- 11 Baselga J. Monoclonal antibodies directed at growth factor receptors. *Ann Oncol* 2000;11:187-90. Review.
- 12 Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 2001;37:16-22. Review.
- 13 Baselga J, Rischin D, Ranson M, Calvert H, Raymond E, Kieback DG, Kaye SB, Gianni L, Harris A, Bjork T, Averbuch SD, Feyereislova A, Swaisland H, Rojo F, Albanell J. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Oncol* 2002;20:4292-302.
- 14 Beckmann MW, Niederacher D, Massenkeil G, Tutschek B, Beckmann A, Schenko G, Schnurch HG, Bender HG. Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu: no advantage of prediction of recurrence or survival in breast cancer patients. *Oncology* 1996;53:441-7.
- 15 Bedford JS. Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;21:1457-69.
- 16 Bernstein W, Zou ZQ, Black RJ, Pirollo KF, Chang EH. Association of interferon-gamma induced growth inhibition and modulation of epidermal growth factor receptor gene expression in squamous cell carcinoma cell lines. *J Biol Regul Homeost Agents* 1988;2:186-92.
- 17 Bianco C, Bianco R, Tortora G, Damiano V, Guerrieri P, Montemaggi P, Mendelsohn J, De Placido S, Bianco AR, Ciardiello F. Antitumor activity of combined treatment of human cancer cells with ionizing radiation and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 plus type I protein kinase A antisense oligonucleotide. *Clin Cancer Res* 2000;6:4343-50.
- 18 Bianco C, Tortora G, Bianco R, Caputo R, Veneziani BM, Caputo R, Damiano V, Troiani T, Fontanini G, Raben D, Pepe S, Bianco AR, Ciardiello F. Enhancement of antitumor activity

- of ionizing radiation by combined treatment with the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Clin Cancer Res* 2002;8:3250-8.
- 19 Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997;94:303-9.
  - 20 Bilous M, Milliken J, Mathijs JM. Immunocytochemistry and in situ hybridisation of epidermal growth factor receptor and relation to prognostic factors in breast cancer. *Eur J Cancer* 1992;28A:1033-7.
  - 21 Bjorge JD, Kudlow JE. Epidermal growth factor receptor synthesis is stimulated by phorbol ester and epidermal growth factor. Evidence for a common mechanism. *J Biol Chem* 1987;262:6615-22.
  - 22 Blackledge G, Averbuch S. Gefitinib ('Iressa', ZD1839) and new epidermal growth factor receptor inhibitors. *Br J Cancer* 2004;90:566-72. Review.
  - 23 Bottazzi ME, Zhu X, Bohmer RM, Assoian RK. Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase. *J Cell Biol* 1999;146:1255-64.
  - 24 Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857-68.
  - 25 Bruns CJ, Solorzano CC, Harbison MT, Ozawa S, Tsan R, Fan D, Abbruzzese J, Traxler P, Buchdunger E, Radinsky R, Fidler IJ. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:2926-35.
  - 26 Bucci B, D'Agnano I, Botti C, Mottolese M, Carico E, Zupi G, Vecchione A. EGF-R expression in ductal breast cancer: proliferation and prognostic implications. *Anticancer Res* 1997;17:769-74.
  - 27 Buchsbaum DJ, Bonner JA, Grizzle WE, Stackhouse MA, Carpenter M, Hicklin DJ, Bohlen P, Raisch KP. Treatment of pancreatic cancer xenografts with Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody, gemcitabine, and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:1180-93.

- 28 Burton E, Prados M. New chemotherapy options for the treatment of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 1999;11:157-61. Review.
- 29 Burton EC, Prados MD. Malignant gliomas. *Curr Treat Options Oncol* 2000;1:459-68. Review.
- 30 Busse D, Doughty RS, Ramsey TT, Russell WE, Price JO, Flanagan WM, Shawver LK, Arteaga CL. Reversible G(1) arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase requires up-regulation of p27(KIP1) independent of MAPK activity. *J Biol Chem* 2000;275:6987-95.
- 31 Campiglio M, Locatelli A, Olgiati C, Normanno N, Somenzi G, Vigano L, Fumagalli M, Menard S, Gianni L. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in breast cancer cells by the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa') is independent of EGFR expression level. *J Cell Physiol* 2004;198:259-68.
- 32 Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 1987;47:943-6.
- 33 Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 1979;48:193-216. Review.
- 34 Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990;265:7709-12. Review.
- 35 Carter S, Auer KL, Reardon DB, Birrer M, Fisher PB, Valerie K, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen R, Dent P. Inhibition of the mitogen activated protein (MAP) kinase cascade potentiates cell killing by low dose ionizing radiation in A431 human squamous carcinoma cells. *Oncogene* 1998;16:2787-96.
- 36 Chakravarti A, Dicker A, Mehta M. The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:927-31. Review.
- 37 Chamberlain MC, Kormanik PA. Practical guidelines for the treatment of malignant gliomas. *West J Med* 1998;168:114-20. Review.

- 38 Chang GC, Hsu SL, Tsai JR, Liang FP, Lin SY, Sheu GT, Chen CY. Molecular mechanisms of ZD1839-induced G1-cell cycle arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1453-64.
- 39 Chen WS, Lazar CS, Lund KA, Welsh JB, Chang CP, Walton GM, Der CJ, Wiley HS, Gill GN, Rosenfeld MG. Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation. *Cell* 1989;59:33-43.
- 40 Chen Z, Ke LD, Yuan XH, Adler-Storthz K. Correlation of cisplatin sensitivity with differential alteration of EGFR expression in head and neck cancer cells *Anticancer Res* 2000;20:899-902.
- 41 Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17:5328-37.
- 42 Ching KZ, Ramsey E, Pettigrew N, D' Cunha R, Jason M, Dodd JG. Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines. *Mol Cell Biochem* 1993;126:151-8.
- 43 Chu CT, Everiss KD, Wikstrand CJ, Batra SK, Kung HJ, Bigner DD. Receptor dimerization is not a factor in the signalling activity of a transforming variant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII). *Biochem J* 1997;324:855-61.
- 44 Ciardiello F. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs* 2000;60:25-32; discussion 41-2. Review.
- 45 Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Cuccato S, De Placido S, Bianco AR, Tortora G. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2001;7:1459-65.
- 46 Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, De Placido S, Bianco AR, Tortora G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000;6:2053-63.

- 47 Ciardiello F, Damiano V, Bianco R, Bianco C, Fontanini G, De Laurentiis M, De Placido S, Mendelsohn J, Bianco AR, Tortora G. Antitumor activity of combined blockade of epidermal growth factor receptor and protein kinase A. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1770-6.
- 48 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001;7:2958-70. Review.
- 49 Ciardiello F, Tortora G. Anti-epidermal growth factor receptor drugs in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:755-68. Review.
- 50 Ciardiello F, Tortora G, De Placido S, Bianco AR. ZD1839 (Iressa): preclinical studies and pharmacology. *Tumori* 2002;88:155-7.
- 51 Clark AJ, Ishii S, Richert N, Merlino GT, Pastan I. Epidermal growth factor regulates the expression of its own receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:8374-8.
- 52 Contessa JN, Reardon DB, Todd D, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, Bowers GD, Schmidt-Ullrich RK. The inducible expression of dominant-negative epidermal growth factor receptor-CD533 results in radiosensitization of human mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:405-11.
- 53 Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 1991;3:207-12.
- 54 Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;230:1132-9.
- 55 Crovello CS, Lai C, Cantley LC, Carraway KL 3rd. Differential signaling by the epidermal growth factor-like growth factors neuregulin-1 and neuregulin-2. *J Biol Chem* 1998;273:26954-61.
- 56 Curren Jr WJ, Scott C, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Nelson DF, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, et al. Does extent of surgery influence outcome for astrocytoma with atypical or anaplastic foci (AAF)? A report from three Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) trials. *J Neurooncol* 1992;12:219-27.

- 57 Davis RJ. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* 1995;42:459-67. Review.
- 58 De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P. Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:12202-7.
- 59 Dent P, Reardon DB, Park JS, Bowers G, Logsdon C, Valerie K, Schmidt-Ullrich R. Radiation-induced release of transforming growth factor alpha activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death. *Mol Biol Cell* 1999;10:2493-506.
- 60 Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, Hazan R, Ullrich A, King CR, Schlessinger J, Aaronson SA. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 1987;51:1063-70.
- 61 Di Gennaro E, Barbarino M, Bruzzese F, De Lorenzo S, Caraglia M, Abbruzzese A, Avallone A, Comella P, Caponigro F, Pepe S, Budillon A. Critical role of both p27KIP1 and p21CIP1/WAF1 in the antiproliferative effect of ZD1839 ('Iressa'), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in head and neck squamous carcinoma cells. *J Cell Physiol* 2003;195:139-50.
- 62 Dirks PB, Patel K, Hubbard SL, Ackerley C, Hamel PA, Rutka JT. Retinoic acid and the cyclin dependent kinase inhibitors synergistically alter proliferation and morphology of U343 astrocytoma cells. *Oncogene* 1997;15:2037-48.
- 63 Earp HS, Austin KS, Blaisdell J, Rubin RA, Nelson KG, Lee LW, Grisham JW. Epidermal growth factor (EGF) stimulates EGF receptor synthesis. *J Biol Chem* 1986;261:4777-80.
- 64 Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 1991;51:2164-72.
- 65 Eller JL, Longo SL, Hicklin DJ, Canute GW. Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 2002;51:1005-13; discussion 1013-4.

- 66 Ellerbroek SM, Halbleib JM, Benavidez M, Warmka JK, Wattenberg EV, Stack MS, Hudson LG. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res* 2001;61:1855-61.
- 67 Ennis BW, Lippman ME, Dickson RB. The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer Invest* 1991;9:553-62. Review.
- 68 Erickson SL, O'Shea KS, Ghaboosi N, Loverro L, Frantz G, Bauer M, Lu LH, Moore MW. ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* 1997;124:4999-5011.
- 69 Fernandez-Pol JA, Hamilton PD, Klos DJ. Transcriptional regulation of proto-oncogene expression by epidermal growth factor, transforming growth factor beta 1, and triiodothyronine in MDA-468 cells. *J Biol Chem* 1989;264:4151-6.
- 70 Fernandez-Pol JA, Klos DJ, Hamilton PD. Modulation of transforming growth factor alpha-dependent expression of epidermal growth factor receptor gene by transforming growth factor beta, triiodothyronine, and retinoic acid. *J Cell Biochem* 1989;41:159-70.
- 71 Fernandez-Pol JA, Klos DJ, Hamilton PD, Talkad VD. Modulation of epidermal growth factor receptor gene expression by transforming growth factor-beta in a human breast carcinoma cell line. *Cancer Res* 1987;47:4260-5.
- 72 Fischer U, Wullich B, Sattler HP, Gottert E, Zang KD, Meese E. Coamplification on chromosomes 7p12-13 and 9q12-13 identified by reverse chromosome painting in a glioblastoma multiforme. *Hum Genet* 1994;93:331-4.
- 73 Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, Speiser P, Czerwenka K, Sevela P, Zeillinger R. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Res* 1997;17:613-9.
- 74 Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, Ali IU. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* 1992;52:4550-3.
- 75 Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR, Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G, Ciardiello F. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in

- completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res* 1998;4:241-9.
- 76 Fowler KJ, Walker F, Alexander W, Hibbs ML, Nice EC, Bohmer RM, Mann GB, Thumwood C, Maglitta R, Danks JA, et al. A mutation in the epidermal growth factor receptor in waved-2 mice has a profound effect on receptor biochemistry that results in impaired lactation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1465-9.
- 77 Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 1995;378:390-4.
- 78 Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, Natale RB, Schiller JH, Von Pawel J, Pluzanska A, Gatzemeier U, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A, Johnson DH. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;22:777-84.
- 79 Gill GN, Kawamoto T, Cochet C, Le A, Sato JD, Masui H, McLeod C, Mendelsohn J. Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 1984;259:7755-60.
- 80 Glynn-Jones E, Goddard L, Harper ME. Comparative analysis of mRNA and protein expression for epidermal growth factor receptor and ligands relative to the proliferative index in human prostate tissue. *Hum Pathol* 1996;27:688-94.
- 81 Gokhale PC, Soldatenkov V, Wang FH, Rahman A, Dritschilo A, Kasid U. Antisense raf oligodeoxyribonucleotide is protected by liposomal encapsulation and inhibits Raf-1 protein expression in vitro and in vivo: implication for gene therapy of radioresistant cancer. *Gene Ther* 1997;4:1289-99.
- 82 Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Matsukuma K. EGF receptor phosphorylation is affected by ionizing radiation. *Biochim Biophys Acta* 1997;1358:289-99.

- 83 Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1:1311-8.
- 84 Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001;92:1331-46.
- 85 Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Twardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1996;78:1284-92.
- 86 Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997;16:1647-55.
- 87 Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, Machtay M, Rosenthal DI, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Weber RS, Muschel RJ. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 2002;8:885-92.
- 88 Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:184-9. Review.
- 89 Hagan M, Wang L, Hanley JR, Park JS, Dent P. Ionizing radiation-induced mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in DU145 prostate carcinoma cells: MAP kinase inhibition enhances radiation-induced cell killing and G2/M-phase arrest. *Radiat Res* 2000;153:371-83.
- 90 Hamburger AW, Pinnamaneni GD. Increased epidermal growth factor receptor gene expression by gamma-interferon in a human breast carcinoma cell line. *Br J Cancer* 1991;64:64-8.
- 91 Harari PM, Huang SM. Radiation response modification following molecular inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Semin Radiat Oncol* 2001;11:281-9. Review.
- 92 Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol* 1992;117:1343-50.

- 93 Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995;80:213-23. Review.
- 94 Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Oliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A, Johnson DH. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;22:785-94.
- 95 Herbst RS, Maddox AM, Rothenberg ML, Small EJ, Rubin EH, Baselga J, Rojo F, Hong WK, Swaisland H, Averbuch SD, Ochs J, LoRusso PM. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2002;20:3815-25.
- 96 Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 2002;94:1593-611.
- 97 Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD, et al. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 1992;256:1205-10.
- 98 Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, Huang CM, Gill GN, Wiley HS, Cavenee WK. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997;272:2927-35.
- 99 Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59:1935-40.
- 100 Huang SM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs* 1999;17:259-69. Review.
- 101 Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6:2166-74.

- 102 Huang SM, Li J, Armstrong EA, Harari PM. Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Res* 2002;62:4300-6.
- 103 Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4207-11.
- 104 Iliakis G. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin Oncol* 1997;24:602-15. Review.
- 105 Jinno Y, Merlino GT, Pastan I. A novel effect of EGF on mRNA stability. *Nucleic Acids Res* 1988;16:4957-66.
- 106 Johnson DH. Gefitinib (Iressa) trials in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003;41:23-8. Review.
- 107 Jones FE, Stern DF. Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* 1999;18:3481-90.
- 108 Jones FE, Welte T, Fu XY, Stern DF. ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation. *J Cell Biol* 1999;147:77-88.
- 109 Kavanagh BD, Dent P, Schmidt-Ullrich RK, Chen P, Mikkelsen RB. Calcium-dependent stimulation of mitogen-activated protein kinase activity in A431 cells by low doses of ionizing radiation. *Radiat Res* 1998;149:579-87.
- 110 Kawamata H, Kameyama S, Oyasu R. In vitro and in vivo acceleration of the neoplastic phenotype of a low-tumorigenicity rat bladder carcinoma cell line by transfected transforming growth factor-alpha. *Mol Carcinog* 1994;9:210-9.
- 111 Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, Mendelsohn J. Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:1337-41.

- 112 Kesavan P, Mukhopadhyay S, Murphy S, Rengaraju M, Lazar MA, Das M. Thyroid hormone decreases the expression of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1991;266:10282-6.
- 113 Kiyokawa N, Lee EK, Karunagaran D, Lin SY, Hung MC. Mitosis-specific negative regulation of epidermal growth factor receptor, triggered by a decrease in ligand binding and dimerization, can be overcome by overexpression of receptor. *J Biol Chem* 1997;272:18656-65.
- 114 Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 2000;77:25-79. Review.
- 115 Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 1993;3:255-68. Review.
- 116 Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:215-25; discussion 226-9. Review.
- 117 Kleihues P, Sobin LH. World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 2000;88:2887. Review.
- 118 Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 1992;13:3-17. Review.
- 119 Klohs WD, Fry DW, Kraker AJ. Inhibitors of tyrosine kinase. *Curr Opin Oncol* 1997;9:562-8. Review.
- 120 Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.
- 121 Kohler M, Janz I, Wintzer HO, Wagner E, Bauknecht T. The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. *Anticancer Res* 1989;9:1537-47.

- 122 Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:9193-7.
- 123 Kudlow JE, Cheung CY, Bjorge JD. Epidermal growth factor stimulates the synthesis of its own receptor in a human breast cancer cell line. *J Biol Chem* 1986;261:4134-8.
- 124 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- 125 Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995;378:394-8.
- 126 Lee SW, Fraass BA, Marsh LH, Herbort K, Gebarski SS, Martel MK, Radany EH, Lichter AS, Sandler HM. Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;43:79-88.
- 127 Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 1998;17:3385-97.
- 128 Levin VA, Prados MD, Wara WM, Davis RL, Gutin PH, Phillips TL, Lamborn K, Wilson CB. Radiation therapy and bromodeoxyuridine chemotherapy followed by procarbazine, lomustine, and vincristine for the treatment of anaplastic gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:75-83.
- 129 Levitt ML, Koty PP. Tyrosine kinase inhibitors in preclinical development. *Invest New Drugs* 1999;17:213-26. Review.
- 130 Levitzki A, Gazit A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 1995;267:1782-8. Review.
- 131 Li B, Yuan M, Kim IA, Chang CM, Bernhard EJ, Shu HK. Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT

- pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene* 2004;23:4594-602.
- 132 Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J. Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci Suppl* 1985;3:161-72.
- 133 Lichtner RB, Menrad A, Sommer A, Klar U, Schneider MR. Signaling-inactive epidermal growth factor receptor/ligand complexes in intact carcinoma cells by quinazoline tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res* 2001;61:5790-5.
- 134 Lin J, Adam RM, Santiestevan E, Freeman MR. The phosphatidylinositol 3'-kinase pathway is a dominant growth factor-activated cell survival pathway in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 1999;59:2891-7.
- 135 Lingham RB, Stancel GM, Loose-Mitchell DS. Estrogen regulation of epidermal growth factor receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* 1988;2:230-5.
- 136 Liu B, Fang M, Schmidt M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *Br J Cancer* 2000;82:1991-9.
- 137 Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35:1886-94. Review.
- 138 Magne N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Marcie S, Lagrange JL, Milano G. Sequence-dependent effects of ZD1839 ('Iressa') in combination with cytotoxic treatment in human head and neck cancer. *Br J Cancer* 2002;86:819-27.
- 139 Maity A, Pore N, Lee J, Solomon D, O'Rourke DM. Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res* 2000;60:5879-86.
- 140 Malden LT, Novak U, Kaye AH, Burgess AW. Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1988;48:2711-4.

- 141 Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R. Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene* 1998;17:999-1007.
- 142 Masui H, Kawamoto T, Sato JD, Wolf B, Sato G, Mendelsohn J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984;44:1002-7.
- 143 McCulloch RK, Walker CE, Chakera A, Jazayeri J, Leedman PJ. Regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF alpha in epidermoid cancer cells is cell type-specific. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1265-78.
- 144 Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 1997;3:2703-7. Review.
- 145 Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:3-9. Review.
- 146 Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2787-99. Review.
- 147 Messa C, Russo F, Caruso MG, Di Leo A. EGF, TGF-alpha, and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol* 1998;37:285-9.
- 148 Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995;376:337-41.
- 149 Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 2000;6:701-8.
- 150 Modi S, Seidman AD. An update on epidermal growth factor receptor inhibitors. *Curr Oncol Rep* 2002;4:47-55. Review.
- 151 Moghal N, Sternberg PW. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:190-6. Review.
- 152 Morishige K, Kurachi H, Amemiya K, Adachi H, Inoue M, Miyake A, Tanizawa O, Sakoyama Y. Involvement of transforming growth factor alpha/epidermal growth factor

- receptor autocrine growth mechanism in an ovarian cancer cell line in vitro. *Cancer Res* 1991;51:5951-5.
- 153 Morocz IA, Schmitter D, Lauber B, Stahel RA. Involvement of transforming growth factor alpha/epidermal growth factor receptor autocrine growth mechanism in an ovarian cancer cell line in vitro. *Cancer Res* 1991;51:5951-5.
- 154 Morris JK, Lin W, Hauser C, Marchuk Y, Getman D, Lee KF. Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron* 1999;23:273-83.
- 155 Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, Montgomery RB, Wong AJ. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1998;273:200-6.
- 156 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 157 Mukku VR. Regulation of epidermal growth factor receptor levels by thyroid hormone. *J Biol Chem* 1984;259:6543-7.
- 158 Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
- 159 Narita T, Taga T, Sugita K, Nakazawa S, Ohta S. The autocrine loop of epidermal growth factor receptor-epidermal growth factor / transforming growth factor-alpha in malignant rhabdoid tumor cell lines: heterogeneity of autocrine mechanism in TTC549. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:269-78.
- 160 Naruse I, Ohmori T, Ao Y, Fukumoto H, Kuroki T, Mori M, Saijo N, Nishio K. Antitumor activity of the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) Iressa (ZD1839) in an EGFR-expressing multidrug-resistant cell line in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2002;98:310-5.
- 161 Nasu S, Ang KK, Fan Z, Milas L. C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody enhances tumor radiocurability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:474-7.

- 162 Natale RB, Zaretsky SL. ZD1839 (Iressa): what's in it for the patient? *Oncologist* 2002;7:25-30. Review.
- 163 Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37:9-15. Review.
- 164 Nicholson S, Sainsbury JR, Halcrow P, Chambers P, Farndon JR, Harris AL. Expression of epidermal growth factor receptors associated with lack of response to endocrine therapy in recurrent breast cancer. *Lancet* 1989;1:182-5.
- 165 Nicholson S, Sainsbury JR, Needham GK, Chambers P, Farndon JR, Harris AL. Quantitative assays of epidermal growth factor receptor in human breast cancer: cut-off points of clinical relevance. *Int J Cancer* 1988;42:36-41.
- 166 Noonberg SB, Benz CC. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* 2000;59:753-67. Review.
- 167 O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Court W, Box G, Eccles S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. *Int J Cancer* 2000;86:307-17.
- 168 Oppitz U, Maessen D, Zunterer H, Richter S, Flentje M. 3D-recurrence-patterns of glioblastomas after CT-planned postoperative irradiation. *Radiother Oncol* 1999;53:53-7.
- 169 Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol* 2001;12:745-60. Review.
- 170 Peles E, Ben-Levy R, Tzahar E, Liu N, Wen D, Yarden Y. Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/heregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *EMBO J* 1993;12:961-71.
- 171 Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res* 1996;56:3666-9.

- 172 Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999;5:257-65.
- 173 Perry JE, Grossmann ME, Tindall DJ. Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line. *Prostate* 1998;35:117-24.
- 174 Peter RU, Beetz A, Ried C, Michel G, van Beuningen D, Ruzicka T. Increased expression of the epidermal growth factor receptor in human epidermal keratinocytes after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 1993;136:65-70.
- 175 Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997;151:1523-30.
- 176 Petrides PE, Bock S, Bovens J, Hofmann R, Jakse G. Modulation of pro-epidermal growth factor, pro-transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor gene expression in human renal carcinomas. *Cancer Res* 1990;50:3934-9.
- 177 Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1746-50.
- 178 Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ, Shoyab M. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4905-9.
- 179 Prados MD, Berger MS, Wilson CB. Primary central nervous system tumors: advances in knowledge and treatment. *CA Cancer J Clin* 1998;48:331-60, 321. Review.
- 180 Prados MD, Levin V. Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol* 2000;27:1-10. Review.

- 181 Prenzel N, Zwick E, Leserer M, Ullrich A. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res* 2000;2:184-90. Review.
- 182 Prewett M, Rockwell P, Rockwell RF, Giorgio NA, Mendelsohn J, Scher HI, Goldstein NI. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996;19:419-27.
- 183 Prewett M, Rothman M, Waksal H, Feldman M, Bander NH, Hicklin DJ. Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1998;4:2957-66.
- 184 Prigent SA, Lemoine NR. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* 1992;4:1-24. Review.
- 185 Raben D, Helfrich BA, Chan D, Johnson G, Bunn PA Jr. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, alone and in combination with radiation and chemotherapy as a new therapeutic strategy in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2002;29:37-46. Review.
- 186 Radford IR. Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986;49:611-20.
- 187 Ranson M, Hammond LA, Ferry D, Kris M, Tullo A, Murray PI, Miller V, Averbuch S, Ochs J, Morris C, Feyereislova A, Swaisland H, Rowinsky EK. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2002;20:2240-50.
- 188 Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 1999;11:162-7. Review.
- 189 Reardon DB, Contessa JN, Mikkelsen RB, Valerie K, Amir C, Dent P, Schmidt-Ullrich RK. Dominant negative EGFR-CD533 and inhibition of MAPK modify JNK1 activation and enhance radiation toxicity of human mammary carcinoma cells. *Oncogene* 1999;18:4756-66.
- 190 Riese DJ 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998;20:41-8. Review.

- 191 Rieske P, Kordek R, Bartkowiak J, Debiec-Rychter M, Biernat W, Liberski PP. A comparative study of epidermal growth factor receptor (EGFR) and MDM2 gene amplification and protein immunoreactivity in human glioblastomas. *Pol J Pathol* 1998;49:145-9.
- 192 Rodeck U, Jost M, Kari C, Shih DT, Lavker RM, Ewert DL, Jensen PJ. EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci* 1997;110:113-21.
- 193 Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrock AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 1991;142:257-65.
- 194 Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res* 1997;3:515-22.
- 195 Saleh MN, Raisch KP, Stackhouse MA, Grizzle WE, Bonner JA, Mayo MS, Kim HG, Meredith RF, Wheeler RH, Buchsbaum DJ. Combined modality therapy of A431 human epidermoid cancer using anti-EGFr antibody C225 and radiation. *Cancer Biother Radiopharm* 1999;14:451-63.
- 196 Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:183-232. Review.
- 197 Salomon DS, Kidwell WR, Kim N, Ciardiello F, Bates SE, Valverius E, Lippman ME, Dickson RB, Stampfer M. Modulation by estrogen and growth factors of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor expression in normal and malignant human mammary epithelial cells. *Recent Results Cancer Res* 1989;113:57-69.
- 198 Sarkaria JN, Tibbetts RS, Busby EC, Kennedy AP, Hill DE, Abraham RT. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res* 1998;58:4375-82.
- 199 Sato JD, Kawamoto T, Le AD, Mendelsohn J, Polikoff J, Sato GH. Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* 1983;1:511-29.

- 200 Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A, Coussens L. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985;229:976-8.
- 201 Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 1994;54:6321-4.
- 202 Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, Reardon DB, Bowers G, Lin PS. Molecular mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation. *Radiat Oncol Investig* 1999;7:321-30. Review.
- 203 Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res* 2000;153:245-57. Review.
- 204 Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, Kavanagh BD, Contessa JN, Rorrer WK, Chen PB. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997;15:1191-7.
- 205 Schmidt-Ullrich RK, Valerie KC, Chan W, McWilliams D. Altered expression of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor in MCF-7 cells after single and repeated radiation exposures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:813-9.
- 206 Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M, Downward J. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* 2001;15:981-94.
- 207 Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988;48:4827-33.
- 208 Sedlacek HH. Kinase inhibitors in cancer therapy: a look ahead. *Drugs* 2000;59:435-76. Review.
- 209 Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6497-501.

- 210 Seth D, Shaw K, Jazayeri J, Leedman PJ. Complex post-transcriptional regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF- $\alpha$  in human prostate cancer cells. *Br J Cancer* 1999;80:657-69.
- 211 Seymour CB, Mothersill C, Alper T. High yields of lethal mutations in somatic mammalian cells that survive ionizing radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986;50:167-79.
- 212 She Y, Lee F, Chen J, Haimovitz-Friedman A, Miller VA, Rusch VR, Kris MG, Sirotnak FM. The epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 selectively potentiates radiation response of human tumors in nude mice, with a marked improvement in therapeutic index. *Clin Cancer Res* 2003;9:3773-8.
- 213 Sheridan MT, O'Dwyer T, Seymour CB, Mothersill CE. Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol Investig* 1997;5:180-6.
- 214 Shintani S, Li C, Mihara M, Terakado N, Yano J, Nakashiro K, Hamakawa H. Enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, is accompanied by inhibition of DNA damage repair and cell growth in oral cancer. *Int J Cancer* 2003;107:1030-7.
- 215 Shintani S, Li C, Mihara M, Yano J, Terakado N, Nakashiro K, Hamakawa H. Gefitinib ('Iressa', ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 2004;40:43-51.
- 216 Shoelson SE. SH2 and PTB domain interactions in tyrosine kinase signal transduction. *Curr Opin Chem Biol* 1997;1:227-34. Review.
- 217 Sibilica M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J* 1998;17:719-31.
- 218 Sibilica M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995;269:234-8. Erratum in: *Science* 1995;269:909.

- 219 Sirotnak FM, Zakowski MF, Miller VA, Scher HI, Kris MG. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2000;6:4885-92.
- 220 Smith JS, Jenkins RB. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci* 2000;5:213-31. Review.
- 221 Solomon B, Hagekyriakou J, Trivett MK, Stacker SA, McArthur GA, Cullinane C. EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. Epidermal growth factor receptor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:713-23.
- 222 Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 1985;313:745-7. Review.
- 223 Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 1980;303:878-80.
- 224 Stea B, Falsey R, Kislin K, Patel J, Glanzberg H, Carey S, Ambrad AA, Meuillet EJ, Martinez JD. Time and dose-dependent radiosensitization of the glioblastoma multiforme U251 cells by the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa'). *Cancer Lett* 2003;202:43-51.
- 225 Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The radiobiology of human cells and tissues. In vitro radiosensitivity. The picture has changed in the 1980s. *Int J Radiat Biol* 1989;56:525-37. Review.
- 226 Stern DF, Hare DL, Cecchini MA, Weinberg RA. Construction of a novel oncogene based on synthetic sequences encoding epidermal growth factor. *Science* 1987;235:321-4.
- 227 Sudol M. From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene* 1998;17:1469-74. Review.
- 228 Sundberg AL, Almqvist Y, Tolmachev V, Carlsson J. Treatment of cultured glioma cells with the EGFR-TKI gefitinib ("Iressa", ZD1839) increases the uptake of astatinated EGF despite the absence of gefitinib-mediated growth inhibition. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:727-9.

- 229 Takuwa N, Fukui Y, Takuwa Y. Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999;19:1346-58.
- 230 Tang P, Steck PA, Yung WK. The autocrine loop of TGF- $\alpha$ /EGFR and brain tumors. *J Neurooncol* 1997;35:303-14. Review.
- 231 Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995;269:230-4.
- 232 Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:684-9.
- 233 Tortosa A, Ino Y, Odell N, Swilley S, Sasaki H, Louis DN, Henson JW. Molecular genetics of radiographically defined de novo glioblastoma multiforme. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000;26:544-52.
- 234 Treinies I, Paterson HF, Hooper S, Wilson R, Marshall CJ. Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal to stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 1999;19:321-9.
- 235 Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996;16:5276-87.
- 236 Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984;309:418-25.
- 237 Verbeek BS, Adriaansen-Slot SS, Vroom TM, Beckers T, Rijksen G. Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* 1998;425:145-50.

- 238 Verheij M, Bartelink H. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000;301:133-42. Review.
- 239 Vicentini C, Festuccia C, Gravina GL, Angelucci A, Marronaro A, Bologna M. Prostate cancer cell proliferation is strongly reduced by the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in vitro on human cell lines and primary cultures. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:165-74.
- 240 Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 1991;51:2515-20. Erratum in: *Cancer Res* 1991;51:4501.
- 241 Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197-206. Review.
- 242 Volm M, Efferth T, Mattern J. Oncoprotein (c-myc, c-erbB1, c-erbB2, c-fos) and suppressor gene product (p53) expression in squamous cell carcinomas of the lung. Clinical and biological correlations. *Anticancer Res* 1992;12:11-20.
- 243 von Deimling A, Bender B, Jahnke R, Waha A, Kraus J, Albrecht S, Wellenreuther R, Fassbender F, Nagel J, Menon AG, et al. Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res* 1994;54:1397-401.
- 244 Wakeling AE, Barker AJ, Davies DH, Brown DS, Green LR, Cartlidge SA, Woodburn JR. Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines. *Breast Cancer Res Treat* 1996;38:67-73. Review.
- 245 Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Barker AJ, Gibson KH. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002;62:5749-54.
- 246 Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E Jr, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Owens G, Ransohoff J 2nd, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR Jr, Wilson CB, Strike TA. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 1980;303:1323-9.

- 247 Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979;5:1725-31.
- 248 Walker RA, Dearing SJ. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53:167-76.
- 249 Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996;6:217-23.
- 250 Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem* 1998;273:13819-27.
- 251 Watters D. Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol* 1999;77:263-71.
- 252 Weislow OS, Kiser R, Fine DL, Bader J, Shoemaker RH, Boyd, MR. New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:577-86. Erratum in: *J Natl Cancer Inst* 1989;81:963.
- 253 Weiss A, Schlessinger J. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* 1998;94:277-80. Review.
- 254 Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:637-43. Review.
- 255 Williams KJ, Telfer BA, Stratford IJ, Wedge SR. ZD1839 ('Iressa'), a specific oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, potentiates radiotherapy in a human colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer* 2002;86:1157-61.
- 256 Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6899-903.
- 257 Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2965-9.

- 258 Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999;82:241-50. Review.
- 259 Wosikowski K, Schuurhuis D, Kops GJ, Saceda M, Bates SE. Altered gene expression in drug-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 1997;3:2405-14.
- 260 Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* 1995;95:1897-905.
- 261 Wu X, Rubin M, Fan Z, DeBlasio T, Soos T, Koff A, Mendelsohn J. Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 1996;12:1397-403.
- 262 Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986;319:230-4.
- 263 Yang JL, Qu XJ, Russell PJ, Goldstein D. Regulation of epidermal growth factor receptor in human colon cancer cell lines by interferon alpha. *Gut* 2004;53:123-9.
- 264 Yao M, Shuin T, Misaki H, Kubota Y. Enhanced expression of c-myc and epidermal growth factor receptor (C-erbB-1) genes in primary human renal cancer. *Cancer Res* 1988;48:6753-7.
- 265 Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-37.
- 266 Zimonjic DB, Alimandi M, Miki T, Popescu NC, Kraus MH. Localization of the human HER4/erbB-4 gene to chromosome 2. *Oncogene* 1995;10:1235-7.

## 7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt all denen, die zu dieser Arbeit beigetragen und mich auf meinem Weg begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. med. Ch. Rube für die Finanzierung, die Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. T.-P. Nguyen für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, für die gute Betreuung, für seine Freundlichkeit und Großzügigkeit.

Frau Dr. med. S. Burdak-Rothkamm für die sehr gute Einführung in die Labortechniken, für ihre Hilfestellung, für zahlreiche Anregungen und konstruktive Kritik.

Meiner Arbeitsgruppe, im Besonderen Herrn Christoph Justinger und Herrn Jens-Peter Sommer, für die kollegiale Zusammenarbeit.

Frau D. Ludwig für die Hilfe bei der täglichen Laborarbeit.

Dem Team der Medizinisch-technischen Radiologieassistenten/innen für ihre Freundlichkeit, Geduld und ihr Organisationstalent bei den Bestrahlungen.

Meinen Eltern, dass sie immer für mich da sind.

Frau Friederike Sofsky und Herrn Roman Uder für ihre Freundschaft und Unterstützung in einer schweren Zeit.

## 8. LEBENSLAUF

### Persönliche Daten

---

Nadine Rau

geboren am 20. Juli 1978 in Pirmasens

ledig; keine Kinder

### Schulbildung

---

1985-1989	Grundschule Wittelsbach, Pirmasens
1989-1998	Altsprachliches Immanuel-Kant Gymnasium, Pirmasens
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

---

Ab Oktober 1998	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
September 2000	Physikum
September 2001	Erstes Staatsexamen
2001-2003	Famulaturen in Innerer Medizin, Strahlentherapie, Neurologie und Allgemeinmedizinischer Praxis
März 2004	Zweites Staatsexamen
Oktober 2004 bis Oktober 2005	Praktisches Jahr (Chirurgie, Anästhesiologie, Innere Medizin)
Oktober 2005	Drittes Staatsexamen

### Beruf

---

Seit Februar 2006	Assistenzärztin der Anästhesiologie an dem Klinikum der Universität zu Köln
-------------------	--