

**Wechselwirkungen von Schwerionenstrahlung,
Migration und EGFR-Signalwegen in
Glioblastomzelllinien**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Christina Stahler, geb. Fäthe

Geboren am 14.05.1986 in Dresden

Mainz 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2013

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	V
<u>1. EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1. KREBS	1
1.2. TUMORTHERAPIE	2
1.2.1. Physikalische und biologische Grundlagen der Strahlentherapie	3
1.2.2. Strahlentherapie bei Tumoren	7
1.2.3. Schwerionenbestrahlung an der GSI Darmstadt	8
1.3. MIGRATION VON ZELLEN	12
1.3.1. Phasen der Zellmigration	13
1.3.2. Regulation der Zellmigration	15
1.3.3. Zellmigration in Tumoren	17
1.4. DER EGF-REZEPTOR	19
1.4.1. Biologie der ErbB-Rezeptoren	19
1.4.2. Der EGF-Rezeptor in Tumoren	21
1.5. AUFGABENSTELLUNG	23
<u>2. MATERIALIEN UND METHODEN</u>	<u>25</u>
2.1. ZELLINIEN	25
2.1.1. Zelllinien, Medien und Zusätze	25
2.1.2. Standardtechniken in der Zellkultur	26
2.1.2.1. Monolayerkultivierung und Passagieren	26
2.1.2.2. Bestimmung der Zellzahl	26
2.1.2.3. Mykoplasmentest	26
2.1.2.4. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	27
2.1.2.5. Behandlung mit EGF	27
2.1.2.6. Behandlung mit Inhibitoren des EGFR und spezifischer Signalproteine	28
2.2. BESTRAHLUNG	28
2.2.1. Photonenbestrahlung	28
2.2.2. Schwerionenbestrahlung	29
2.2.3. Zellüberleben nach Bestrahlung	30

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.3.1. Zellviabilitätstest (XTT)	30
2.2.3.2. Klonogener Überlebenstest	31
2.3. ZELLMIGRATION	31
2.3.1. Vorbereitung der Membranen	32
2.3.2. Beschickung der Boydenkammer	33
2.3.3. Fixierung und Färbung der Zellen	33
2.3.4. Auswertung	34
2.4. PROTEINEXPRESSION	35
2.4.1. Herstellung von Zelllysaten	35
2.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay	35
2.4.3. SDS-PAGE	36
2.4.4. Western Blot	37
2.4.4.1. Semi-Dry Blot	37
2.4.4.2. Blocking und Antikörperinkubation	38
2.4.4.3. Detektion	38
2.4.4.4. Strippen	39
2.5. STATISTIK	39
3. ERGEBNISSE	41
3.1. CHARAKTERISIERUNG DER ZELLLINIEN	41
3.1.1. Allgemeines	41
3.1.2. Expression des EGFR	42
3.1.3. Überleben der Zellen nach Bestrahlung	43
3.1.3.1. Klonogenes Überleben	43
3.1.3.2. Viabilität der Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung	44
3.2. STIMULIERUNG DER ZELLEN DURCH EGF	45
3.2.1. Wirkung von EGF auf den EGFR	45
3.2.2. Wirkung von EGF auf die Zellmigration	47
3.2.3. Wirkung von EGF auf intrazelluläre Signalproteine	48
3.2.3.1. Phosphorylierung und Expression von AKT und ERK1/2 nach EGF-Stimulierung	48
3.2.3.2. Beeinflussung der EGF-stimulierten Zellmigration durch Inhibitoren des PI3K und MAPK Signalweges	49
3.3. BESTRAHLUNG DER ZELLEN MIT PHOTONEN	50

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.1. Einfluss der Photonenstrahlung auf die Zellmigration	51
3.3.2. Einfluss der Photonenstrahlung auf den EGFR	52
3.3.3. Einfluss der Photonenstrahlung auf intrazelluläre Signalproteine	52
3.3.4. Kombination von Photonenbestrahlung und Behandlung der Zellen mit Inhibitoren des EGFR, PI3K und MAPK Signalweges	55
3.3.4.1. Zellmigration nach Kombinationsbehandlung	55
3.3.4.2. Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 nach Kombinationsbehandlung	56
3.4. BESTRAHLUNG DER ZELLEN MIT SCHWEREN ¹²C-IONEN	58
3.4.1. Einfluss der ¹² C-Strahlung auf die Zellmigration	58
3.4.2. Einfluss der ¹² C-Strahlung auf den EGFR	59
3.4.3. Einfluss der ¹² C-Strahlung auf intrazelluläre Signalproteine	60
3.4.4. Kombination von ¹² C-Bestrahlung und Behandlung der Zellen mit Inhibitoren des EGFR, PI3K und MAPK Signalweges	61
3.4.4.1. Zellmigration nach Kombinationsbehandlung	61
3.4.4.2. Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 nach Kombinationsbehandlung	62
4. DISKUSSION	63
4.1. CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIEN	63
4.2. EGF-VERMITTELTE ZELLSTIMULIERUNG	65
4.3. EINFLUSS DER PHOTONENSTRAHLUNG AUF DIE ZELLMIGRATION UND DEN EGFR	70
4.4. EINFLUSS DER ¹²C-IONENSTRAHLUNG AUF DIE ZELLMIGRATION UND DEN EGFR	76
4.5. VERGLEICH DER WIRKUNG VON PHOTONEN- UND ¹²C-IONEN- STRAHLUNG AUF DIE ZELLMIGRATION UND DEN EGFR	79
4.6. AUSBLICK	82
5. ANHANG	85
5.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	85
5.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	88
5.3. PUFFER UND LÖSUNGEN	90
5.3.1. Zellkultur	90

INHALTSVERZEICHNIS

5.3.2. Boydenkammer	90
5.3.3. SDS-PAGE und Western Blot	91
5.4. KITS	93
5.5. ANTIKÖRPER	93
5.6. CHEMIKALIEN	94
5.7. MATERIALIEN UND GERÄTE	95
<u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>99</u>

Zusammenfassung

Die Bildung von lokalen Rezidiven wird bei Glioblastomen vor allem durch das schnelle, stark infiltrierende Wachstum gefördert und trägt entscheidend zum Versagen der Therapie bei. Für die Infiltration des umliegenden Normalgewebes ist das invasive und migratorische Potential der Tumorzellen ausschlaggebend. Die Rolle der angewendeten Therapieverfahren bei der Induktion der Zellmotilität ist noch weitgehend unklar. Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher *in vitro* die Wirkung der Photonen- und Schwerionenstrahlung auf die Migration von humanen Glioblastomzelllinien (U87 und LN229) vergleichend untersucht. Parallel erfolgte eine Analyse von migrationsregulierenden Signalmolekülen nach Bestrahlung. Dabei wurde geklärt, ob die Veränderungen der Migration kausal mit Veränderungen des EGF-Rezeptors bzw. gekoppelter Signalwege in Zusammenhang stehen. Gezeigt werden konnte zunächst, dass die EGF-induzierte Stimulierung bzw. Phosphorylierung des EGFR über den PI3K und MAPK Signalweg an der Regulation der Zellmigration in Glioblastomzellen beteiligt ist. Hinsichtlich des migratorischen Verhaltens sowie der EGFR-vermittelten Signaltransduktion nach Bestrahlung wurden Zelllinien- und Strahlen-spezifische Unterschiede beobachtet. Die Photonenstrahlung führte in U87 Zellen zu einer Aktivierung des EGFR sowie zur Steigerung der Migration nach klinisch relevanten Dosen. Versuche mit einem EGFR-spezifischen Inhibitor bestätigten die funktionelle Verknüpfung von Strahlen-induzierter Aktivierung des EGFR und Strahlen-induzierter Migrationssteigerung. Demgegenüber wurde nach Bestrahlung mit schweren Kohlenstoffionen keine gesteigerte Aktivität des EGFR festgestellt. Außerdem führte die Schwerionenbestrahlung in beiden Glioblastomzelllinien ausschließlich zu einer Hemmung der Zellmigration. Die erhaltenen *in vitro* Ergebnisse geben Hinweise auf ein in Glioblastomen mögliches erhöhtes Risiko einer Rezidivbildung nach einer konventionellen Radiotherapie mit Photonen. Bei der modernen Schwerionentherapie kann dieses Risiko aufgrund der effektiven, Strahlen-vermittelten Migrationshemmung weitestgehend ausgeschlossen werden. Von besonderer Bedeutung ist zukünftig die Charakterisierung der Strahlenbiologie in der *in vivo* Situation, da eine Übertragung der *in vitro* Ergebnisse durch die Vielzahl pro- und antimigratorischer Signale im Tumorgewebe nur sehr eingeschränkt möglich ist. Sollte sich die Strahlen-induzierte Migrationssteigerung auch *in vivo* bestätigen, wäre es sinnvoll den Einsatz von Migrationsinhibitoren als Begleittherapie zur Bestrahlung zu testen.

1. Einleitung

1.1. Krebs

Unter dem Begriff Krebs werden alle bösartigen Neubildungen im menschlichen Körper einschließlich der Lymphome und Leukämien zusammengefasst, welche in den verschiedensten Organen des Körpers auftreten und von verschiedenen Zellarten ausgehen können. Laut den aktuellen Krebserkrankungszahlen des Robert-Koch-Institutes (RKI) für Deutschland sind im Jahr 2008 rund 470.000 Menschen neu an Krebs erkrankt (Robert Koch-Institut 2012). Die Prognose für 2012 lag bei 490.000 Neuerkrankungen. Demzufolge steigt die Zahl der Neuerkrankungen, was nicht zuletzt in der zunehmenden Zahl älterer Menschen begründet ist.

Mittlerweile sind mehr als 300 Krebsarten bekannt, welche in solide Tumoren, die Geschwülste bilden, und Erkrankungen des Blut- und Lymphsystems eingeteilt werden. Zu den häufigsten Krebserkrankungen zählen laut der Studie des RKI Brustkrebs bei Frauen (71.700 Fälle in 2008) und Prostatakrebs bei Männern (63.400 Fälle in 2008). Demgegenüber kommen Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS) mit knapp 7.000 Neuerkrankungen in 2008 nur recht selten vor (entspricht 1,4 % der Gesamtzahl). 95 % davon betreffen das Gehirn einschließlich Hirnstamm. Die restlichen 5 % verteilen sich auf Erkrankungen der Hirnhäute, der Hirnnerven, der Rückenmarkshäute, des Rückenmarks und der Spinalnerven im Rückenmarkkanal. Der Ursprung der Hirntumoren liegt in den Gliazellen, Nervenscheiden und Hirnhäuten. Bösartige Veränderungen der glialen Stützzellen des ZNS führen zu Gliomen, zu denen Glioblastome, Astrozytome und andere Unterarten gehören.

Das Glioblastom wird aufgrund der großen Variabilität der Zellmorphologie auch *Glioblastoma multiforme* genannt und ist eine besonders bösartige Form der Gliome (World Health Organization WHO Grad IV). Es zählt dabei mit einem Anteil von rund 50 % zu den häufigsten (Abbildung 1; Preusser et al. 2011) und kann in jedem Lebensalter auftreten. Betroffen sind allerdings meist ältere Menschen (Frauen im Mittel mit 68 Jahren, Männer mit 64 Jahren). Die Überlebensprognose für die Patienten ist sehr gering. Weniger als 5 % der Glioblastompatienten leben nach der Erkrankung länger als fünf Jahre (Becker und Yu 2012).

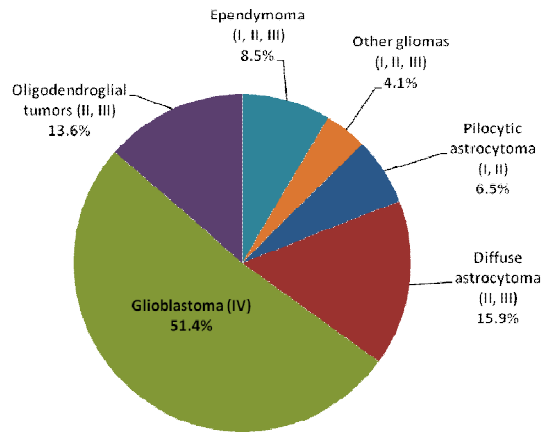


Abbildung 1: Relative Häufigkeiten der Gliome (Preusser et al. 2011)

Dargestellt sind die relativen Häufigkeiten der verschiedenen Formen von Gliomen einschließlich ihres WHO Grades (in Klammern dargestellt).

1.2. Tumorthherapie

Die Standardtherapie bei Glioblastomen beinhaltet zunächst die neurochirurgische Entfernung des Tumors. Trotz einer makroskopisch vollständigen Resektion verbleiben aufgrund der diffusen Wachstumsgrenzen und des stark infiltrierenden Wachstums einige Tumorzellen im Gewebe. Diese sollen durch eine kombinierte Radiochemotherapie mit anschließender adjuvanter Chemotherapie mit Temozolomid an der Bildung von Rezidiven oder Metastasen gehindert werden (Becker und Yu 2012). Bestrahlt werden Glioblastome dabei mit einer Gesamtdosis von 60 Gy Photonen in 30 Fraktionen zu jeweils 2 Gy. Abbildung 2 zeigt ein typisches Therapieschema für neu diagnostizierte Glioblastome.

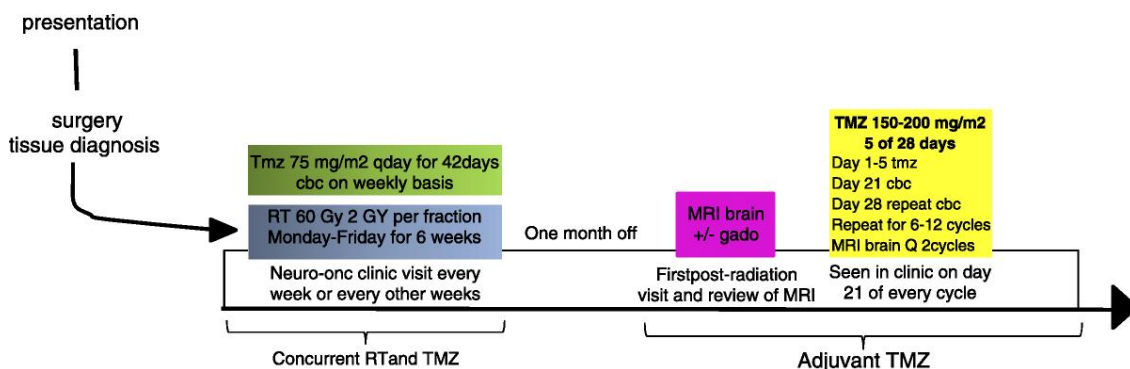


Abbildung 2: Therapieschema für neu diagnostizierte Glioblastome (Becker und Yu 2012)

Auf die operative Entfernung des Tumors folgt eine Chemoradiotherapie mit 60 Gy Gesamtdosis appliziert in 2 Gy Fraktionen über 6 Wochen und einer Behandlung mit Temozolomid (75 mg/m² täglich) für 42 Tage. Einen Monat später erfolgt eine Magnetresonanztomographie (MRT bzw. MRI) mit Gadolinium. Im Anschluss startet die adjuvante Therapie mit Gabe von Temozolomid alle 5 Tage in einem 28 Tage Zyklus (150-200 mg/m²) über 6 bis 12 Zyklen mit begleitendem MRT alle 2 Zyklen und regelmäßiger Analyse des Blutbildes (complete blood count, cbc).

Während bei der direkten Wirkung die DNA selbst ionisiert wird, kommt es bei der indirekten Wirkung zunächst zur Radikalbildung. Dabei entstehen in den Zellen, aufgrund ihres hohen Wassergehaltes, vorwiegend OH- und H-Radikale sowie Peroxide aus der Ionisation des Wassers, welche mit der DNA reagieren (Hall und Giaccia 2006). Zu den durch die Bestrahlung hervorgerufenen DNA-Schäden zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenschäden sowie fehlerhafte DNA-Protein-Verbindungen. Diese werden mit unterschiedlicher Effizienz von der Zelle repariert. Bei einer unzureichenden Reparatur, was insbesondere bei Doppelstrangbrüchen der Fall ist, kommt es zu Chromosomenaberrationen und in der Folge zum Verlust der Teilungsfähigkeit der Zellen, dem klonogenen Zelltod oder zum programmierten Zelltod (Apoptose; Thompson 2012).

Unterschieden werden zwei Arten von ionisierender Strahlung: die Photonenstrahlung (Röntgen- und γ -Strahlung) und die Teilchenstrahlung. Zur Teilchenstrahlung gehören neben ungeladenen Neutronen geladene Teilchen wie Ionen, Elektronen und Protonen. Ionen, die schwerer sind als Wasserstoff, werden dabei als schwere Ionen bezeichnet. Sowohl Photonen als auch Teilchenstrahlung führen über die primäre Ionisation zur Emission von Sekundärelektronen, welche weitere Ionisationsereignisse auslösen können. Die Art der Energiedeposition ist dabei sehr verschieden. Bei der Photonenstrahlung überwiegen, abhängig von der Energie der Photonen, der Photoeffekt, Comptonprozesse und Paarbildung. Charakteristisch für niedrigenergetische Photonenstrahlung ist der Photoeffekt, bei dem Elektronen aus einer inneren Elektronenschale eines Atoms herausgeschlagen werden. Dabei überträgt sich die Gesamtenergie der Strahlung auf das Elektron. In der Tiefendosisverteilung (Abbildung 4) verdeutlicht sich dies durch einen exponentiellen Abfall der relativen Dosis mit zunehmender Eindringtiefe. Der Comptoneffekt dominiert hingegen bei hochenergetischen Photonen und führt durch eine teilweise Übertragung der Strahlenenergie auf ein Elektron dazu, dass dieses die äußere Atomhülle verlässt. Die exponentielle Verfallskurve verläuft in diesem Fall flacher.

Die Wirkung der Teilchenstrahlung basiert hauptsächlich auf Coulomb-Wechselwirkungen mit der Elektronenhülle der Atome. Dies führt zu einem Energieverlust und der Emission von Sekundärelektronen. Der Energieverlust ist abhängig von der Geschwindigkeit des Teilchens, der effektiven Ladung sowie der Elektronendichte im Zielvolumen. Eine abnehmende Teilchengeschwindigkeit (-energie) hat einen Anstieg des Energieverlustes zur Folge. Beim Durchdringen von Materie werden die Teilchen mit der Zeit und der Strecke langsamer und die Interaktionszeit steigt, was in direktem Zusammenhang mit der Anzahl und Stärke der

Wechselwirkungen mit Elektronen der Atomhüllen steht. In einem nach William Henry Bragg als „Bragg Peak“ benannten Punkt stoppt das Teilchen und gibt seine komplette Energie ab. Dieser charakteristische Punkt ist im Tiefendosisprofil als scharfes Maximum erkennbar und kennzeichnet die maximale Reichweite des Ions (Abbildung 4). Diese ist abhängig von der Art der Teilchen und ihrer Geschwindigkeit (Energie; Kraft 2000).

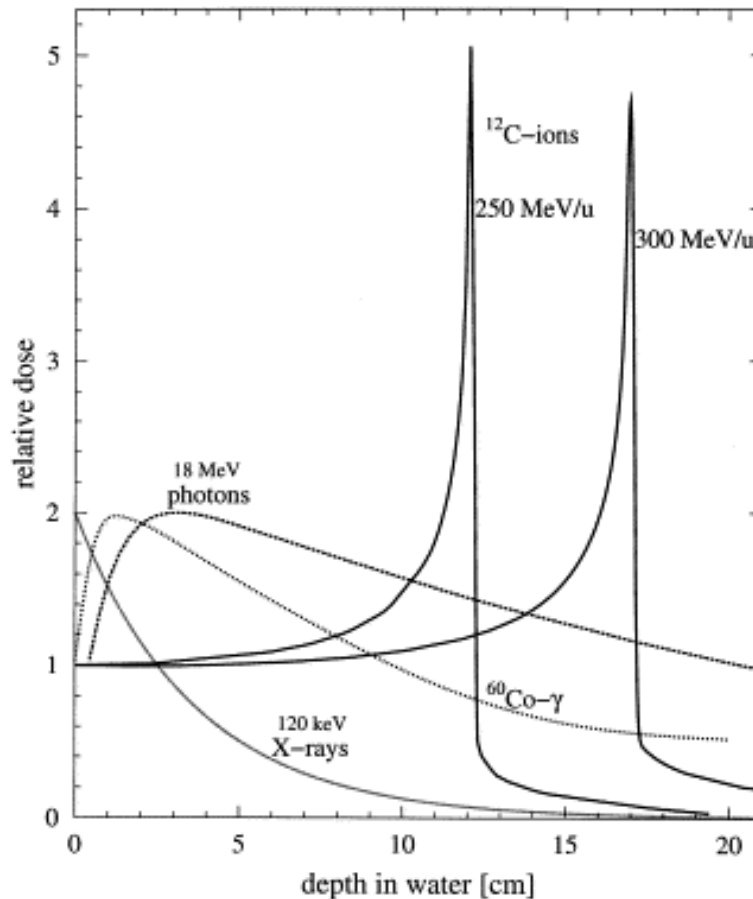


Abbildung 4: Tiefendosisprofile von Photonen- und Teilchenstrahlung (Kraft 2000)

Die Dosisprofile verschiedener Strahlenarten zeigen einen unterschiedlichen Verlauf der relativen Dosis (y-Achse) mit zunehmender Eindringtiefe in Wasser (x-Achse). Bei Photonen nimmt die deponierte Dosis exponentiell ab, während ^{12}C -Ionen ihre gesamte Energie in einer definierten Tiefe („Bragg Peak“) abgeben.

Die Dosis ist die zentrale Messgröße ionisierender Strahlung. Sie gibt die pro Masseneinheit Δm absorbierte Energie E_{abs} an (Formel 1) und hat die Einheit Gray (Gy).

$$D [\text{Gy}] = \frac{E_{\text{abs}}}{\Delta m} \quad 1 \text{ Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}}$$

Formel 1: Definition der Strahlendosis D

Die Strahlendosis D ist definiert als die pro Masseneinheit Δm absorbierte Energie E_{abs} . Sie hat die Einheit Gray (Gy).

Eine weitere charakteristische Größe in der Strahlentherapie ist der lineare Energietransfer (LET), welcher definiert ist als der mittlere Energieverlust ΔE über eine mittlere Strecke Δs eines primären, ionisierenden Teilchens (Formel 2; Hall und Giaccia 2006). Die Einheit ist keV/ μm .

$$LET = \frac{\Delta E}{\Delta s} \left[\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right]$$

Formel 2: Definition des linearen Energietransfers (LET)

Der lineare Energietransfer LET ist definiert als der mittlere Energieverlust ΔE einer Strahlung über eine mittlere Strecke Δs und hat die Einheit keV/ μm .

Über den LET lässt sich die Ionisationsdichte, das heißt die Zahl der Ionisationsereignisse, und damit die Effektivität der Strahlenwirkung abschätzen. Demnach unterscheidet man zwischen dicht-ionisierender Strahlung (Hoch-LET) und dünn-ionisierender Strahlung (Niedrig-LET; Abbildung 5). Zu Letzterem zählt die Photonenstrahlung, da sie ihre Energie homogen über das Volumen abgibt und über eine definierte Strecke wenig Energie verliert. Dies führt zu einer geringen Ionisationsdichte in der biologischen Materie, wodurch in der DNA vereinzelte, meist reparable Einzelstrangbrüche entstehen. Bei der Teilchenstrahlung (z. B. ^{12}C -Ionen), die zur Hoch-LET Strahlung gehört, kommt es auf derselben Strecke zu wesentlich mehr Ionisationsereignissen und damit zu einer lokalen Anhäufung komplexer Schäden, die schwer zu reparieren sind.

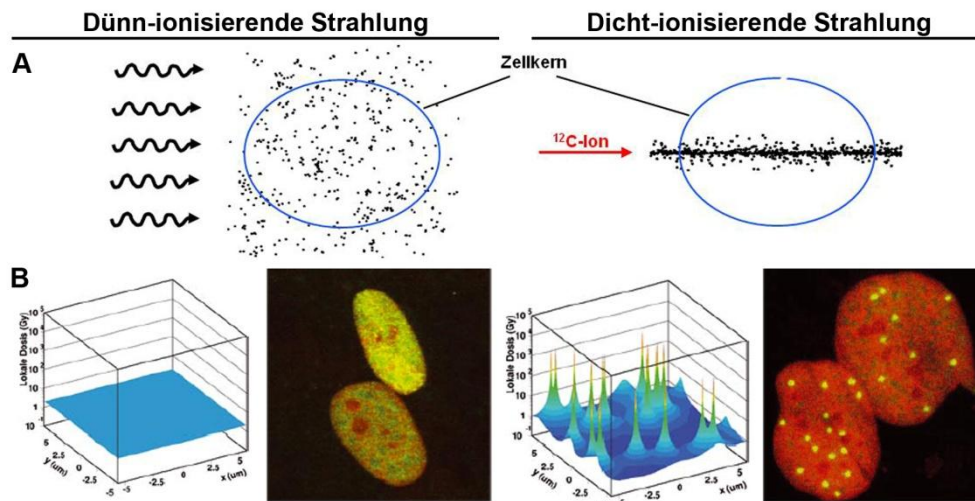


Abbildung 5: Vergleich von dünn- und dicht-ionisierender Strahlung (Kraft 2008)

(A) Die schematische Darstellung zeigt die Verteilung von Ionisationsereignissen (schwarze Punkte), wie sie nach Bestrahlung mit dünn- (Röntgenstrahlung) oder dicht-ionisierender (^{12}C -Ionenstrahlung) Strahlung im Bereich von Zellkernen (blauer Kreis) auftreten können.

(B) In den Diagrammen ist die lokale Energiedisposition auf der Fläche eines Zellkerns dargestellt. Die erzeugten DNA-Schäden in Zellkernen sind in den Mikroskopiebildern gelb gefärbt.

Aufgrund der unterschiedlichen Ionisationsdichten verschiedener Strahlenarten können sich diese bei identisch verabreichter Dosis hinsichtlich der biologischen Wirkung auf die Zellen stark unterscheiden. Zur Differenzierung von dicht- und dünn-ionisierender Strahlung wurde daher eine relative Bezugsgröße, die sogenannte Relative Biologische Wirksamkeit (RBW), eingeführt. Diese ist definiert als der Quotient aus der Dosis einer Referenzstrahlung und der Dosis der zu untersuchenden Strahlung (Formel 3), bei der die gleiche biologische Wirkung erzielt wird, z. B. das 10 % Überleben von Zellen. Als Referenzstrahlung dient meist eine 250 keV Röntgenstrahlung.

$$RBW = \frac{D_{Röntgen}}{D_{Test}}$$

Formel 3: Definition der Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW)

Die Relative biologische Wirksamkeit RBW ist definiert als der Quotient aus der Dosis der Referenzstrahlung $D_{Röntgen}$ und der Dosis der zu untersuchenden Strahlung D_{Test} , bei der die gleiche biologische Wirkung (z. B. 10 % Zellüberleben) eintritt.

1.2.2. Strahlentherapie bei Tumoren

Wie zuvor beschrieben umfasst die Therapie von Glioblastomen eine fraktionierte Photonenbestrahlung (30 Fraktionen von je 2 Gy) nach operativer Entfernung des Tumors, wodurch die Überlebenszeit für den Patienten deutlich verlängert wird. Ziel der Radiotherapie von Tumoren ist es, die Proliferationskapazität der Tumorzellen durch Induktion von DNA-Schäden zu unterbinden. Der Verlust der Teilungsfähigkeit beruht auf verschiedenen Effekten. Zum einen können irreparable Chromosomenschäden dazu führen, dass die Zelle noch einige Mitosen (< 5) durchläuft, dann aber die Teilung nicht mehr vollenden kann (Mitosetod). Eine andere Variante ist der Interphasetod, bei dem die Zelle nicht mehr die Mitosephase erreicht, sondern direkt in der Interphase, in der sie bestrahlt wurde, stirbt (Hall und Giaccia 2006).

Durch den Verlust der Teilungsfähigkeit infolge der Bestrahlung soll das Tumolvolumen verringert bzw. der Tumor völlig vernichtet werden. Der Ablauf einer Strahlentherapie und der Einsatz der verschiedenen Strahlenarten sind stark abhängig vom Ort und der Art des Tumors. Die örtliche Begrenzung der Bestrahlung spielt eine wichtige Rolle, um das angrenzende Normalgewebe zu schonen und damit die Risiken von Nebenwirkungen zu minimieren.

Wie bereits erwähnt, wird derzeit in der Strahlentherapie von Tumoren hauptsächlich mit Photonenstrahlung gearbeitet. Allerdings gibt es große Fortschritte im Einsatz neuartiger

Bestrahlungsmethoden wie der Bestrahlung mit Protonen oder schweren Kohlenstoffionen. Derzeit gibt es weltweit 39 Zentren, in denen Tumorpatienten mit Teilchenstrahlung (Protonen und ^{12}C -Ionen) behandelt werden (PTCOG 2013). Lediglich fünf dieser Zentren verfügen über eine ^{12}C -Ionentherapie-Anlage. Drei davon stehen in Japan (Chiba, Hyogo und Gunma), eine in China (Lanzhou) und eine in Deutschland (Heidelberg).

Dabei bietet die Tumorthherapie mit schweren Ionen entscheidende Vorteile gegenüber der konventionellen Strahlenbehandlung mit elektromagnetischer Strahlung (Newhauser und Durante 2011). So erreicht die Ionenstrahlung auch tiefliegende Tumoren, die mit hoher Präzision und sehr geringer Dosisapplikation im umliegenden Normalgewebe bestrahlt werden können. Grundlage dafür sind die physikalischen Eigenschaften der Ionen, welche, je nach Geschwindigkeit bzw. Energie, tief ins Gewebe eindringen können und dort ihre gesamte Energie freisetzen, wie es das Tiefendosisprofil (Abbildung 4) zeigt. Die maximale Strahlendosis kann so genau im Tumor appliziert werden, wodurch das gesunde Gewebe minimal belastet wird. Das ist besonders bei Tumoren in der unmittelbaren Nähe von strahlenempfindlichen Organen (z. B. Sehnerv oder Hirnstamm) wichtig. Außerdem besitzt die Ionenstrahlung eine erhöhte biologische Wirksamkeit gegenüber der Photonenstrahlung, was vor allem bei der Therapie von langsam wachsenden und strahlenresistenten Tumoren von Nutzen ist.

1.2.3. Schwerionenbestrahlung an der GSI Darmstadt

Ein Pilotprojekt der Gesellschaft für Schwerionenforschung in Darmstadt legte in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg und dem Forschungszentrum Rossendorf in Dresden den Grundstein für die Tumorthherapie mit Schwerionen in Europa. Zwischen 1997 und 2009 wurden an der GSI 440 Patienten erfolgreich mit schweren Kohlenstoffionen bestrahlt (PTCOG 2013). Der Erfolg dieser Studie führte zum Aufbau des Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum (HIT), wo seit 2009 bereits über 600 Patienten im klinischen Routinebetrieb behandelt wurden (Debus und Haberer 2012).

Die Teilchenbeschleunigeranlage der GSI Darmstadt wird weiterhin für die Forschung genutzt, um die Schwerionenbestrahlung zu optimieren und vor allem auch die Wahrscheinlichkeit von Spätfolgen weiter zu senken (Newhauser und Durante 2011). Die Anlage besteht aus vier Hauptgeräten, dem Linearbeschleuniger UNILAC (Universal Ion

Linear Accelerator), dem Ringbeschleuniger SIS18 (Schwerionensynchrotron 18), dem Experimentierspeicherring ESR und dem Fragmentseparator FRS (Abbildung 6).

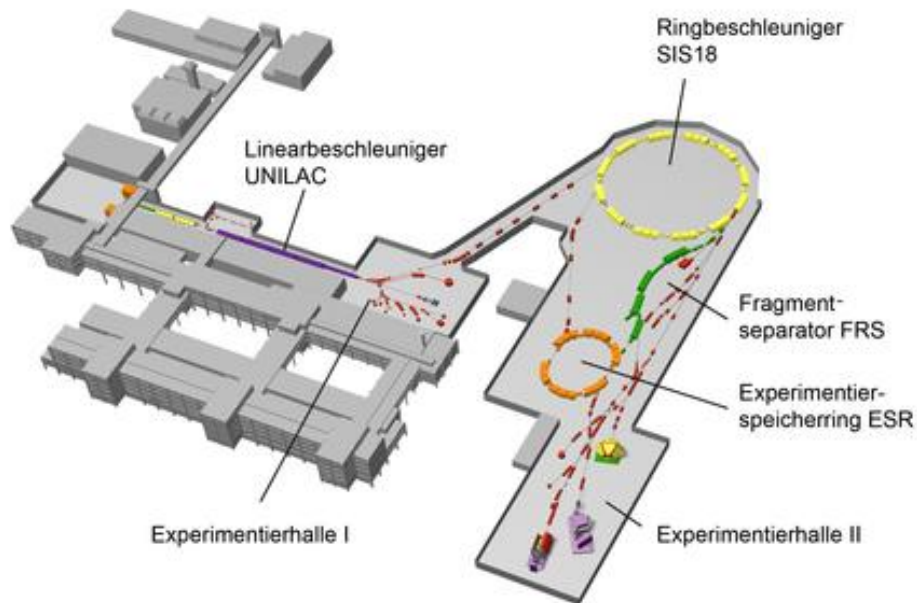


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Beschleunigeranlage der GSI Darmstadt (www.gsi.de)

Die Beschleunigeranlage der GSI umfasst vier Hauptgeräte: den Linearbeschleuniger UNILAC, den Ringbeschleuniger SIS18, den Fragmentseparator FRS und den Experimentierspeicherring ESR. In den Beschleunigern werden Ionen auf bis zu 90 % Lichtgeschwindigkeit beschleunigt und gelangen dann in die Experimentierhallen.

Die Startlinie der Beschleunigeranlage bilden die Ionenquellen, wo die geladenen Teilchen entstehen. Kleine Mengen des entsprechenden Elementes werden dort erhitzt und Elektronen mit einem künstlichen Blitz von den Atomen getrennt. Die dadurch elektrisch geladenen Ionen werden dann mithilfe eines Magnetfeldes in den Beschleuniger gezogen. Im Linearbeschleuniger werden diese auf einer Länge von 120 m durch hochfrequente elektrische Felder auf bis zu 20 % Lichtgeschwindigkeit gebracht. Der UNILAC dient somit als Vorbeschleuniger für den angeschlossenen Ringbeschleuniger, allerdings wird er auch als Teilchenlieferant für Versuche mit Ionen niedriger Energien ($< 15 \text{ MeV/u}$) genutzt.

Im Ringbeschleuniger SIS18 findet die Beschleunigung der Ionen auf bis zu 90 % Lichtgeschwindigkeit statt. Er hat einen Umfang von 216 m und besteht aus zahlreichen Umlenk- und Fokussierungsmagneten, welche die Ionen bei ihren mehreren hunderttausenden Umläufen auf der Kreisbahn halten, beschleunigen und ihnen sehr hohe kinetische Energien verleihen. Anschließend werden sie direkt zu den Experimentierhallen gelenkt oder in den Speicherring ESR geleitet, wo sie mit hohen Geschwindigkeiten gespeichert und zum Experimentieren genutzt werden können. Der Fragmentseparator FRS ermöglicht

Experimente mit neuen oder sehr seltenen Isotopen, was aber bei der Tumorthherapie mit schweren Ionen keine Rolle spielt.

Die Bestrahlung eines Tumors bedarf nicht nur einer Beschleunigung von Kohlenstoffionen, sondern auch spezieller Techniken für die präzise Bestrahlung komplex geformter Tumoren. Die Breite eines Bragg-Peaks, in dem die Ionen ihre Energie abgeben, ist für eine homogene Bestrahlung des gesamten Tumors nicht ausreichend. Mit einem energievariablen Beschleuniger können mehrere Bragg-Peaks unterschiedlicher Energie hintereinander gelegt werden (Abbildung 7). Der dadurch entstehende ausgedehnte Bragg Peak („spread out bragg peak“ SOBP) erlaubt eine gleichmäßige Dosisverteilung über die gesamte Tumortiefe (Scholz 2000).

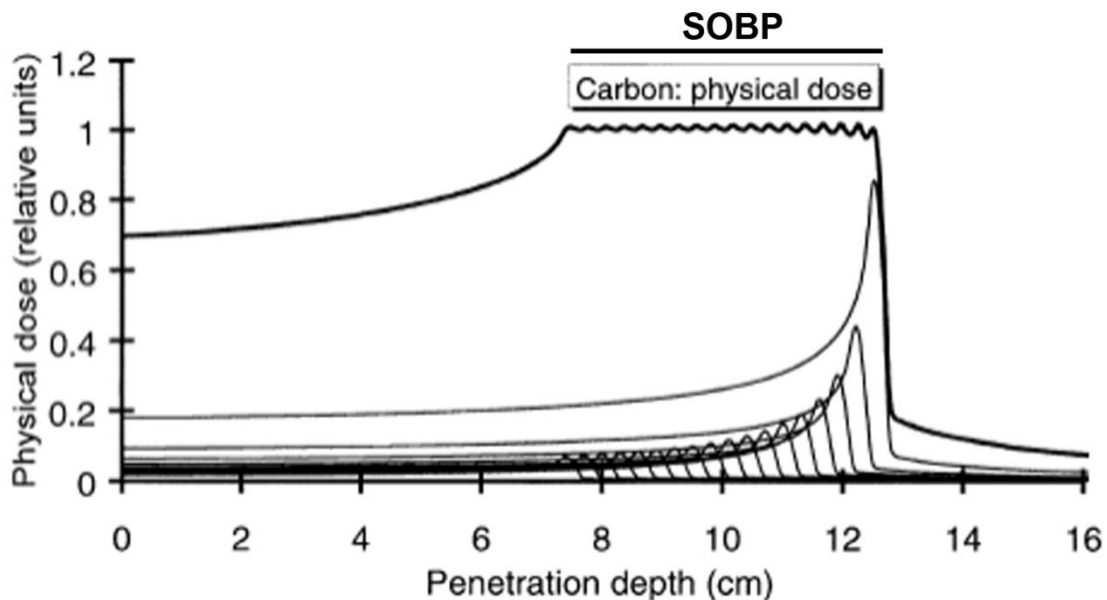


Abbildung 7: Darstellung eines ausgedehnten Bragg-Peaks (Scholz 2000)

Durch Veränderung der Energie und Intensität des Ionenstrahls können mehrere Bragg-Peaks zu einem ausgedehnten Bragg-Peak (SOBP) übereinander gelegt werden, wodurch für die komplette Tumortiefe eine gleichmäßige Dosisdeposition erreicht wird.

Zusätzlich zur Aufweitung des Bragg-Peaks wurde an der GSI für die tumorkonforme Bestrahlung das Raster-Scan-Verfahren entwickelt. Dieses dreidimensionale System ermöglicht eine Veränderung der Strahlposition entlang der X- und Y-Achsen durch Ablenkung des Strahls mittels Dipolmagneten (Abbildung 8). Der Tumor wird dazu in Schichten gleicher Reichweite unterteilt und der Strahl rasterförmig über die Flächen der Schichten geleitet (Kraft 2000). Dies erlaubt eine zielgenaue und vollständige Bestrahlung des Tumorumfanges.

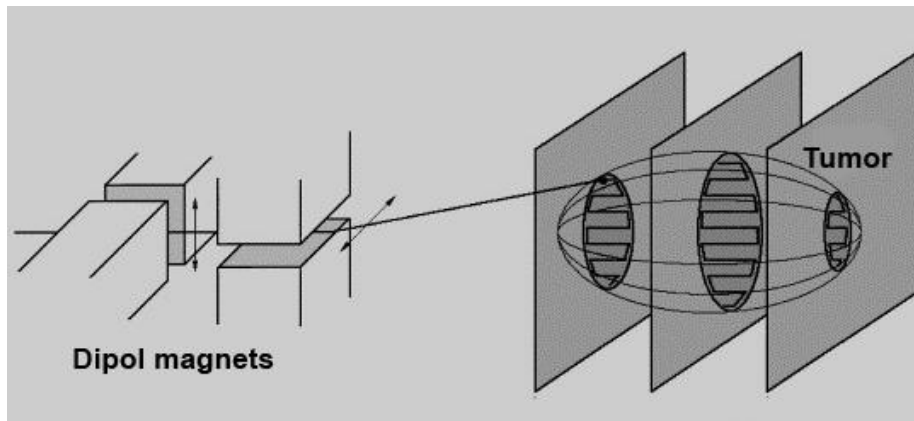


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Raster-Scan-Verfahrens (Kraft 2000)

Beim Raster-Scan-Verfahren wird der Tumor in Schichten gleicher Reichweite aufgeteilt, die mit dem über Dipolmagnete abgelenkten Ionenstrahl abgerastert werden. Dies führt zur zielgenauen und vollständigen Bestrahlung des Tumors.

Bei der Bestrahlung von Hirntumoren an der GSI bediente man sich, neben den bereits beschriebenen Verfahren, einer weiteren Technik, die eine noch präzisere Bestrahlung erlaubt. Dabei handelte es sich um die „Intensitätsmodulierte Partikeltherapie“ (IMPT). Ähnlich zur „Intensitätsmodulierten Radiotherapie“ (IMRT) mit Röntgenstrahlung werden hierbei mehrere Strahlenfelder verwendet und die Reichweite und Intensität des Strahls verändert. Allerdings gibt es bei der IMPT lediglich zwei oder drei Eingangskanäle, während bei der IMRT sechs bis zehn Kanäle benutzt werden. Die Bestrahlungspläne für eine IMRT und IMPT sind in Abbildung 9 vergleichend dargestellt. Der Tumor ist darin rot bzw. weiß umrandet und die applizierte Dosis ist ansteigend farblich von violett/blau (10 % Zieldosis) bis rot (100 % Zieldosis) markiert.

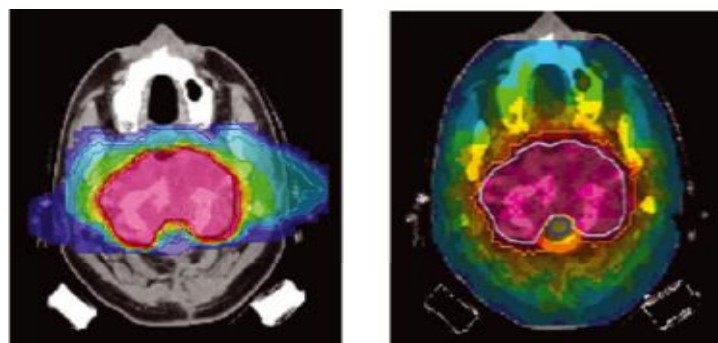


Abbildung 9: Vergleich der Bestrahlungspläne einer ^{12}C - (IMPT, links) und Röntgenbestrahlung (IMRT, rechts; Kraft 2008)

In den Bestrahlungsplänen für die Therapie eines großen Zielgebietes im Schädelbasisbereich (rot bzw. weiß umrandet) reicht die Farbskala der applizierten Dosis von rot, 100 % der Zieldosis, bis zu violett/blau mit 10 % Dosisdeposition. Während bei der Röntgenbestrahlung (IMRT, rechts) neun Eingangskanäle verwendet werden, sind es bei der ^{12}C -Bestrahlung (IMPT, links) nur zwei Kanäle. Die Belastung des gesunden Gewebes ist bei der IMPT deutlich kleiner.

Die Bestrahlungspläne verdeutlichen, dass das umliegende gesunde Gewebe bei der IMRT-Bestrahlung stärker belastet wird als bei der IMPT, trotz ähnlich guter Anpassung der Dosisapplikation an das Tumolvolumen.

Die Ergebnisse zahlreicher Studien zur Bestrahlung von Hirntumoren an der GSI, in denen das intensitätsmodulierte Raster-Scan-Verfahren verwendet wurde, zeigten eine hohe Effektivität der Tumorkontrolle und geringe Toxizität für den Patienten (Schulz-Ertner et al. 2007a; Schulz-Ertner et al. 2007b; Combs et al. 2009b). Dieses weltweit präziseste Bestrahlungsverfahren wurde am HIT übernommen. Dabei sind die technischen Entwicklungen längst nicht abgeschlossen. So verfügt das HIT unter anderem über die erste um 360° drehbare Bestrahlungsquelle (Gantry), die eine Bestrahlung aus jeder beliebigen Richtung erlaubt (Debus und Haberer 2012). Zusätzlich wird an der GSI Darmstadt an neuen Verfahren und Apparaturen gearbeitet, mit denen z. B. die Bestrahlung bewegter Organe, wie der Lunge, ermöglicht wird. So ist es bereits gelungen einen künstlichen Tumor in einem atmenden Thoraxmodell zu bestrahlen, ähnlich wie es am echten Patienten möglich wäre (Steidl et al. 2012).

Mit der Optimierung der Patientenbestrahlung in technischer Hinsicht ist es allerdings nicht getan. Ionisierende Strahlung hat nicht nur Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit von Tumorzellen. Sie betrifft eine Vielzahl zellulärer Prozesse, da sie vor allem wichtige regulatorische Signalwege beeinflusst. Das kann z. B. zu einem veränderten Migrationsverhalten führen. Eine gesteigerte Migration führt zur Bildung von Rezidiven oder Metastasen und schränkt den Erfolg der Therapie ein. Daher sind Untersuchungen der Strahlenwirkung auf die Zellmigration und die Aufklärung der daran gekoppelten Regulationswege von immenser Bedeutung.

1.3. Migration von Zellen

Die Zellmigration ist ein essentieller Prozess in einer Vielzahl biologischer Vorgänge, angefangen bei der embryonalen Entwicklung, in der die Migration von Zellen von der Gastrulation bis zur Ausbildung des Nervensystems eine zentrale Rolle spielt (Lauffenburger und Horwitz 1996). Aber auch im erwachsenen Organismus basieren wichtige homöostatische Vorgänge, wie die Erneuerung der Haut, die Wundheilung oder die Immunantwort, auf der Motilität von Zellen. Allerdings kann die Migration auch zu krankhaften Phänomenen beitragen. Dazu zählen neben Gefäßerkrankungen und chronischen Entzündungskrankheiten

auch die Bildung von Tumoren und die Metastasierung (Webb et al. 2005). Dabei können sich Zellen nicht nur auf oder in der extrazellulären Matrix fortbewegen, sondern auch auf anderen Zellen oder durch diese hindurch, wie es bei der Wanderung von Leukozyten der Fall ist (Carman 2009). Die Zellmigration ist ein mehrstufiger, zyklischer Prozess, der eine Vielzahl komplexer Regulationsmechanismen involviert. Die folgenden Abschnitte beschreiben die einzelnen Phasen der Migration und die an der Regulation beteiligten Moleküle.

1.3.1. Phasen der Zellmigration

Die fünf Hauptphasen beinhalten die morphologische Polarisierung der Zelle, die Bildung von Zellfortsätzen an der Zellfront, die Ausbildung von Adhäsionspunkten zwischen Zelle und Substrat, gefolgt von Kontraktionen des Zellkörpers und schlussendlich dem Ablösen der Adhäsionen am Ende der Zelle (Lauffenburger und Horwitz 1996). Der Ablauf der Zellmigration ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

Der initiale Schritt ist die Polarisierung des Zellkörpers. Durch eine räumliche Asymmetrie bilden sich eine Zellfront und ein hinteres Zellende. In diesen beiden Bereichen laufen sehr verschiedene molekulare Prozesse ab, wodurch intrazelluläre Kräfte entstehen, die zu einer Bewegung der Zelle führen. Dies wird häufig durch einen Konzentrationsgradienten eines äußeren Stimulus gefördert, ist aber nicht zwingend davon abhängig und kann auch in einer makroskopisch homogenen Umgebung stattfinden (Lauffenburger und Horwitz 1996).

Eine wichtige Konsequenz der Zellpolarisierung ist die aktive Ausstülpung der Membran und Bildung von Zellfortsätzen an der Zellfront. Diese ist gekoppelt an die lokale Polymerisation und Zusammenlagerung von Aktinfilamenten. Die typischen Zellfortsätze sind Lamellipodien und Filopodien, welche sich in ihrer Struktur und Funktion unterscheiden. Während die Aktinfilamente in Lamellipodien ein verzweigtes Netzwerk ausbilden, sind sie in Filopodien in langen parallelen Bündeln organisiert (Ridley et al. 2003). Letztere fungieren dabei als Sensoren und „untersuchen“ die Umgebung der Zelle. Lamellipodien dagegen können sehr lange Fortsätze in der extrazellulären Matrix bilden und ziehen so die Zelle durch das Gewebe. Weitere Arten von Membranfortsätzen sind die Invadopodien und das „membrane blebbing“ (Ridley 2011). Invadopodien sind an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt und spielen daher vor allem bei der Invasion eine wichtige Rolle. Das „membrane blebbing“ tritt unter bestimmten Bedingungen bei der gerichteten Zellmigration auf. Die verschiedenen Typen von Zellfortsätzen können parallel an der Zellfront entstehen und zusammen zur Fortbewegung der Zellen durch komplexe Gewebe beitragen.

Die ausgebildeten Membranausstülpungen müssen im nächsten Schritt durch Verankerung der Zelle am Substrat stabilisiert werden. An der Zellfront kommt es dabei vermehrt zur Bildung von Adhäsionspunkten, an der je nach Zelltyp viele verschiedene Rezeptoren der Zellmembran beteiligt sind. Die Familie der Integrine spielt dabei eine zentrale Rolle. Sie unterstützen die Adhäsion an der extrazellulären Matrix oder zwischen einzelnen Zellen, indem sie diese über Adapterproteine mit den Aktinfilamenten im Innern der Zelle verbinden (Geiger et al. 2001). Dafür kommt es an der Zellperipherie und der Zellfront zur Anreicherung von Integrinmolekülen und anderen Membranproteinen sowie Komponenten des Zytoskeletts. Die Stärke der lokal gebildeten Integrincluster, das heißt der Adhäsion, bestimmt unter anderem die Migrationseffizienz der Zellen. So weisen schnell migrierende Zellen, wie z. B. Leukozyten, wenige bzw. sehr kleine Integrincluster auf, während Zellen mit großen Clustern stark adhären sind und typischerweise nicht oder nur sehr langsam migrieren (Ridley et al. 2003). Die Integrine liefern der Zelle Informationen über den Status der extrazellulären Matrix, um eine Anpassung des dynamischen Zytoskeletts an die jeweiligen Umgebungsbedingungen zu ermöglichen (Galbraith et al. 2002). Außerdem werden über Integrine Zugkräfte aufgebaut, die für eine Bewegung des Zellkörpers nötig sind. Zusätzlich kommt es zu Kontraktionen des Zellkörpers, die auf der Interaktion von Myosin II mit Aktinfilamenten basieren und zur Vorwärtsbewegung des Zellkörpers führen (Lauffenburger und Horwitz 1996). Dies setzt ein effizientes Ablösen der Adhäsionspunkte am hinteren Ende der Zelle voraus. In einigen Zelltypen bestimmt dieser Schritt sogar die allgemeine Migrationsrate. Durch die bei der Vorwärtsbewegung wirkenden Zugkräfte brechen die Verbindungen zwischen den Integrinen und dem Aktinzytoskelett, woraufhin die Integrine auf dem Substrat verbleiben können, während sich der Zellkörper weiter bewegt. Andere Integrinmoleküle werden von der Zelle über endozytotische Vesikel wieder aufgenommen und für die Bildung neuer Adhäsionspunkte verwendet (Lauffenburger und Horwitz 1996). Das Ablösen des Zellendes ist nicht nur der letzte Schritt des Migrationsprozesses, sondern stellt auch den Ausgangspunkt für den nächsten Zyklus dar, denn das Lösen von Adhäsionspunkten am hinteren Ende geht mit einer verstärkten Ausläuferbildung an der Zellfront einher und trägt somit zur Polarisierung der Zelle bei (Ridley et al. 2003).

Die Fortbewegung von Zellen erfolgt entweder durch Migration einer einzelnen Zelle oder im Zellverband. Bei Letzterem ist die Aufrechterhaltung einer stabilen Zell-Zell-Adhäsion essentiell (Abbildung 10).

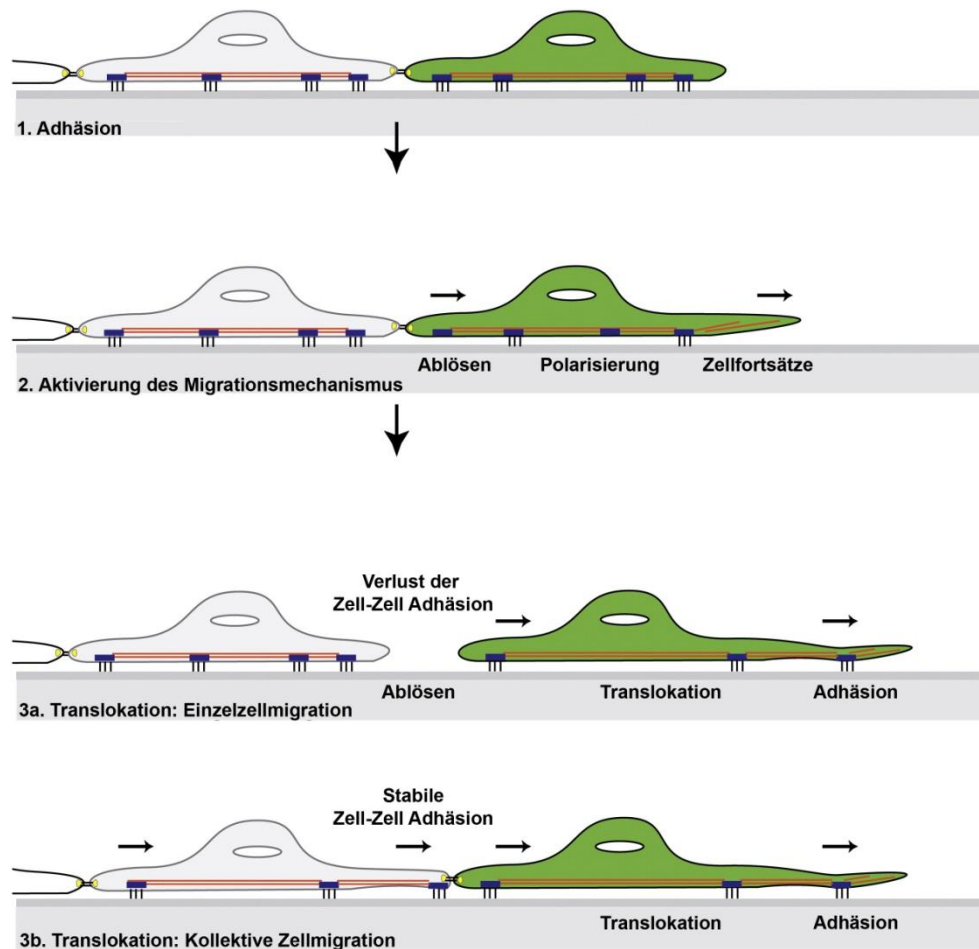


Abbildung 10: Schematischer Ablauf der Zellmigration (Palmer et al. 2011)

Der Prozess der Zellmigration ist in fünf Hauptschritte gegliedert: Polarisierung, Bildung von Zellfortsätzen (Lamellipodien oder Filopodien), Adhäsion, Vorwärtsbewegung des Zellkörpers durch Kontraktion (Translokation) und Ablösen der Adhäsion am hinteren Zellende. Unterschieden wird dabei die Einzelzellmigration (3a) von der Migration im Zellkollektiv (3b), bei der stabile Zell-Zell-Adhäsionen aufrechterhalten werden.

1.3.2. Regulation der Zellmigration

Der komplexe Prozess der Zellmigration basiert auf dem Zusammenspiel einer Vielzahl verschiedener Regulationsmoleküle, die sich je nach Phase unterscheiden. Abbildung 11 gibt einen Überblick über die im Folgenden beschriebenen Regulationsmechanismen in den einzelnen Phasen.

Die Polarität der Zelle wird durch unterschiedliche miteinander verknüpfte Feedbackschleifen reguliert, welche Rho GTPasen, Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K), Integrine, Mikrotubuline und den Transport von Vesikeln involvieren. Die Rho GTPase Cdc42 ist in eukaryotischen Organismen das Hauptregulationsmolekül der Polarisierung und an der Zellfront von migrierenden Zellen aktiv. Sie beeinflusst unter anderem die Anzahl und den Bildungsort von

Lamellipodien (Srinivasan et al. 2003). Außerdem ist Cdc42 an der Lokalisierung des „Microtubule-organizing center“ (MTOC) und des Golgi-Apparates vor dem Zellkern, in Richtung Zellfront, beteiligt (Rodriguez et al. 2003). Das Phosphoinositid PIP₃ ist ebenfalls ein Schlüsselsignalmolekül in der Regulation der Zellpolarisierung und reichert sich in Gegenwart eines chemischen Stimulus an der Zellfront an. Verantwortlich dafür ist PI3K, welches PIP₃ bildet und ebenfalls an der Zellfront akkumuliert. So werden auch kleine äußere Konzentrationsgradienten in der Zelle als Signal amplifiziert und führen zur Migration. An den äußeren Seiten der Zelle sowie dem hinteren Ende führt die Phosphatase PTEN dagegen zum Abbau von PIP₃ und unterstützt damit die Polarisierung (Ridley et al. 2003).

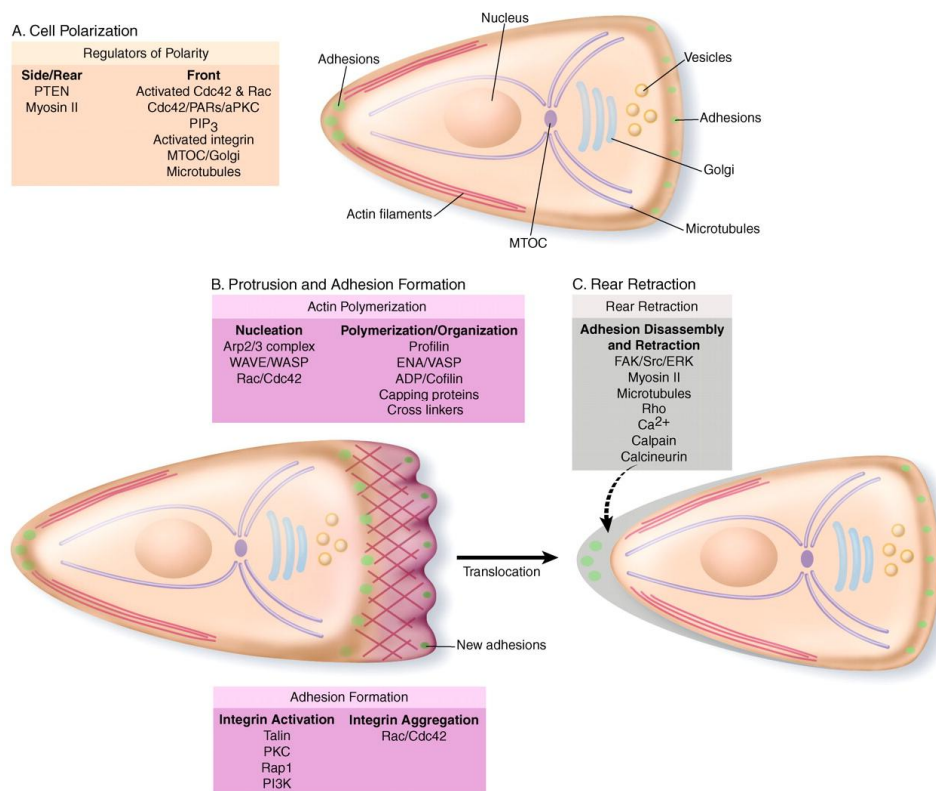


Abbildung 11: Regulation der Zellmigration (Ridley et al. 2003)

Die an der Regulation der Zellmigration beteiligten Proteine sind zugeordnet zu den jeweiligen Phasen schematisch dargestellt. Unter den zahlreichen Signalmolekülen nehmen die GTPasen Rac und Rho sowie verschiedene Kinasen, wie PI3K, ERK und FAK, eine zentrale Rolle ein.

Die anschließende Bildung von Zellfortsätzen wird durch die Aktivierung der GTPase Rac initiiert, was wiederum durch PI3K vermittelt wird (Welch et al. 2003). Durch aktives Rac werden verschiedene Feedbackschleifen ausgelöst, die die gerichtete Bildung von Fortsätzen aufrechterhalten. Rac und Cdc42 regulieren dabei über WASP/WAVE Proteine und den Arp2/3 Komplex die Ausbildung von neuen Aktinverzweigungen. Die Aktinpolymerisierung wird von Proteinen kontrolliert, die unter anderem die Bereitstellung von Aktinmonomeren

(Profilin) regulieren (Ridley et al. 2003). Die so gebildeten Zellfortsätze werden dann von Adhäsionen stabilisiert. Dieser Prozess erfordert die Aktivierung von Integrinen und Bildung von Integrinclustern. Integrine werden durch die Bindung von Talin sowie durch PKC-, Rap1- und PI3K-vermittelte Signalwege aktiviert (Geiger et al. 2001). An der Bildung der Integrincluster sind auch Rac und Cdc42 beteiligt.

Am hinteren Ende der Zelle erfolgt nach der Kontraktion des Zellkörpers das Ablösen von Adhäsionen. Dieser Prozess wird von verschiedenen miteinander verknüpften Signalmolekülen gesteuert. Dazu gehören vor allem FAK und ERK, aber auch Rho und Myosin II. Der intrazelluläre Calcium-Spiegel spielt dabei ebenfalls eine Rolle, da Calcium die Protease Calpain aktiviert, die zur Spaltung von Adhäsionspunkten beiträgt (Glading et al. 2002).

1.3.3. Zellmigration in Tumoren

Die Mortalität und Morbidität von Tumoren wird häufig dadurch bestimmt, wie effizient sich Zellen vom Primärtumor ablösen können. Tumorzellen verfügen über ein breites Spektrum an Migrations- und Invasionsmechanismen (Abbildung 12), die sie sehr effektiv an die vorherrschenden Bedingungen anpassen können.

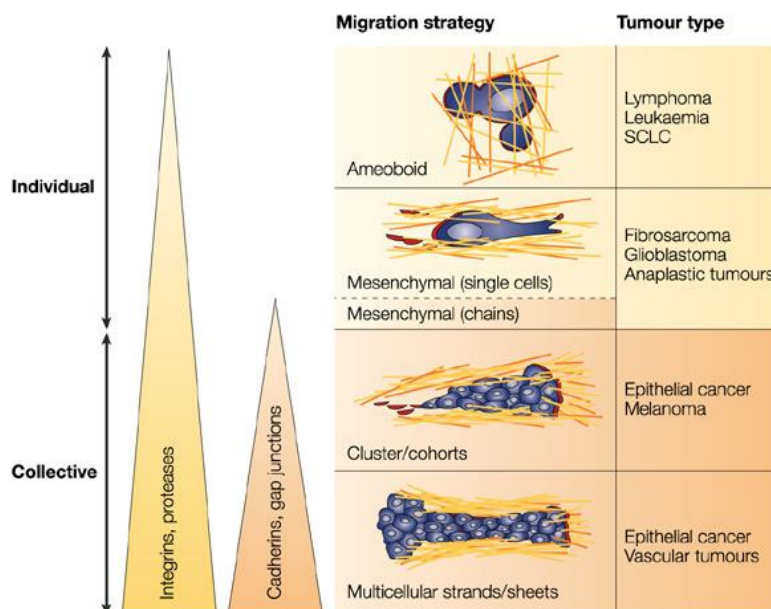


Abbildung 12: Mechanismen der Tumorzellinvasion und -migration (Friedl und Wolf 2003)

Die Migration als Einzelzellen oder im Kollektiv wird von verschiedenen zellulären Faktoren (Dreiecke) beeinflusst. In Lymphomen, Blutkrebs und vielen soliden Tumoren ist vorrangig die Einzelzellmigration des amöboiden oder mesenchymalen Typs zu beobachten. Migrationsstrategien im Kollektiv kommen bei epithelialen und vaskulären Tumoren sowie Melanomen vor.

Tumorzellen migrieren sowohl als Einzelzellen als auch im Kollektiv und werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Umgebungsfaktoren in ihrem Invasions- und Migrationsverhalten beeinflusst. Äußere Faktoren, wie verschiedene Chemokine oder Wachstumsfaktoren (z. B. EGF), induzieren eine migrationsstimulierende Signaltransduktion durch Aktivierung der PI3K, Rac und Rho Signalwege. In vielen Tumoren tritt die Einzelzell- und Zellverbandmigration gleichzeitig auf. Dabei zeigen Blutkrebsformen, Lymphome und die meisten soliden Tumoren (z. B. Glioblastome) vorrangig Einzelzellmigration, während epitheliale Tumoren meist im Kollektiv wandern (Friedl und Wolf 2003).

Einzel migrierende Zellen weisen entweder eine amöboide oder mesenchymale Fortbewegung auf. Die Migration von einzelnen mesenchymalen Zellen erfolgt entsprechend dem typischen Fünfphasenprogramm (siehe 1.3.1) und wurde in Fibrosarkomen, Melanomen und Glioblastomen beobachtet (van Zijl et al. 2011). Die Induktion der Einzelzellmigration, die mit dem Ablösen vom Primärtumor oder vom Zellkollektiv einhergeht, wird vorrangig durch aktivierte TGF- β Signalwege (Smad4, EGFR, RhoC) ausgelöst (Giampieri et al. 2009) und basiert stark auf der Aktivität verschiedener Proteasen. Im Gegensatz zu mesenchymalen Zellen, besitzen amöboide Tumorzellen eine runde Form, sind wenig adhäsiv, wachsen daher in Suspension und bilden keine Fibrinbündel. Sie erreichen durch ihre Protease-unabhängige Invasion Geschwindigkeiten von bis zu 20 μm pro Minute. Verglichen dazu migrieren mesenchymale Zellen sehr langsam mit 0,1-1 μm pro Minute (Friedl und Wolf 2003). Die Invasion von amöboiden Einzelzellen konnte bei Brustkrebs, Lymphomen, dem kleinzelligen Lungenkarzinom und Prostatakrebs gezeigt werden (van Zijl et al. 2011).

Tumorzellen können sehr effektiv ihre Migrationsstrategie umprogrammieren, um so ihre invasiven Eigenschaften stets aufrecht zu erhalten. Dies erfolgt z. B. durch epitheliale mesenchymale Transition (EMT), mesenchymale amöboide Transition (MAT) oder kollektive amöboide Transition (CAT) (Friedl und Wolf 2003). Die Fähigkeit sich den Umgebungsbedingungen anzupassen, schränkt den Erfolg von Tumortherapeutika, die sich gegen Adhäsionsrezeptoren oder Proteasen richten, stark ein. Dabei könnten Therapien, die spezifisch die Motilität von Zellen im Primärtumor hemmen, die Krebsbehandlung erheblich verbessern, indem sie die lokale Invasion limitieren. Vor allem Glioblastome infiltrieren stark in das umliegende Gewebe. Die vom Tumor abgelösten Einzelzellen verbleiben bei der operativen Entfernung des Primärtumors im Normalgewebe und können unter Umständen auch die anschließende Radiotherapie überstehen, wenn sie sich in einem Gebiet befinden, in dem wenig Strahlendosis appliziert wird. Diese Zellen führen schlussendlich zu einem

Rezidiv. Zur Optimierung der Tumorthherapie muss diese auch auf die Einschränkung der Infiltration und Ausbreitung von Tumorzellen in das Normalgewebe ausgerichtet sein. Derzeit sind bereits zahlreiche Migrationsinhibitoren in der klinischen Entwicklung (Palmer et al. 2011). Allerdings ist noch kein Wirkstoff für die Therapie zugelassen.

1.4. Der EGF-Rezeptor

1.4.1. Biologie der ErbB-Rezeptoren

Die Familie der ErbB-Rezeptoren umfasst vier verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs): den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR, auch ErbB1), ErbB2, ErbB3 und ErbB4. Dies sind Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Stoffwechsel, Apoptose und Zellmigration beeinflussen. Neben einer einzelnen membrandurchspannenden Domäne verfügen diese Membranrezeptoren typischerweise über eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne und eine zyttoplasmatische Tyrosinkinasedomäne (Hong et al. 2010). Während ErbB2 nicht in der Lage ist Liganden zu binden, werden von den anderen drei RTKs verschiedene Peptide gebunden, die sich in drei Gruppen einteilen lassen (Abbildung 13).

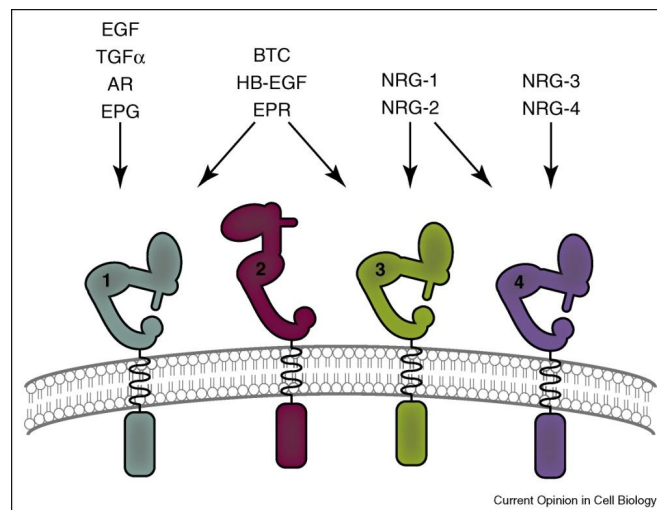


Abbildung 13: Die ErbB Rezeptoren und ihre Liganden (Hynes und MacDonald 2009)

Zur Familie der ErbB Rezeptoren gehören EGFR/ErbB1 (1), ErbB2 (2), ErbB3 (3) und ErbB4 (4), die verschiedene Liganden binden. EGF, TGF- α , AR und EPG werden spezifisch vom EGFR gebunden. BTC, HB-EGF und EPR sind Liganden vom EGFR und ErbB3, während verschiedene NRG entweder an ErbB3 und ErbB4 oder nur an ErbB4 binden. ErbB2 kann keine Liganden binden.

Zu der ersten Gruppe gehören EGF (epidermal growth factor), TGF- α (transforming growth factor), Amphiregulin (AR) und Epigen (EPG). Diese binden spezifisch an den EGFR. Betacellulin (BTC), Heparin-bindendes EGF (HG-EGF) und Epiregulin (EPR) zählen zur zweiten Gruppe und sind Liganden vom EGFR und ErbB4. Verschiedene Neureguline (NRG) bilden die dritte Gruppe und werden entweder von ErbB3 und ErbB4 oder nur von ErbB4 gebunden (Hynes und MacDonald 2009).

Die Bindung von Liganden führt zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren der Rezeptormoleküle. Die verschiedenen Liganden induzieren spezielle Dimerpaarungen, die sich in der Aktivierung von gekoppelten Signalwegen unterscheiden. Der EGFR dimerisiert nach Bindung von EGF vorrangig mit anderen EGFR Molekülen über seine extrazelluläre Dimerisierungsdomäne. Das führt zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, die die Tyrosine am regulatorischen C-terminalen Ende phosphoryliert und dadurch den Rezeptor aktiviert (Hong et al. 2010). Neben den Liganden sind auch unphysiologische Stimuli wie z. B. ionisierende Strahlung in der Lage den EGFR zu aktivieren (Valerie et al. 2007; Lee et al. 2008). Die Phosphorylierung der Tyrosine induziert die Bindung verschiedener Adapterproteine und damit die Signaltransduktion in die Zelle (Abbildung 14).

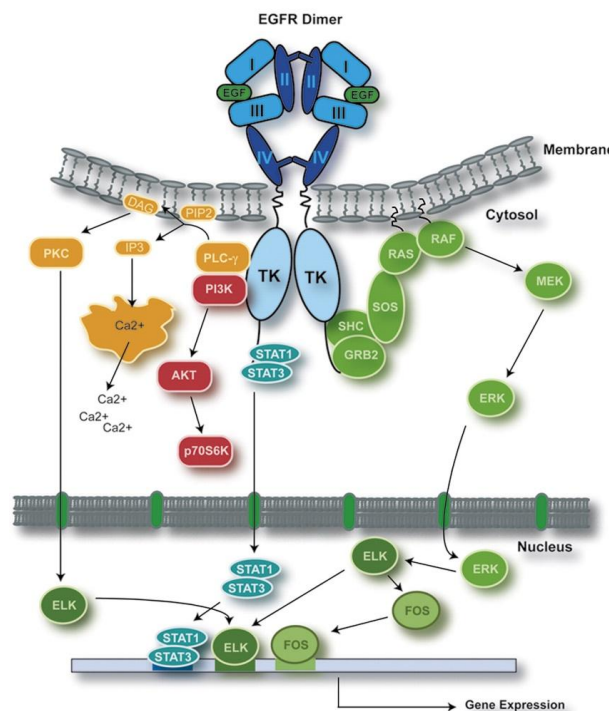


Abbildung 14: Signaltransduktion nach EGFR Aktivierung (Zandi et al. 2007)

Die Bindung von EGF stimuliert die Homodimerisierung zweier EGFR Moleküle. Dies führt zur Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne (TK) und Phosphorylierung von Tyrosinen am C-terminalen Ende. Dadurch werden zentrale Signalwege, wie der MAPK (grün), der PI3K (rot), der STAT (blau) und der PLC (gelb) Signalweg, in der Zelle induziert und die Genexpression verändert.

Zu den zentralen EGFR-gekoppelten Signalwegen gehören der MAPK, PI3K, STAT und PLC Signalweg. Deren Aktivierung führt zur Veränderung der Genexpression und so zur entsprechenden Zellantwort (Zandi et al. 2007).

Die Aktivierung des EGFR induziert darüber hinaus auch die Internalisierung des Rezeptors durch Endozytose. Der EGF/EGFR Komplex wird dabei in Clathrin-bedeckte Vesikel verpackt und in das Innere der Zelle transportiert, wo er schließlich in den Lysosomen abgebaut wird. Dies erfordert eine Polyubiquitinylierung des Rezeptors. Wird der EGFR allerdings in Caveolae internalisiert, kann es zur Dephosphorylierung und erneuten Präsentation des Rezeptors an der Zelloberfläche kommen. Außerdem können Rezeptoren auch während der Internalisierung aktiv bleiben und eine Signaltransduktion in der Zelle induzieren (Sorkin und Goh 2008). Eine weitere Folge der EGFR Aktivierung ist die Translokation des Rezeptors in den Zellkern und das Auslösen von nukleären Signalen (Wells und Marti 2002).

1.4.2. Der EGF-Rezeptor in Tumoren

Der EGFR spielt in der Tumorgenese als Onkogen eine wichtige Rolle. In welcher Art und Weise der Rezeptor onkogene Signale induziert, ist sehr unterschiedlich und von der Tumorentität abhängig (Abbildung 15). In einigen Tumoren führen autokrine/parakrine Wachstumsfaktoren (z B. TGF- α) zu einer gesteigerten EGFR Aktivität, während dies in anderen Tumoren durch Mutationen des EGFR Gens erfolgt. Sehr häufig treten genetische Veränderungen wie Genamplifikation oder Polysomie auf, die eine Überexpression des Rezeptors zur Folge haben. Auch ein gestörter EGFR Abbau, eine Heterodimerisierung mit anderen ErbB Rezeptoren oder die Interaktion mit anderen Membranproteinen (z. B. Integrinen) können zur Deregulation der EGFR Signaltransduktion führen (Zandi et al. 2007).

In 40 % der Glioblastome ist der EGFR aufgrund von Genamplifikationen überexprimiert (Collins 1995). Zudem finden sich in Glioblastomen verschiedene mutierte Varianten des EGFR (Fenstermaker und Ciesielski 2007). Am häufigsten kommt die konstitutiv aktive Variante EGFRvIII vor. Glioblastome mit veränderter EGFR Aktivität weisen einen sehr aggressiven Phänotyp mit verstärkter Proliferation und erhöhter Invasivität auf. Außerdem sind die Tumoren häufig chemo- und strahlenresistent, was unter anderem auf eine EGFR-induzierte DNA-Reparatur zurückzuführen ist (Hatanpaa et al. 2010). Diese Merkmale bedingen eine schlechte Prognose und ein verkürztes Überleben der Patienten.

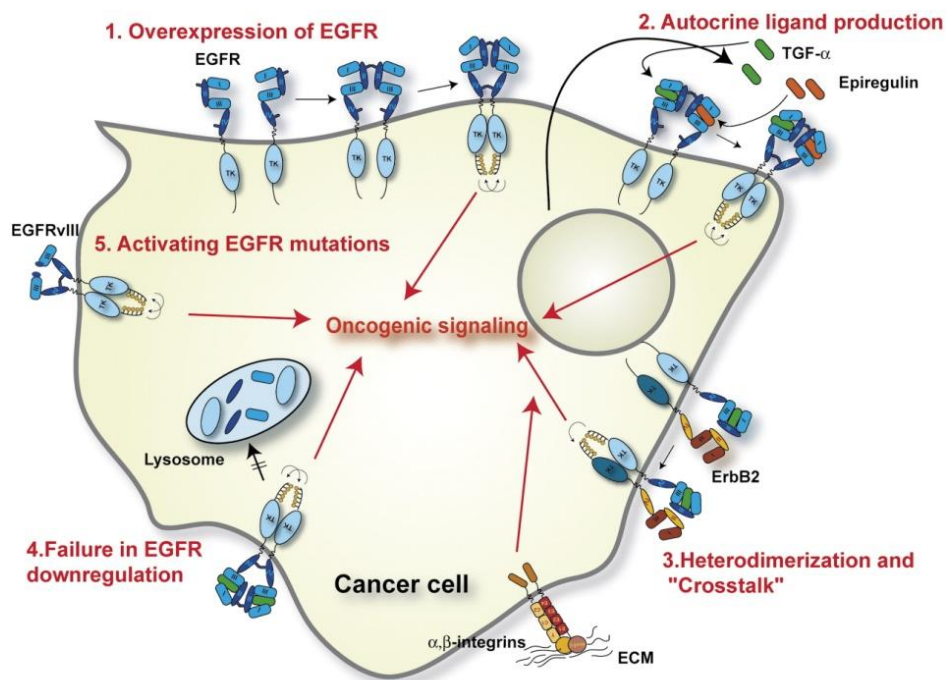


Abbildung 15: Onkogene Mechanismen des EGFR (Zandi et al. 2007)

Verschiedene Mechanismen führen dazu, dass der EGFR onkogen wirkt: 1. Überexpression des EGFR, 2. autokrine/parakrine Wachstumsfaktoren, 3. Heterodimerisierung mit anderen ErbBs und Interaktion mit heterologen Rezeptorsystemen, 4. gestörter EGFR Abbau und 5. EGFR Mutationen.

Basierend auf dem starken Einfluss des EGFR in Tumoren wurden zahlreiche EGFR Inhibitoren für die Krebstherapie entwickelt. Die derzeit zugelassenen Therapeutika umfassen zum einen Anti-EGFR Antikörper wie z. B. Cetuximab, die an die extrazelluläre Domäne des EGFR binden. Zum anderen gibt es Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie z. B. Erlotinib oder Gefitinib, die die intrazelluläre Kinasedomäne hemmen.

Da der EGFR und seine gekoppelten Signalproteine an der Regulation der Zellmigration beteiligt sind (Wells 1999), stellen Rezeptor- oder Signalmolekül-spezifische Inhibitoren eine Möglichkeit dar, die Motilität und Invasivität von Tumoren einzuschränken und damit den Erfolg der gesamten Therapie zu verbessern. Zudem können negative Nebeneffekte der Strahlentherapie, wie die Aktivierung der DNA-Reparatur durch strahlenaktivierte EGFR-gekoppelte Signalwege, unterbunden werden. Voraussetzung für die Entwicklung effizienter Inhibitoren ist die detaillierte Kenntnis der multivarianten Wirkung der Strahlentherapie auf die Zelle.

1.5. Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das Migrationsverhalten von Glioblastomzellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen und Photonen vergleichend untersucht. Zudem wurde analysiert, ob die beobachteten Veränderungen der Motilität kausal mit Veränderungen des EGFR bzw. gekoppelter Signalwege in Verbindung stehen.

Die Limitierung bzw. Schwächung des migratorischen und invasiven Potentials von Glioblastomzellen ist ein wichtiges Ziel der onkologischen Radiotherapie. Allerdings wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass die konventionelle Photonenbestrahlung *in vitro* zu einer erhöhten Migration und Invasion von Gliomzellen führen kann (Wild-Bode et al. 2001; Goetze et al. 2007; Rieken et al. 2011). *In vivo* konnte man Hinweise auf einen Zusammenhang von Bestrahlung und Metastasierung finden (Rofstad et al. 2004). Andere Untersuchungen an 3D Modellen zeigten aber auch eine Reduktion der Migration (Eke et al. 2012). Der Einfluss von Strahlung auf die Zellmotilität ist umstritten, allerdings verstärken sich die Hinweise auf eine Strahlen-induzierte Migrationssteigerung in einigen Tumorentitäten. Dies kann vor allem bei Glioblastomen zum vermehrten Ablösen von Einzelzellen vom Primärtumor und zum Auswandern von Zellen aus dem Bestrahlungsfeld führen, was das Risiko der lokalen Rezidivbildung erhöht. Daher ist es von immenser Bedeutung das migrationsmodulierende Potential von Strahlung besser zu charakterisieren.

Neben der Migration der Zellen wird auch der EGFR durch Bestrahlung in seiner Aktivität beeinflusst. So wurde in verschiedenen Tumorarten eine zeitabhängige Erhöhung der EGFR Phosphorylierung nach Photonenbestrahlung beobachtet (Schmidt-Ullrich et al. 1997; Dent et al. 1999; Yacoub et al. 2006). In ähnlicher Weise war auch die Phosphorylierung von zentralen Signalproteinen der PI3K und MAPK Signalwege verändert. Zudem ist bekannt, dass die EGFR-gekoppelten Signalwege an der Regulation der Zellmigration beteiligt sind (Wells 1999).

Aus dem Beschriebenen geht hervor:

- I) Strahlung kann den EGFR aktivieren.
- II) Strahlung kann die Zellmigration aktivieren.
- III) Eine Aktivierung des EGFR kann die Zellmotilität steigern.

Auf Grundlage dieser Beobachtungen ergab sich die Frage nach einer möglichen kausalen Verknüpfung, das heißt: Steht eine Strahlen-vermittelte Migrationssteigerung in

Zusammenhang mit der Strahlen-induzierten Aktivierung des EGFR und zugeordneter intrazellulärer Signalwege?

Zusätzlich wurde geklärt, inwiefern sich die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (^{12}C -Ionen), als Bestandteil der modernen Radiotherapie, auf die Zellmigration und den EGFR auswirkt. Hinsichtlich der Zellmigration gibt es für verschiedene Tumorzelllinien bereits Hinweise auf eine inhibierende Wirkung der Schwerionenstrahlung (Ogata et al. 2005; Ogata et al. 2011; Rieken et al. 2012). Informationen über den Einfluss der Ionen auf den EGFR liegen allerdings bisher nicht vor. Die Wirkung von Kohlenstoffionen auf die Migration und migrationsregulierende Prozesse ist daher noch nicht ausreichend charakterisiert. Ziel dieser Dissertation war es, die wissenschaftlichen Kenntnisse in diesen Punkten zu erweitern.

2. Materialien und Methoden

Alle aufgeführten Puffer und Lösungen sowie die Hersteller der verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang (5) zusammengefasst.

2.1. Zelllinien

2.1.1. Zelllinien, Medien und Zusätze

In diesem Projekt wurden zwei verschiedene humane Glioblastomzelllinien verwendet. Dabei handelte es sich um U87 MG (ATTC Nr.: HTB-14) und LN229 (ATTC Nr.: CRL-2611), welche von Prof. Cordes (OncoRay – National Center for Radiation Research in Oncology, Technische Universität Dresden) zur Verfügung gestellt wurden. In dieser Arbeit wird im Folgenden statt der Bezeichnung U87 MG die Kurzform U87 verwendet.

Die Zelllinie U87 wurde zwischen 1966 und 1969 aus einem primären Glioblastom eines 44-jährigen Patienten mit einem Tumorstadium Grad IV etabliert (Ponten und Macintyre 1968). Aus einem ebenfalls primären Glioblastom einer 60-jährigen Patientin wurde 1979 in Lausanne (LN-Serie) die Zelllinie LN229 generiert. Beide Zelllinien unterscheiden sich in ihren genetischen Merkmalen. Für diese Arbeit relevant ist insbesondere der genetische Status der Phosphatase PTEN. Während in LN229 das Wildtyp-Gen vorliegt, weist U87 ein mutiertes PTEN-Gen und damit ein defektes PTEN-Enzym auf.

Desweiteren fanden die Sublinien U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ Anwendung, welche eine stabile Überexpression des EGFR aufweisen. Diese wurden durch eine Transduktion der humanen EGFR cDNA (Wildtyp) generiert und von Prof. Steinbach (Dr. Senckenbergisches Institut für Neuroonkologie, Universitätsmedizin Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt (Nagane et al. 1996; Steinbach et al. 2002).

Als Grundmedium wurde DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM L-Glutamin verwendet. Für die Kultivierung der Glioblastomzelllinien wurde dieses mit 1 % nicht essentiellen Aminosäuren (NEAA) sowie 10 % fetales Kälberserum (FCS) für U87 und U87 EGFR⁺⁺ bzw. 5 % FCS für LN229 und LN229 EGFR⁺⁺ versetzt. Die Selektion der EGFR überexprimierenden Zelllinien (U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺) erfolgte durch Zugabe von 1 mg/ml Geneticin (G418) zum Medium.

2.1.2. Standardtechniken in der Zellkultur

2.1.2.1. Monolayerkultivierung und Passagieren

Alle Tumorzelllinien wurden adhärent in Zellkulturflaschen mit unterschiedlicher Wachstumsfläche (25 cm² und 75 cm²) und entsprechend angepasstem Mediumvolumen (5 ml für 25 cm² Flaschen und 15 ml für 75 cm² Flaschen) kultiviert. Dies erfolgte im Inkubator in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden so ausgesät, dass jeweils montags und freitags ein konfluenter Zellrasen gewachsen war. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen abgelöst und mit definierter Zellzahl in eine neue Kulturflasche passagiert. Zunächst wurde das Medium entsorgt und die Zellen mit PBS/EDTA (2 mM EDTA) gewaschen. Daran schloss sich die Inkubation der Zellen mit Trypsin (0,5 ml für 25 cm² Flaschen und 1 ml für 75 cm² Flaschen) für 3 Minuten im Inkubator an. Die Reaktion wurde mit dem vierfachen Volumen des Mediums abgestoppt und die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß (15 ml oder 50 ml) überführt. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (188 x g, 5 Minuten, RT) von dem Trypsin-haltigen Medium getrennt und in frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe 2.1.2.2.) erfolgte das Aussäen der Zellen mit definierter Zellzahl in eine neue Kulturflasche. Das Medium wurde während der Kultivierung der Zellen regelmäßig (alle zwei Tage) erneuert.

2.1.2.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde automatisiert mithilfe des Zellzählgerätes Casy[®] 1 TT (Schärfe System) bestimmt. Die Zellen wurden vorab 1:100 in 10 ml isotonischer Casytonlösung verdünnt und im Gerät durch eine dünne Kapillare gesaugt, an der eine Spannung anliegt. Das Messprinzip beruht auf der Pulsflächenanalyse. Jedes Partikel ruft beim Durchtritt eine Widerstandsänderung hervor, wodurch das Gerät in definierten Grenzen Anzahl, Volumen und Durchmesser der Partikel bzw. Zellen bestimmt. Für vitale U87 Zellen lagen die Grenzen zwischen 12 µm und 40 µm, für vitale LN229 Zellen zwischen 10 µm und 40 µm.

2.1.2.3. Mykoplasmentest

Mykoplasmen gehören zu den kleinsten und einfachsten Prokaryoten und treten in der Zellkultivierung als Kontamination auf, die häufig lange unbemerkt bleibt, da typische Merkmale wie Trübung des Mediums oder massives Zellsterben ausbleiben. Ein zuverlässiger

Schutz gegen Mykoplasmen ist derzeit nicht verfügbar. Daher ist eine regelmäßige Überprüfung der Zellen auf Mykoplasmen-Befall zwingend erforderlich.

In regelmäßigen Abständen wurde deshalb das Medium von konfluenten Zellen mithilfe des „MycoAlert Mycoplasma Detection Kits“ der Firma Lonza auf Mykoplasmen getestet. Dieser biochemische Test beruht auf der Aktivität bestimmter Enzyme der Mykoplasmen, welche, über eine Enzymreaktion mit dem MycoAlert Substrat, die Umwandlung von ADP zu ATP katalysieren. Bei Mykoplasmen-Befall steigt die ATP-Menge an, wodurch in einer Biolumineszenzreaktion Licht emittiert wird. Die Messung der Intensität des emittierten Lichtes, welche sich linear zur ATP-Konzentration verhält, erfolgte sowohl vor und nach Zugabe des Substrates mithilfe eines Luminometers. Ein Quotient größer 1 bedeutete, dass die Zellen mit Mykoplasmen kontaminiert sind, ein Quotient kleiner 1 stand für eine mykoplasmenfreie Kultur.

2.1.2.4. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Jede Zelllinie wurde zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -192 °C eingefroren. Dazu wurden mykoplasmenfreie Zellen aus 25 cm^2 Kulturflaschen abgelöst, zentrifugiert ($188 \times g$, 5 Minuten, -4 °C) und in vorgekühltem Medium, welches mit 10 % DMSO versetzt wurde, aufgenommen. Die Zellsuspension wurde je nach Konfluenz der Zellen in 3-5 Aliquots à 1 ml in Kryo-Röhrchen aufgeteilt und in einem speziellen Einfrierbehälter über Nacht eingefroren. Dieser Behälter erlaubt ein langsames Einfrieren mit 1 °C pro Minute bis -70 °C . Anschließend erfolgte die Überführung der Kryo-Röhrchen in flüssigen Stickstoff.

Das Auftauen der Zellen musste im Gegensatz zum Einfrieren schnell ablaufen, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO zellschädigend wirkt. Dazu wurden die Kryo-Röhrchen 30 Sekunden im Wasserbad (37 °C) inkubiert, die Zellsuspension in 9 ml Medium überführt und in einem 15 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert ($188 \times g$, 5 Minuten, RT). Nach Resuspendieren des Zellpellets in 1 ml Medium erfolgte das Aussäen der Zellen in 25 cm^2 Kulturflaschen.

2.1.2.5. Behandlung mit EGF

Zur Stimulierung des EGF-Rezeptors wurden die Zellen mit dem humanen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) behandelt. EGF wurde in einer definierten Endkonzentration (1-100 ng/ml) 15 Minuten vor Versuchsbeginn dem Medium zugesetzt. Der EGF-Behandlung

ging ein 24stündiger Entzug von FCS im Medium voraus, indem das FCS-haltige Medium durch Medium ohne FCS ersetzt wurde.

2.1.2.6. Behandlung mit Inhibitoren des EGFR und spezifischer Signalproteine

Für Inhibitionsversuche erfolgte die Behandlung der Zellen mit spezifischen Inhibitoren gegen den EGF-Rezeptor, den PI3K/AKT Signalweg sowie den MAPK Signalweg. Tyrphostin AG1478 (4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline) ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor des EGFR und wurde in einer Endkonzentration von 1 μM eingesetzt. Die Aktivität von AKT wurde über den PI3K-Inhibitor LY294002 gehemmt (Endkonzentration 10 μM), die von ERK1/2 mithilfe des MEK1/2-Inhibitors U0126 (Endkonzentration 10 μM). Die Zugabe der Inhibitoren in das Medium erfolgte jeweils 30 Minuten vor Versuchsbeginn bzw. vor Zugabe von EGF. Da alle Inhibitoren in DMSO gelöst waren, wurde dies in gleicher Konzentration den unbehandelten Kontrollproben zugesetzt.

2.2. Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen mit Photonen bzw. schweren Kohlenstoffionen (^{12}C) fand in der Universitätsklinik Mainz bzw. in der GSI in Darmstadt statt, was einen Transport der Zellen erforderte. Verwendet wurden Zellen in 25 cm^2 Kulturflaschen, die eine Konfluenz von 80 % aufwiesen. Für einen schonenden Transport wurden die Flaschen vollständig mit Medium gefüllt und stabil in einer Transportbox verpackt. Die Bestrahlung erfolgte bei Raumtemperatur. Daran schlossen sich der Rücktransport in das Labor und die Durchführung der entsprechenden Versuche an.

Analog zur Behandlung mit EGF (2.1.2.5) erfolgte 24 Stunden vor Bestrahlung ein Entzug von FCS im Medium.

2.2.1. Photonenbestrahlung

Für die Photonenbestrahlung kam zum einen eine Röntgenröhre an der GSI in Darmstadt zum Einsatz als auch ein Gammastrahler in der Universitätsklinik Mainz. Die Zellen wurden mit 2 Gy und 6 Gy bestrahlt.

Bei der Röntgenröhre handelte es sich um eine Isovolt DS1 (Seifert) mit einer Beschleunigungsspannung von 250 keV und einem Kathodenstrom von 16 mA. Ein Filter aus 7 mm Beryllium, 1 mm Aluminium und 1 mm Kupfer absorbiert in dieser Röhre die weiche

Röntgenstrahlung. Die Bestrahlung der Zellkulturflaschen, welche mit Medium gefüllt von Mainz nach Darmstadt transportiert wurden, erfolgte vertikal, das heißt die Flaschen wurden waagrecht mit einem Abstand von 39,5 cm unter den Fokus der Röhre platziert. Diese Distanz setzte sich aus 21,5 cm Abstand Röntgenröhre zu Filter und 18 cm Abstand Filter zu Zellen zusammen. Hieraus ergab sich eine Dosisapplikation von 2 Gy pro Minute. Das Messelement des elektronischen Dosimeters PTW SN4 befand sich direkt unter der Zellkulturflasche, wodurch eine genaue Dosimetrie gewährleistet werden konnte. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Zellen für Migrationsuntersuchungen direkt zurück nach Mainz transportiert, während die Aufarbeitung der Zellextrakte vor Ort stattfand. Transport und Bestrahlung dauerten ungefähr drei bis fünf Stunden.

Um die Transportzeit zu minimieren, wurden parallel Bestrahlungsversuche an einer Zellbestrahlungsanlage (Gammacell 2000) des Institutes für Toxikologie an der Universitätsklinik Mainz durchgeführt. Strahlenquelle war das Radioisotop ^{137}Cs mit einer Halbwertszeit von 30,17 Jahren, welches bei Zerfall in das stabile Barium-Isotop ^{137}Ba Gammastrahlung freisetzt. Die mit Medium gefüllten Zellkulturflaschen wurden in dieser Anlage senkrecht im Bestrahlungsraum platziert und mit einer Energiedosis von 3,24 Gy pro Minute bestrahlt. Transport und Bestrahlung dauerten in diesem Fall lediglich eine Stunde und die Versuche ergaben die gleichen biologischen Effekte wie die Röntgenbestrahlung in Darmstadt, bei geringerer Belastung der Zellen hinsichtlich der Transportzeiten.

2.2.2. Schwerionenbestrahlung

Die Schwerionenbestrahlung mit $^{12}\text{C}^{6+}$ -Ionen fand an der GSI in Darmstadt, am ehemaligen Patientenstrahlplatz (Cave M) des Schwerionensynchrotrons (SIS-18), statt. Dort wurden die Zellen mit einer Strahlenergie von 120 bis 135 MeV/nucleon in der Mitte eines 1 cm ausgedehnten Bragg-Peaks (spread out bragg peak = SOBP; mittlerer LET 100 keV/ μm) bestrahlt. Die verwendete Dosis von 2 Gy bzw. 6 Gy entspricht hierbei der physikalischen, absorbierten Dosis. Zum Abbremsen des Strahls wurde zwischen dem Austrittskanal des Schwerionenstrahls und der Probe ein 30 mm dicker Plexiglas-Absorber montiert, äquivalent zu 33 mm Schichtdicke Wasser. Da der ^{12}C -Strahl horizontal aus der Beschleunigeranlage austritt, mussten die Zellkulturflaschen senkrecht im Bestrahlungsfeld auf einem Förderband platziert werden. Dabei waren sie mit der Zellwachstumsfläche zur Strahlrichtung orientiert. Ein Laserstrahlensystem im Cave ermöglicht das exakte Ausrichten der Zellkulturflaschen. Maximal zwölf Flaschen konnten auf das Förderband gestellt und somit direkt nacheinander

bestrahlt werden. Die Steuerung des Förderbandes sowie des Schwerionenstrahls erfolgte vom technischen Kontrollraum aus.

Im Gegensatz zur Röntgenbestrahlung wurden die Zellen vor der ^{12}C -Bestrahlung nicht aus Mainz nach Darmstadt transportiert. Die Aussaat der Zellen für die Schwerionenversuche erfolgte im Voraus an der GSI, sodass die Zellen vor Ort wuchsen. Am Bestrahlungstag wurden die Flaschen im Labor der GSI mit Medium gefüllt und in entsprechenden Transportboxen zur Bestrahlungsanlage transportiert. Die Bestrahlung von 8-12 Flaschen auf einem Förderband nahm ungefähr 30 Minuten in Anspruch. Die Transport- und Bestrahlungszeiten entsprachen demzufolge denen der Bestrahlung am Gammastrahler in der Uniklinik Mainz, in dem die Flaschen ebenfalls in senkrechter Position bestrahlt wurden.

2.2.3. Zellüberleben nach Bestrahlung

2.2.3.1. Zellviabilitätstest (XTT)

Die Zellviabilität wurde mithilfe eines XTT basierten Zellproliferationsassays untersucht. Die Schlüsselkomponente XTT (2,3-Bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid-Salz) wird nur durch die mitochondrialen Enzyme lebender Zellen zu einem wasserlöslichen, orangefarbenen Formazanderivat reduziert. Dieses kann bei 450 nm photometrisch gemessen werden und verhält sich direkt proportional zur Zahl der metabolisch aktiven Zellen.

Für den Test wurden die Zellen mit definierter Zellzahl in Dreifachbestimmung in 96 well Platten ausgesät und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Die verwendeten Zellzahlen sowie die Inkubationsdauer waren vom jeweiligen Versuch abhängig und sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil vermerkt. Nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Waschen der Zellen mit 200 μl 1x PBS, wurden 30 μl XTT, gelöst in 120 μl 1x PBS (entspricht einer 1:5 Verdünnung des XTT), zugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation erfolgte die Absorptionmessung im Mikroplate-Reader bei 450 nm sowie 655 nm. Dabei diente der Messwert bei 655 nm als Korrekturwert für die Eigenabsorption der Platte, welcher vom Messwert bei 450 nm subtrahiert wurde. Die relative Viabilität ergab sich anschließend aus dem Verhältnis der Absorption der behandelten Probe zur unbehandelten Probe, welche auf 100 % gesetzt wurde.

2.2.3.2. Klonogener Überlebenstest

Das Überleben der Zellen nach Bestrahlung wurde über die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt. Klonogene Zellen sind in der Lage sich nach Bestrahlung mit Röntgen- oder Schwerionenstrahlung weiterhin zu teilen und Kolonien von mindestens 50 Zellen zu bilden. Dazu wurden die Zellen nach der Bestrahlung abgelöst und mit sehr geringer, definierter Zellzahl in Petrischalen (Fläche 21 cm²) in Dreifachbestimmungen ausgesät. Die verwendeten Zellzahlen sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Petrischalen wurden 10-12 Tage inkubiert. Daran schloss sich die Färbung der Zellkolonien mit einer 0,1%igen Methylenblaulösung (30 Minuten) an. Die Auszählung der Kolonien mit mindestens 50 Zellen erfolgte per Auge am Mikroskop. Aufgrund der Annahme, dass jede Kolonie aus einer Einzelzelle gewachsen ist, ergab sich aus dem Verhältnis von Koloniezahl zu ausgesäter Zellzahl die „plating efficiency“ (PE). Das „relative Überleben“ errechnete sich wiederum aus dem Verhältnis der PE von bestrahlten zu unbestrahlten Zellen.

Tabelle 1: Zellzahlen für den klonogenen Überlebenstest

Angegeben ist die Anzahl der Zellen, die pro Petrischale für den klonogenen Überlebenstest ausgesät wurde, abhängig von der Strahlungsart sowie der Zelllinie.

Zellen pro Petrischale (21 cm ²)	Photonenstrahlung		¹² C-Strahlung	
	2 Gy	6 Gy	2 Gy	6 Gy
U87 U87 EGFR++	500	1000	1000	2000
LN229 LN229 EGFR++	1000	5000	2000	10.000

2.3. Zellmigration

Die Migration der Zellen wurde mithilfe der Boydenkammer untersucht, welche 1962 von Stephan Boyden beschrieben und nach ihm benannt wurde (Boyden 1962). In dieser Arbeit kam ein 48 well Boydenkammersystem (AP48) zum Einsatz, bestehend aus einer Ober- und Unterplatte mit je 48 Vertiefungen. Die Vertiefungen werden mit Medium gefüllt und durch eine Polykarbonat-Membran (20 cm²) voneinander getrennt. Diese besitzt Poren (hier 8 µm Durchmesser), welche kleiner sind als das durchschnittliche Zellvolumen. Durch die Poren gelangen die Zellen mittels aktiver Migration von einer Seite der Membran auf die andere. Ausgewertet werden nach beendeter Inkubationszeit, die Anzahl der Zellen, die vom oberen Kompartiment die Unterseite der Membran erreicht haben.

Abbildung 16 zeigt den schematischen Aufbau einer einzelnen Vertiefung einer zusammengesetzten Boydenkammer. Die Oberseite der Membran (schwarz-weiße Linie) wurde für die Versuche dieser Arbeit mit humanem Kollagen IV beschichtet (gelb dargestellt). Diese Beschichtung ermöglichte den Zellen zum einen die Adhäsion an die Membran, stellte zum anderen aber auch eine Barriere dar, welche die Zellen durch enzymatische Proteolyse durchdringen mussten. Anschließend migrierten sie durch die Poren der Membran, welche auf der Unterseite mit Gelatine beschichtet wurde (rot dargestellt). Die Zellen können diese Gelatineschicht nicht durchdringen und verbleiben somit auf der unteren Membranseite. So war eine vollständige Detektion aller gewanderten Zellen möglich. Nach Fixierung, Färbung und Auszählung der migrierten Zellen kann schließlich der Anteil wandernder Zellen in einer zu untersuchenden Zellsuspension bestimmt werden.

Dabei wurde in dem beschriebenen Aufbau aufgrund der Kollagenbeschichtung sowohl die Migration als auch die Invasion von Zellen berücksichtigt, da die Proteolyse von Kollagen, als Bestandteil der extrazellulären Matrix, einen Teil der Invasionseigenschaften von Zellen *in vivo* ausmacht. Im Weiteren wird der Einfachheit halber nur von Migration die Rede sein.

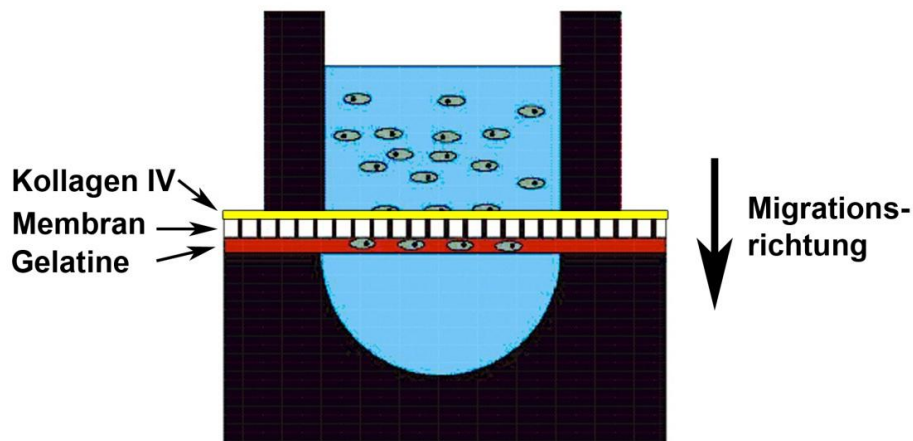


Abbildung 16: Schematischer Aufbau einer Vertiefung der Boydenkammer

Eine Vertiefung einer zusammengesetzten Boydenkammer ist im Querschnitt schematisch dargestellt. Das obere und untere Kompartiment ist mit Medium gefüllt (blau) und durch eine Membran mit Poren (schwarz-weiße Linien) voneinander getrennt. Diese ist auf der Oberseite mit humanem Kollagen IV (gelb) und auf der Unterseite mit Gelatine (rot) beschichtet. Die Zellen wandern in Migrationsrichtung aus dem oberen Kompartiment durch die Kollagenschicht und die Membran hindurch auf die Unterseite der Membran in die Gelatine.

2.3.1. Vorbereitung der Membranen

Die Polykarbonat-Membranen besitzen eine glänzende und eine stumpfe Seite, die unterschiedlich beschichtet wurden. Zuerst erfolgte die Beschichtung der glänzenden Seite

(Startseite) mit humanem Kollagen IV aus der Plazenta in einer Endkonzentration von 1,5 mg/ml. Bei einer gleichmäßigen Verteilung auf der Membran entsprach dies einer Konzentration von 9,75 µg Kollagen pro cm². Nach Markierung der Membran zur späteren Orientierung (z. B. durch Abschneiden der linken unteren Ecke) wurden 130 µl Kollagengebrauchslösung (Konzentration 1,5 mg/ml) auf der Membran gleichmäßig verteilt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Daran schloss sich die Beschichtung der stumpfen Seite (Ankunftsseite) mit einer 1x Gelatinelösung (Konzentration 0,1 mg/ml) an. Bis zu 6 Membranen konnten mit 200 ml Gelatinelösung gleichzeitig beschichtet werden. Dazu wurden die Membranen vorsichtig auf die vorgewärmte Gelatinelösung aufgelegt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es schloss sich eine ebenso 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur an, gefolgt von zwei Waschschritten mit 1x PBS (je 15 Minuten, RT), durch die die überschüssige Gelatine entfernt wurde. Ein kurzes Auflegen der Membranen auf destilliertes Wasser beendete den Prozess, und die Membranen wurden mit der frisch beschichteten Seite nach oben zum Trocknen gelegt.

2.3.2. Beschickung der Boydenkammer

Zur Beschickung der Boydenkammern wurden die Zellen zunächst aus den Kulturflaschen abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Für jede Zelllinie erfolgte anschließend die Einstellung einer definierten Zellzahl ($1,5 \cdot 10^5$ Z/ml für U87/U87 EGFR++; $3,0 \cdot 10^5$ Z/ml für LN229/LN229 EGFR++) mit dem Zelllinien-spezifischen Medium und Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep). Abhängig vom Versuchsziel wurde Medium mit und ohne FCS verwendet. Dies ist an entsprechender Stelle im Ergebnisteil vermerkt. Vor Aussaat der Zellen wurde die Zellzahl nochmals überprüft und dokumentiert. Danach schloss sich die Beschickung der Vertiefungen der unteren Boydenkammerplatte mit 30 µl Medium mit 1 % Pen/Strep an. Auf das Unterteil der Kammer wurden dann die beschichtete Membran, die Silikon-Dichtung und die Oberplatte gelegt und verschraubt. Die Vertiefungen des oberen Kammerteils wurden abschließend mit 50 µl der vorbereiteten Zellsuspension gefüllt und die Kammern 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.3.3. Fixierung und Färbung der Zellen

Nach Ende der Inkubationszeit von 16 Stunden wurde die Boydenkammer auseinandgebaut und die Membran entnommen. Mithilfe von zwei Klammern konnte die Membran

aufgespannt und so die auf der Startseite (Kollagen-beschichtete Seite) verbliebenen Zellen mit einem in 1x PBS angefeuchteten Wattestäbchen abgewischt werden. Nach dem Trocknen der Membran erfolgte die Fixierung der gewanderten Zellen auf der Ankunftsseite (Gelatine-beschichtete Seite) durch Eintauchen der gesamten Membran in Methanol (10 Sekunden, RT). Sobald das Methanol verdampft war, konnten die so fixierten Zellen mithilfe einer kommerziell erhältlichen Hämacytofluor-Färbung, bestehend aus zwei Färbelösungen, auf der Membran gefärbt werden. Dazu wurde die Membran zunächst siebenmal in die rote Färbelösung (Hämacytofluor 2) getaucht, welche die gesamte Zelle färbte. Anschließendes dreimaliges Eintauchen in die zweite, blaue Färbelösung (Hämacytofluor 3) bewirkte eine dunkle Färbung der Zellkerne, welche sich so vom Zellkörper unterscheiden ließen. Überschüssige Färbelösung wurde abschließend durch Waschen in „Puffer nach Weise“ entfernt und die Membran getrocknet. Zum Eindecken auf Objektträgern musste die Membran mittig getrennt werden. Je eine Hälfte wurde auf einem Objektträger mit einem Tropfen Immersionsöl und einem Deckglas luftblasenfrei eingedeckt und mit Nagellack versiegelt, um eine langfristige Lagerung und die Dokumentation unter dem Mikroskop zu ermöglichen.

Die Bestandteile der Boydenkammer wurden nach Beendigung des Versuches zunächst 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült und für einige Stunden in destilliertem Wasser eingelegt. Vor einem weiteren Versuch erfolgte die Reinigung der Kammern in einer 1%igen Tergazym-Lösung (3 Stunden, 55 °C). Diese wurde anschließend durch Spülen und Einlegen in destilliertem Wasser (über Nacht) wieder entfernt, worauf die Kammern getrocknet wurden. Die Silikon-Dichtungen konnten zusätzlich autoklaviert werden.

2.3.4. Auswertung

Für die computergestützte Auswertung der Zellmigration mittels Adobe® Photoshop, ImageJ und Microsoft® Excel wurde jede Vertiefung der Membran unter dem Mikroskop mit einem 2,5x Objektiv abfotografiert. Am Computer erfolgte dann mit Photoshop eine Reduktion des Farbumfanges, indem die dunkler gefärbten Kerne schwarz und der Rest des Bildes weiß gefärbt wurden. Der zweite Auswertungsschritt bestand aus der Auszählung der nun schwarzen Zellkerne mithilfe des patentierten Quantifizierungsverfahrens (DE102007023984A1) von Philipp Resmini in ImageJ. Dieses Verfahren trennt auch nah aneinander liegende Zellkerne und erstellt eine Tabelle mit den Größen aller schwarzen Bereiche. In Microsoft Excel erfolgte dann eine nach Gruppen (je 10 Pixel) stratifizierte Darstellung, die eine Abschätzung der Normalverteilung ermöglichte und die Anzahl der

gewanderten Zellen wiedergab. Zusammen mit der in die Boydenkammer eingesetzten Zellzahl konnte der relative Anteil migrierter Zellen für jede Vertiefung angegeben werden. Die Werte von mindestens acht Vertiefungen pro Ansatz wurden dann gemittelt. Aus dem Quotienten des Anteils migrierender Zellen der behandelten Probe zu dem der unbehandelten Kontrollprobe (100 %) ergab sich die relative Migration.

2.4. Proteinexpression

Für die Proteinuntersuchungen wurden Gesamt-Zelllysate hergestellt, aus denen sowohl die Phosphorylierung als auch die Expression der spezifischen Proteine mithilfe von SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und Antikörper-Inkubation nachgewiesen werden konnten.

2.4.1. Herstellung von Zelllysaten

Die Gesamt-Zelllysate wurden von Zellen einer 25 cm² Kulturflasche hergestellt. Die Aufarbeitung erfolgte zu jedem Zeitpunkt bei 4 °C, um vor allem die Aktivität von Proteasen und Phosphatasen zu hemmen. Nach Abschütten des Mediums wurden die Zellen zunächst zweimal mit 4 °C 1x PBS (3 ml pro 25 cm² Flasche) gewaschen. Dabei musste das PBS nach dem zweiten Waschschritt mit einer Pipette möglichst vollständig entfernt werden. Für den Aufschluss der Zellen kam ein modifizierter RIPA-Puffer zum Einsatz, dem vor Gebrauch sowohl Protease- als auch Phosphatase-Inhibitoren (kommerzielle Cocktails) frisch zugesetzt wurden. Nach Zugabe von 100 µl Lysepuffer wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgelöst und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Zellyse durch viermaliges Auf- und Abziehen der Zellsuspension in einer Insulinspritze gefördert. Daran schloss sich ein weiterer Inkubationsschritt auf Eis für 1 Stunde an. Das Abzentrifugieren der nichtlöslichen Zellbestandteile (16.000 x g, 20 Minuten, 4 °C) bildete den letzten Schritt der Aufarbeitung. Der Überstand wurde als Gesamt-Zelllysat in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

Die Konzentration der Proteine in den Zelllysaten wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen BCA Protein Assay Kits bestimmt. Der Test beruht auf der Umwandlung von

Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einer alkalischen Umgebung und der Bildung eines violetten Farbstoffs bei der Reaktion von Cu^{1+} mit der Bicinchoninsäure (BCA). Die Absorption des Farbstoffes kann bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden. Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration und der Absorption. Durch Messung einer BSA-Standardreihe (bovines Serumalbumin) kann eine Kalibriergerade erstellt werden, anhand derer die Berechnung der Proteinkonzentration in den unbekanntenen Proben möglich ist.

Für die BSA-Standardreihe wurden aus einer BSA-Stammlösung mit 2000 $\mu\text{g/ml}$ BSA Lösungen mit abnehmender BSA-Konzentration hergestellt (1500 $\mu\text{g/ml}$; 1000 $\mu\text{g/ml}$; 750 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 25 $\mu\text{g/ml}$). Als Leerwert diente der RIPA-Lysepuffer. Bei jeder Messung wurde eine neue Standardreihe erstellt. Die zu untersuchenden Proben wurden vorab 1:10 mit Lysepuffer verdünnt und 25 μl der verdünnten Probe in einer 96 well Platte mit 200 μl BCA-Reagenz versetzt (Doppelbestimmung). Nach der Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C erfolgte die Messung im Mikroplate-Reader bei 562 nm. Für die Auswertung mittels Microsoft Excel wurde die Absorption der Standardlösungen gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Aus einer linearen Regression ergab sich eine Geradengleichung, aus der sich die Proteinkonzentrationen der unbekanntenen Proben errechnen ließen.

2.4.3. SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente zur Auftrennung der unter 2.4.1 hergestellten Zelllysate. Dabei kamen ein Trenngel mit 8 % und ein Sammelgel mit 5 % Acrylamid zum Einsatz (genaue Zusammensetzung siehe 5.3.3). In allen Komponenten wurde SDS verwendet, welches sich an die aufzutrennenden Proteine lagert, deren Eigenladung maskiert und ihnen eine negative Ladung verleiht. Das zusätzliche Aufkochen der Proteine führte zur Denaturierung und Linearisierung. Dadurch konnten die einzelnen Proteine nach der Kettenlänge im Trenngel in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden.

50 μg Protein wurden zur Vorbereitung 1:5 mit 6x Elektrophorese-Auftragspuffer versetzt. Daran schloss sich das Aufkochen der Proben im Thermoblock für 5 Minuten bei 95 °C und kurzes Anzentrifugieren an. Das Beladen des Gels erfolgte mit einer Hamilton-Spritze mit stumpfer Spitze. Der im Auftragspuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau erleichterte diesen Schritt und machte die Lauffront der Proteine sichtbar. Zur Abschätzung der

Proteingrößen wurden je Gel 6 μ l eines vorgefärbten Proteinmarkers (PageRuler Plus Prestained Ladder) mitgeführt. Die Elektrophorese lief bei 25 mA pro Gel, 300 V und 100 W für ca. 1,5 Stunden bis zum Auslaufen der Lauffront aus der Kammer. Anschließend wurde das Gel für den Western Blot (siehe 2.4.4.1) verwendet.

2.4.4. Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte der Transfer dieser auf eine Nitrozellulose-Membran mithilfe des Semi-Dry Blot-Verfahrens. Dabei bleibt das Auftrennungsmuster der Gelelektrophorese erhalten. Die Präsenz der aufgetrennten Proteine auf einer Membran macht einen immunochemischen Nachweis einzelner Proteine mittels spezifischer Antikörper möglich. Die einzelnen Schritte des Verfahrens sind im Folgenden erläutert.

2.4.4.1. Semi-Dry Blot

Zur Vorbereitung wurden pro Gel je eine Nitrozellulose-Membran (6,5 x 8,5 cm) und sechs dünne Whatman-Filterpapiere zugeschnitten (7 x 9 cm) und für 5 Minuten in Blottingpuffer äquilibriert. Nach Beendigung der Gelelektrophorese und Entnahme des Gels aus der Apparatur erfolgten die Entfernung des Sammelgels und die Platzierung der Membran auf dem Trenngel. Danach wurden drei Whatman-Filterpapiere auf die Membran gelegt und eventuell vorhandene Blasen entfernt. Der beschriebene Aufbau wurde nun mit den Whatman-Filterpapieren nach unten auf die Anode des Semi-Dry Blotters platziert und das zur Kathode gerichtete Gel mit weiteren drei Whatman-Filterpapieren bedeckt. Nach sorgfältigem Entfernen möglicher Blasen erfolgten das Aufsetzen der Kathode und der Transfer der Proteine für 2,5 Stunden bei 0,8 mA/cm², 300 V und 100 W.

Die Effizienz des Proteintransfers wurde anschließend durch eine Färbung der Membran mit einer Ponceau S-Färbelösung überprüft. Der rote Azofarbstoff bindet reversibel an die Proteine und kann durch Waschen in einer wässrigen Pufferlösung wieder vollständig entfernt werden. Für die Färbung wurde die Membran zunächst kurz in Reinst-Wasser gewaschen um Rückstände des Blottingpuffers zu entfernen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Färbelösung in einer Petrischale für 2 Minuten, gefolgt von einem weiteren Waschschrift in Reinst-Wasser, bis die Proteinbanden gut auf der weißen Membran sichtbar waren. Mithilfe eines Skalpell und eines Lineals wurde die Membran anschließend auf einer Schneideunterlage in drei Teile geteilt. Die Schnittstellen orientierten sich an den Größen der

Markerbanden und denen der Zielproteine. So konnten auf einer Membran im weiteren Verlauf drei Zielproteine gleichzeitig detektiert werden. Nach eindeutiger Markierung der einzelnen Membranstreifen erfolgte das Entfärben in 1x PBS für 10 Minuten.

2.4.4.2. Blocking und Antikörperinkubation

Vor der Antikörperinkubation mussten die noch freien Proteinbindungsstellen auf der Membran abgeblockt werden, um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu vermeiden. Zum Einsatz kam je nach Zielprotein entweder eine 5%ige Milchpulverlösung oder eine 5%ige BSA-Lösung (siehe 5.5). Inkubiert wurde die Membran in der entsprechenden Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln. Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen folgte die Inkubation der Membran mit einem für das Zielprotein spezifischen Primärantikörper. Vor der Zugabe des Antikörpers wurde die Membran in einer Folie auf drei Seiten eingeschweißt. Über die offene Seite erfolgte die Zugabe von 1,5 ml verdünnter Antikörperlösung. Danach wurde die Folie luftblasenfrei verschlossen und faltenfrei auf einer Aufsatzplatte eines Orbitalschüttlers fixiert. Die Antikörperinkubation lief über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Am Folgetag wurde die Membran aus der Folie gelöst und viermal 15 Minuten in PBST auf einem Horizontalschüttler gewaschen. Daran schloss sich die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper (1,5 Stunden, RT) an, wofür die Membran wie bei dem Primärantikörper in einer Folie eingeschweißt wurde. Der mit einer Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper ist spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran fünfmal für 20 Minuten in PBST gewaschen.

Die Verdünnungen der einzelnen Primär- und Sekundärantikörper sind dem Anhang zu entnehmen (siehe 5.5).

2.4.4.3. Detektion

Für die Detektion der Proteinbanden über die am Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase kam ein ECL-Reagenz (ECL = Enhanced Chemiluminescence) zum Einsatz. Die zwei Reagenz-Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt (2 ml pro Membran) und für 5 Minuten auf der Membran inkubiert. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers setzt das H₂O₂ aus der ECL-Lösung um und das ebenfalls vorhandene Luminol wird angeregt. Bei seiner Rückführung in den Grundzustand wird Licht abgegeben, welches mittels einer hochsensitiven Kamera detektiert werden kann. Für die Detektion kam das FUSION-FX7

Chemilumineszenzsystem der Firma Vilber Lourmat zum Einsatz. In Kombination mit der Analyse Software BIO-1D waren sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Auswertung durch Analyse der Pixel-Intensitäten jeder einzelnen Western Blot Bande möglich. Zur Normalisierung wurde stets die Expression eines Haushaltsproteins (β -Actin oder α -Tubulin) mit detektiert.

2.4.4.4. Strippen

Nach der Detektion konnten die Antikörper wieder von den Proteinen gelöst werden. Dazu wurde die Membran, nach Abspülen von überschüssiger ECL-Lösung mittels PBST, in einem Stripppuffer inkubiert (30 Minuten, 50 °C, schütteln). Das im Stripppuffer enthaltene SDS sowie β -Mercaptoethanol spaltet die Bindungen zwischen Antikörper und Proteinen, während die Proteine auf der Membran gebunden bleiben. So können diese im Anschluss mit anderen Antikörpern behandelt werden. Da allerdings die Phosphorylierung eines Proteins sehr anfällig ist für diese Prozedur, wurde eine Membran stets erst mit dem Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle und nach dem Strippen mit dem Antikörper gegen die Gesamtexpression behandelt. Generell erfolgte das Strippen einer Membran nur einmal.

2.5. Statistik

Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und deren statistische Absicherung wurden alle Experimente mindestens dreimal wiederholt. Zudem wurden, wenn möglich, Mehrfachbestimmungen einer Probe durchgeführt. Die Anzahl der Strahlzeiten für die Schwerionenbestrahlung an der GSI Darmstadt stellte hierbei einen limitierenden Faktor dar.

In den gezeigten Ergebnissen sind relative Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen unter Angabe der Standardabweichung (SD) gezeigt. Dabei wurden unbehandelte Kontrollproben auf 100 % gesetzt und die Änderungen behandelte Proben relativ dazu ausgewertet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mit einem zweiseitigen t-Test ($p < 0,05$) in Microsoft Excel überprüft.



3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss von Photonenstrahlung und Kohlenstoffstrahlung auf die Migration von Glioblastomzelllinien untersucht und mit dem Aktivierungsstatus des EGF-Rezeptors sowie gekoppelter intrazellulärer Signalproteine verglichen. Den Untersuchungen lagen zwei verschiedene Glioblastomzelllinien (U87 und LN229) zugrunde, welche durch zwei EGFR-überexprimierende Sublinien (U87 EGFR++ und LN229 EGFR++) ergänzt wurden. Die wichtigsten Merkmale und Unterschiede der Zelllinien sind unter 2.1.1 dargelegt.

Im Folgenden soll zunächst auf die Zelllinien-spezifischen Unterschiede hinsichtlich Morphologie, EGFR Expression und allgemeines Überleben nach Bestrahlung eingegangen werden. Anschließend werden die nach Bestrahlung erhaltenen Ergebnisse der Migrations- und Proteinanalysen dargestellt.

3.1. Charakterisierung der Zelllinien

3.1.1. Allgemeines

Trotz der gleichen Entität der verwendeten Tumorzelllinien, zeigten sich während der Kultivierung deutliche morphologische Unterschiede. In Abbildung 17 sind beispielhaft mikroskopische Aufnahmen der Wildtyp-Zelllinien U87 und LN229 4 Tage (A, C) und 6 Tage (B, D) nach Aussaat ($1,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm²) dargestellt. A und C entsprechen dem Zeitpunkt, zu dem die Zellen später für die Migrations- und Proteinuntersuchungen bestrahlt wurden.

U87 zeichnete sich durch einzeln anhaftende Zellen mit vielen langen Ausläufern aus, die teilweise miteinander verbunden erschienen. Demgegenüber waren bei LN229 runde, kompakte Zellen zu beobachten. Bei dichtem Bewuchs ordneten sich die LN229 Zellen eng zu einem Zellrasen an. Demgegenüber waren U87 Zellen nicht in der Lage einen konfluenten Monolayer zu bilden.

Die EGFR-überexprimierenden Sublinien U87 EGFR++ und LN229 EGFR++ unterschieden sich in ihrer Morphologie und ihrem Wachstum nicht von den Wildtypen.

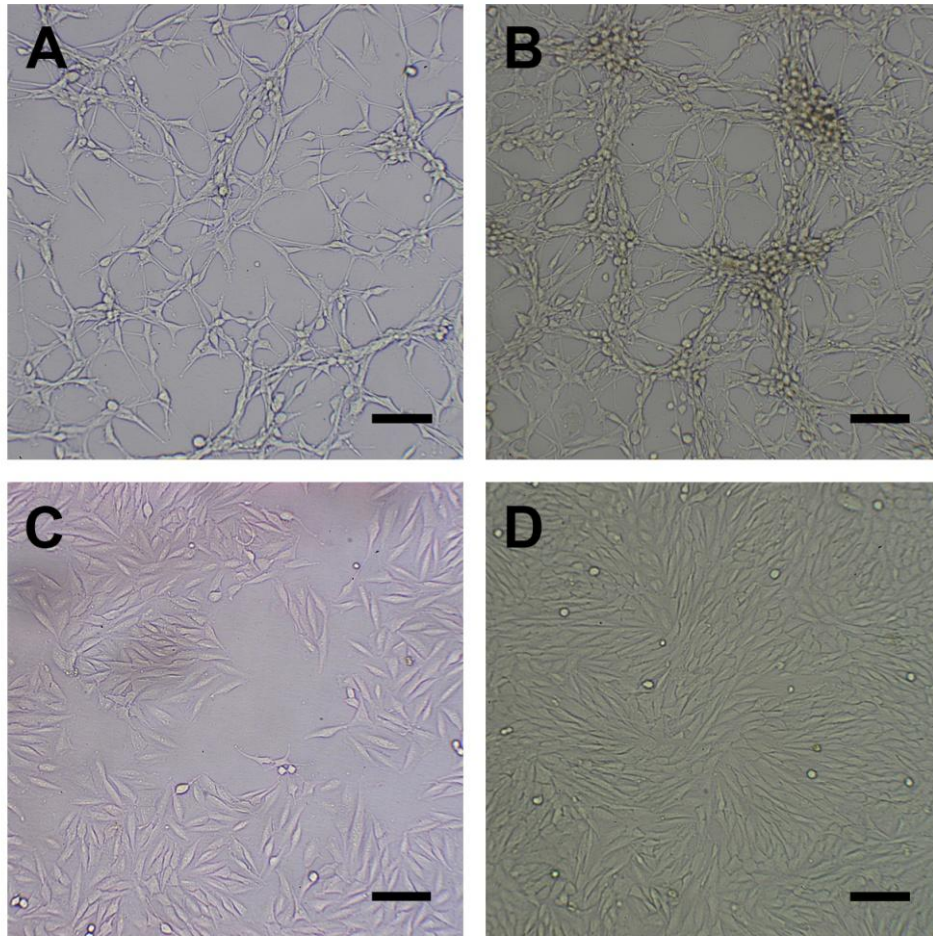


Abbildung 17: Phasenkontrastaufnahmen der Wildtyp-Zelllinien U87 und LN229

Die mikroskopischen Aufnahmen von U87 (A, B) und LN229 (C, D) wurden 4 Tage (A, C) bzw. 6 Tage (B, D) nach Aussaat der Zellen mit $1,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² mit einem Inversmikroskop und einer Nikon D100 Kamera aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

3.1.2. Expression des EGFR

Für die späteren Untersuchungen der EGFR-gekoppelten Signalwege wurden die Zelllinien zu Beginn im Hinblick auf ihre Expression des EGFR charakterisiert. Die Western Blot Analysen aus dem Gesamt-Zellextrakt sind für die vier Linien in Abbildung 18 dargestellt.

Bei den Wildtyp-Zelllinien ließ sich mit einer Belichtungszeit von 5 Minuten feststellen, dass U87 eine stärkere EGFR-Expression gegenüber LN229 besitzt. Dieser Unterschied war auch in den Sublinien U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ zu erkennen, allerdings bereits nach 30 Sekunden Belichtung, da das Signal aufgrund der EGFR-Überexpression sehr viel stärker war. Die Signalproteine AKT und ERK1/2 waren in allen Linien gleich stark exprimiert.

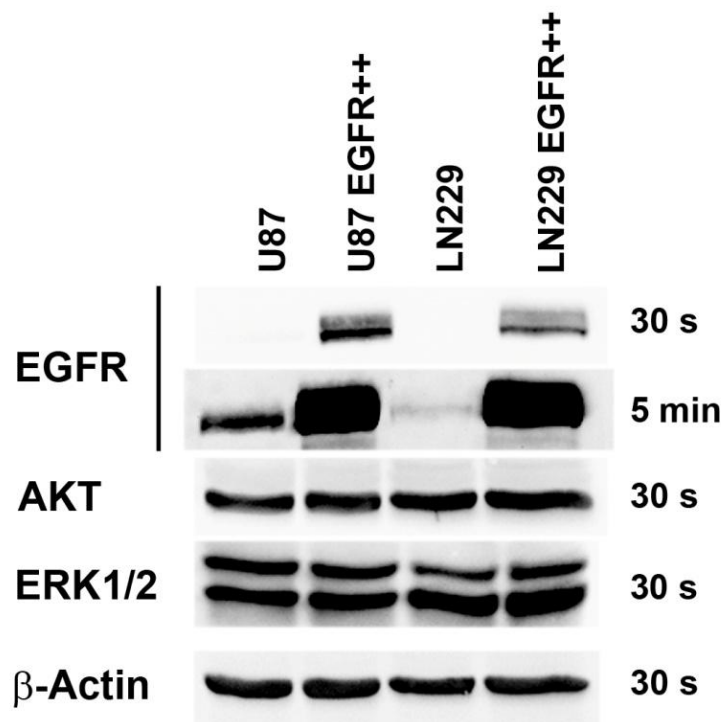


Abbildung 18: EGFR-Expression der Glioblastomzelllinien

Die Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 der Glioblastomzelllinien U87, U87 EGFR++, LN229 und LN229 EGFR++ wurde mittels Western Blot aus dem Gesamt-Zellextrakt (50 µg Protein pro Spur) untersucht. Die Belichtungszeit (rechts dargestellt) betrug 30 Sekunden. Allerdings war für den Nachweis des EGFR in den Wildtyplinien eine längere Belichtungszeit nötig (5 Minuten). β-Actin diene als Haushaltprotein.

3.1.3. Überleben der Zellen nach Bestrahlung

3.1.3.1. Klonogenes Überleben

Die grundlegende Wirkung einer Bestrahlung lässt sich anhand des Überlebens der Zellen feststellen. Hierzu wurde zunächst das klonogene Überleben aller Zelllinien nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy Photonen bzw. Schwerionen untersucht (Abbildung 19).

Für alle Zelllinien war nach Photonenbestrahlung die für diese Strahlenart typische Schulterkurve zu beobachten. Der dosisabhängige Verlauf zeigte nach 6 Gy eine Überlebensrate von etwa 20 % für U87 und U87 EGFR++ und 10 % für LN229 und LN229 EGFR++. Demgegenüber nahm das Überleben nach ¹²C-Bestrahlung viel stärker und zudem linear ab. Der Anteil lebender Zellen lag bereits nach 2 Gy ¹²C bei den oben genannten Werten von 6 Gy Photonen. Nach 6 Gy ¹²C konnte nur noch ein Überleben von unter 1 % festgestellt werden.

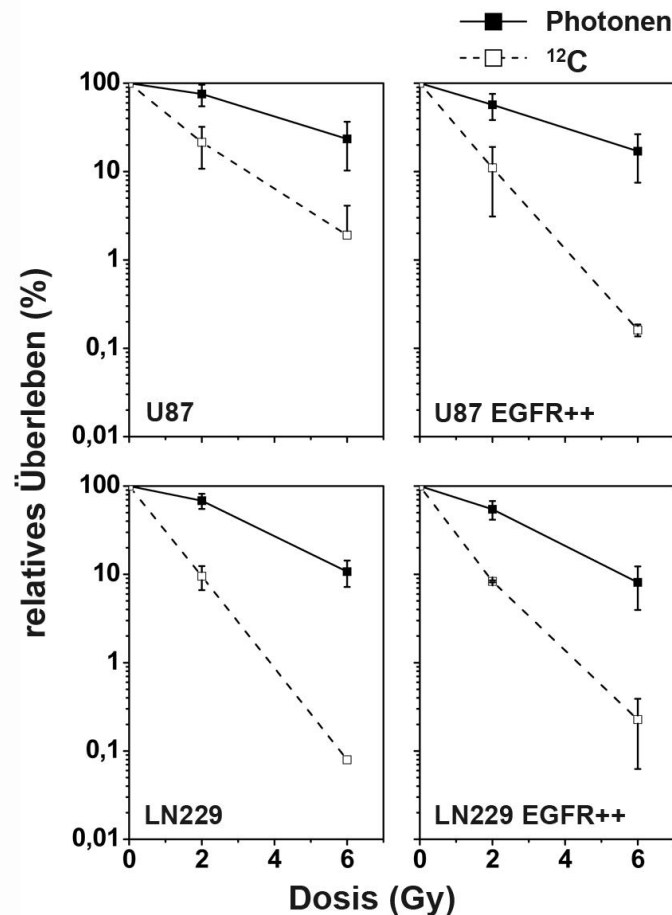


Abbildung 19: Klonogenes Überleben nach Photonen- und ¹²C-Bestrahlung

Nach Bestrahlung mit 2 Gy und 6 Gy Photonen (durchgezogene Linie) oder ¹²C-Ionen (gestrichelte Linie) wurde das klonogene Überleben der Zelllinien U87, U87 EGFR++, LN229 und LN229 EGFR++ getestet. In den Kurven aufgetragen ist das relative Überleben in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche ($N > 3$) gegen die verwendete Dosis in Gy.

3.1.3.2. Viabilität der Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung

Neben dem klonogenen Überleben spielte die Viabilität der Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung in dieser Arbeit eine wichtige Rolle. Die Untersuchungen des Migrationsverhaltens nach Bestrahlung erfolgten 24 Stunden nach Bestrahlung. Um ausschließen zu können, dass beobachtete negative Änderungen der Migration auf ein Absterben der Zellen zurück zu führen sind, wurde parallel zu den Boydenkammer-Versuchen ein Viabilitätstest durchgeführt. Zellen aus den, in die Boydenkammer eingesetzten, Zellsuspensionen (24 Stunden nach Bestrahlung) wurden in 96 well Platten mit gleicher Dichte wie in die Boydenkammer ausgesät und 16 Stunden inkubiert. Danach wurde ein XTT-basierter Zellviabilitätstest durchgeführt und die Viabilität der bestrahlten Zellen relativ zur unbestrahlten Kontrolle errechnet (Abbildung 20).

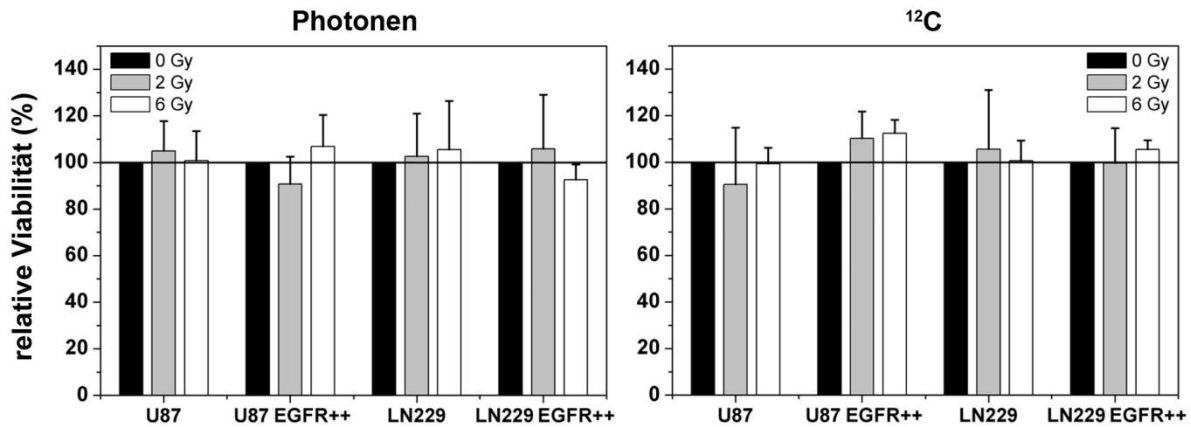


Abbildung 20: Zellviabilität 24 Stunden nach Bestrahlung während den Boydenkammer-Versuchen

24 Stunden nach Bestrahlung mit 2 Gy (graue Balken) und 6 Gy (weiße Balken) Photonen (links) oder ¹²C-Ionen (rechts) wurden die Zelllinien U87, U87 EGFR++, LN229 und LN229 EGFR++ parallel zum Boydenkammer-Versuch in 96 well Platten ausgesät. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation erfolgte ein XTT-basierter Viabilitätstest. Als Referenz (100 %) dienen unbestrahlte Zellen (0 Gy; schwarze Balken). In den Diagrammen aufgetragen ist die relative Viabilität in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche ($N > 3$).

Die Viabilität der Zellen war nach Bestrahlung bis zum Zeitpunkt des Abstoppens der Boydenkammer-Versuche (insgesamt 40 Stunden nach Bestrahlung) in keinem Fall signifikant verändert. Gleiches wurde für Bestrahlungsversuche beobachtet, die mit einer Inhibitorbehandlung kombiniert wurden (Daten nicht gezeigt).

3.2. Stimulierung der Zellen durch EGF

Die Wirkung des Wachstumsfaktors EGF wurde aufgrund des hohen EGFR-Expressionsniveaus anhand der Zelllinien U87 EGFR++ und LN229 EGFR++ untersucht.

3.2.1. Wirkung von EGF auf den EGFR

Zunächst wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen EGF (1, 10, 100 ng/ml) behandelt und die Stimulierung des EGFR anhand der Phosphorylierung der Stelle Y1173 analysiert. Abbildung 21 zeigt die Western Blot Ergebnisse der EGF-Konzentrationsreihe.

Aufgrund des FCS-Entzuges 24 Stunden vor Behandlung mit EGF konnte bei den Kontrollzellen (0 ng/ml EGF) keine Phosphorylierung beobachtet werden. Mit zunehmender EGF-Konzentration war für beide Zelllinien eine deutliche Steigerung der EGFR-Phosphorylierung zu verzeichnen, mit einem Maximum bei 100 ng/ml EGF.

U87 EGFR⁺⁺ zeigte ein allgemein stärkeres Phosphorylierungssignal verglichen mit LN229 EGFR⁺⁺, korrespondierend zu dem unter 3.1.2 beschriebenen höheren EGFR-Expressionsniveaus von U87 EGFR⁺⁺ Zellen. Die Expression des EGFR nahm bei der Stimulierung mit EGF mit steigender EGF-Konzentration ab. Bei 100 ng/ml EGF war vor allem für U87 EGFR⁺⁺ eine stark reduzierte EGFR-Expression zu sehen.

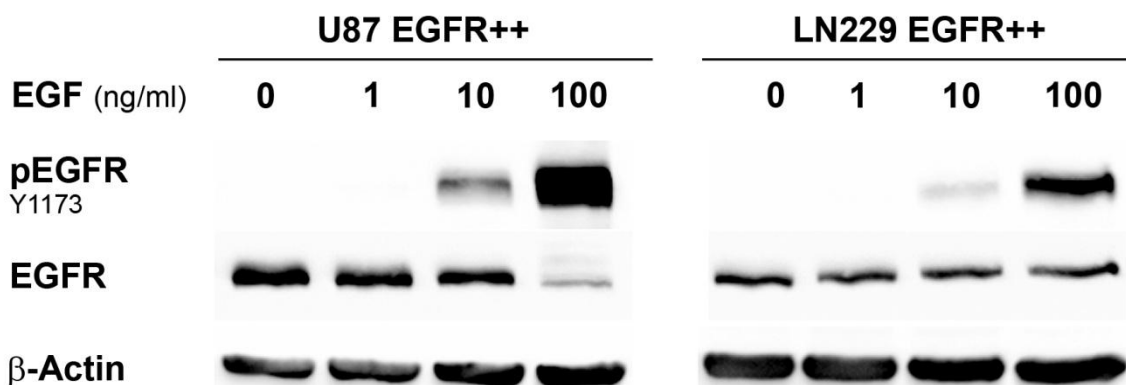


Abbildung 21: Konzentrationsabhängige EGFR Stimulierung durch EGF

Die Zelllinien U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ wurden mit 0, 1, 10 oder 100 ng/ml EGF (15 Minuten) behandelt und anschließend lysiert. Die Phosphorylierung der Stelle Y1173 sowie die Expression des EGFR wurden mittels Western Blot aus dem Gesamt-Zellextrakt (50 µg Protein pro Spur) untersucht. β-Actin diente als Haushaltsprotein.

Basierend auf den Ergebnissen der EGF-Konzentrationsreihe wurden alle weiteren EGF-Stimulierungsversuche mit 100 ng/ml EGF durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich die Phosphorylierung des EGFR durch EGF mithilfe eines EGFR-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors hemmen lässt. Für diese Untersuchungen erfolgte eine Behandlung der Zellen mit EGF allein (100 ng/ml; 15 min) bzw. in Kombination mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 (1 µM; 30 Minuten vor EGF-Zugabe). In Abbildung 22 sind die Western Blot Ergebnisse der Stimulierung und Inhibierung des EGFR dargestellt.

Die Behandlung mit EGF führte bei beiden Zelllinien zu einer starken Phosphorylierung des EGFR (Y1173). Bei kombinierter Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 war nahezu kein Phosphorylierungssignal detektierbar. Die Expression des EGFR war bei EGF-Behandlung deutlich reduziert, während das Signal der Behandlung mit EGF und AG1478 dem der Kontrollprobe entsprach.

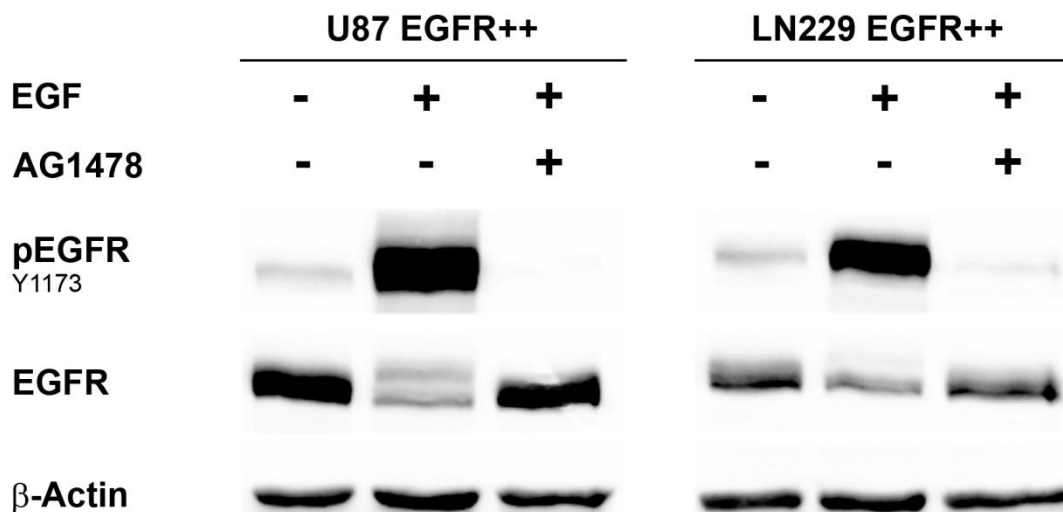


Abbildung 22: Stimulierung des EGFR mit EGF und Inhibierung mit AG1478

Die Zelllinien U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ wurden mit 100 ng/ml EGF allein oder in Kombination mit AG1478 (1 µM) behandelt. Als Kontrollprobe dienten unbehandelte Zellen. Die Phosphorylierung und Expression des EGFR wurden mittels Western Blot aus dem Gesamt-Zellextrakt (50 µg Protein pro Spur) untersucht. β-Actin diente als Haushaltprotein.

3.2.2. Wirkung von EGF auf die Zellmigration

Die Wirkung des Wachstumsfaktors EGF auf die Zellmigration wurde in Boydenkammer-Versuchen analysiert. Dabei wurden die Zellen zunächst mit 100 ng/ml EGF vorstimuliert und in FCS-freiem Medium in die Boydenkammer gegeben. Weiterhin erfolgte bei der Beschickung der Boydenkammern eine Zugabe von EGF in das FCS-freie Medium, welches in den Vertiefungen der unteren Boydenkammerplatte eingesetzt wurde. Im Falle einer kombinierten EGFR-Inhibierung ging der EGF-Stimulierung die Behandlung mit AG1478 (1 µM) voraus. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 23 dargestellt.

Die Stimulierung der Zellen mit EGF bewirkte eine signifikante Steigerung der Zellmigration auf 327 % für U87 EGFR⁺⁺ bzw. 219 % für LN229 EGFR⁺⁺ bezogen auf die mit DMSO behandelten Kontrollzellen (100 %). Bei zusätzlicher EGFR-Inhibierung mit AG1478 ergab sich eine deutlich geringere Migrationssteigerung auf 209 % für U87 EGFR⁺⁺ und 154 % für LN229 EGFR⁺⁺. Die Migration der mit EGF und AG1478 behandelten Zellen war sowohl signifikant größer bezogen auf die Kontrollprobe (*) als auch signifikant kleiner bezogen auf die Zellen, die nur mit EGF behandelt wurden (#).

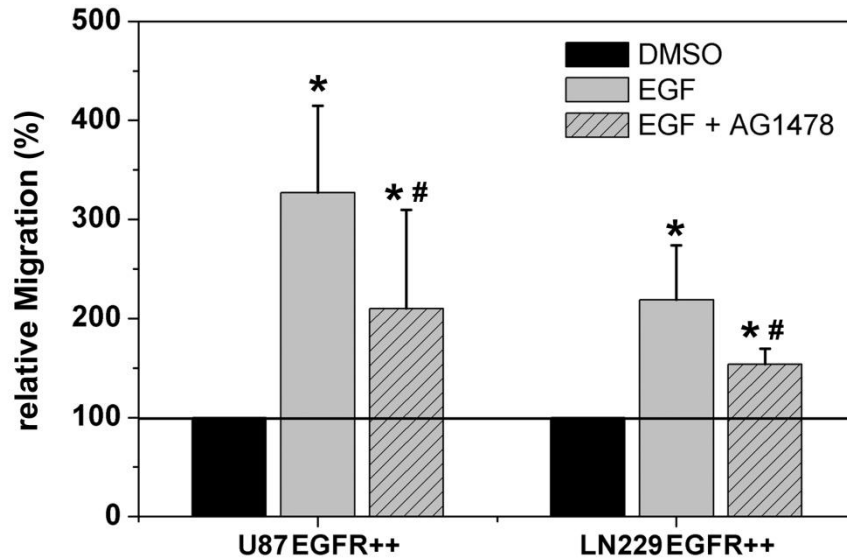


Abbildung 23: Zellmigration nach Behandlung mit EGF und AG1478

Die Zelllinien U87 EGFR++ und LN229 EGFR++ wurden mit 100 ng/ml EGF allein (graue Balken) oder in Kombination mit AG1478 (1 μ M; gestreifte Balken) behandelt. Als Kontrollprobe dienten mit DMSO behandelte Zellen (schwarze Balken). Die Anzahl migrierender Zellen wurde in der Boydenkammer ermittelt und auf die Migration der Kontrollproben (100 %) relativiert. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Migration in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche ($N > 3$). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die Kontrollprobe (*) sowie auf die mit EGF behandelte Probe (#), bestimmt.

3.2.3. Wirkung von EGF auf intrazelluläre Signalproteine

3.2.3.1. Phosphorylierung und Expression von AKT und ERK1/2 nach EGF-Stimulierung

Der Einfluss der EGF-Stimulierung auf die EGFR-gekoppelten Signalproteine AKT und ERK1/2 wurde zunächst mittels Western Blot analysiert. Zum Einsatz kamen neben dem EGFR-Inhibitor AG1478 auch der PI3K-Inhibitor LY294002 und der MAPK-Inhibitor U0126. Die Ergebnisse der Analyse des Phosphorylierungs- und Expressionsstatus sind in Abbildung 24 gezeigt.

Die bereits in 3.2.1 beschriebene Steigerung der EGFR-Phosphorylierung nach EGF-Stimulierung führte bei beiden Zelllinien ebenfalls zu einer gesteigerten Phosphorylierung der Signalproteine AKT und ERK1/2, welche durch eine EGFR-Hemmung mit AG1478 deutlich reduziert wurde. Durch den PI3K-Inhibitor LY294002 wurde die Phosphorylierung von AKT spezifisch gehemmt, während die Phosphorylierung von EGFR und ERK1/2 unverändert blieb. U87 EGFR++ wies allerdings im Vergleich zu

LN229 EGFR⁺⁺ generell eine erhöhte AKT-Phosphorylierung auf. Der MAPK-Inhibitor U0126 inhibierte in den zwei Zelllinien spezifisch die Phosphorylierung von ERK1/2. Auffällig war, dass eine gesteigerte ERK1/2-Phosphorylierung mit einer reduzierten Expression des Proteins einherging, ähnlich zur Reaktion der EGFR-Expression auf die EGF-Stimulierung.

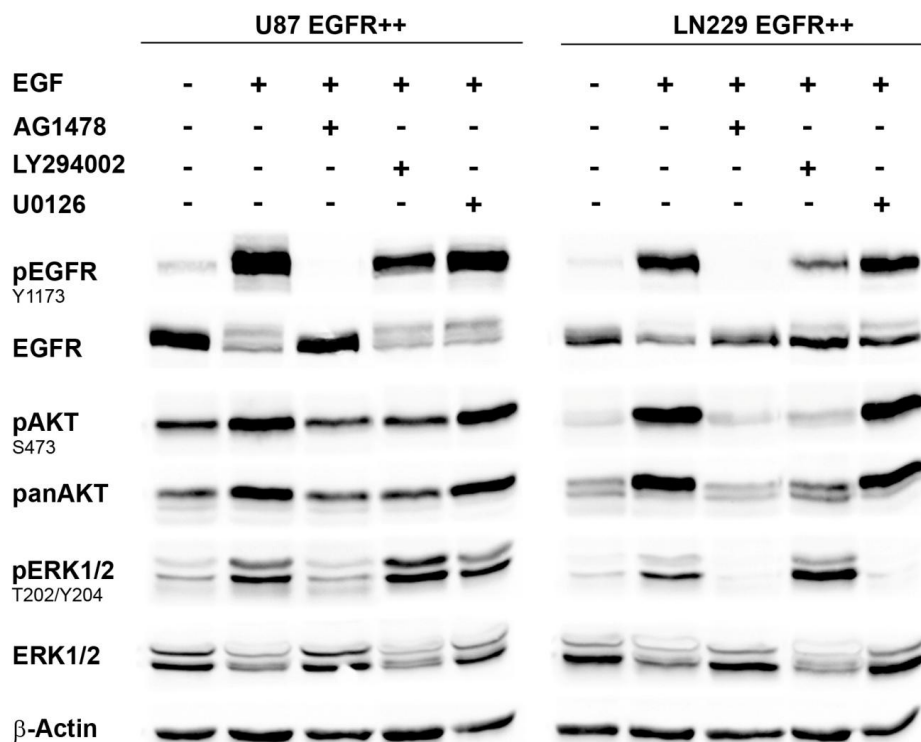


Abbildung 24: Einfluss der EGF-Stimulierung auf die intrazellulären Signalproteine AKT und ERK1/2

Die Zelllinien U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ wurden mit 100 ng/ml EGF allein oder in Kombination mit 1 μ M AG1478, 10 μ M LY294002 oder 10 μ M U0126 behandelt. Als Kontrollprobe dienen mit DMSO behandelte Zellen. Die Phosphorylierung und Expression der Proteine EGFR, AKT und ERK1/2 wurden mittels Western Blot aus dem Gesamt-Zellextrakt (50 μ g Protein pro Spur) untersucht. β -Actin diente als Haushaltsprotein.

3.2.3.2. Beeinflussung der EGF-stimulierten Zellmigration durch Inhibitoren des PI3K und MAPK Signalweges

Die Wirkung der Inhibitoren LY294002 und U0126 auf die EGF-stimulierte Zellmigration wurde in Boydenkammer-Versuchen (wie unter 3.2.2 beschrieben) analysiert. Abbildung 25 zeigt die relativen Änderungen der Migration nach Behandlung der Zellen mit EGF und LY294002 bzw. U0126, wobei in diesem Fall die Migration der nur mit EGF-behandelten Zellen als Referenz zu 100 % gesetzt wurde. In den unabhängigen Boydenkammer-Versuchen wurden der Vollständigkeit halber auch Zellen eingesetzt, die nur mit DMSO behandelt

wurden, um die EGF-vermittelte Migrationssteigerung zu zeigen. Die Effekte entsprachen denen in Abbildung 23, weshalb an dieser Stelle lediglich darauf hingewiesen wird.

Die Inhibitor-Analysen zeigten, dass die EGF-stimulierte Migration der U87 EGFR⁺⁺ Zellen durch LY294002 und U0126 signifikant gehemmt werden kann. Der Anteil migrierender Zellen betrug nach der Behandlung mit LY294002 noch 88 % und mit U0126 75 % bezogen auf die ungehemmte EGF-stimulierte Kontrollprobe. Bei LN229 EGFR⁺⁺ zeigte sich bei der Analyse ein anderes Bild. Durch LY294002 wurde die EGF-vermittelte Migration auf 92 % reduziert, die Behandlung mit U0126 führte dagegen zu keiner signifikanten Änderung.

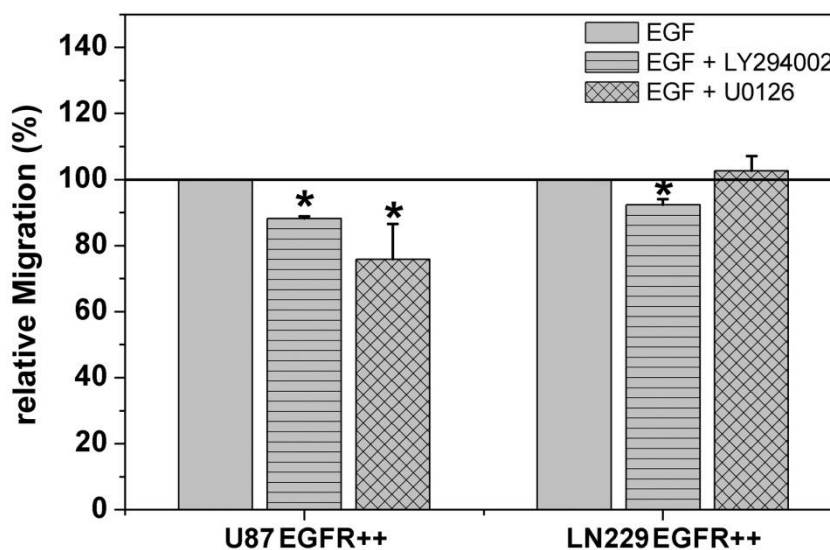


Abbildung 25: EGF-stimulierte Zellmigration nach Behandlung mit LY294002 oder U0126

Die Zelllinien U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ wurden mit EGF und LY294002 (10 μ M; horizontal gestreifte Balken) bzw. U0126 (10 μ M; Balken mit Netzmuster) behandelt. Als Referenz dienten nur mit EGF behandelte Zellen (100 ng/ml; graue Balken). Die Anzahl migrierender Zellen wurde in der Boydenkammer ermittelt und auf die Migration der Kontrollproben (100 %) relativiert. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Migration in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche (N > 3). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die mit EGF behandelte Probe (*), bestimmt.

3.3. Bestrahlung der Zellen mit Photonen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Bestrahlungsexperimente mit Photonenstrahlung dargestellt. Im Fokus der Analysen zur Strahlenwirkung stand zunächst die zelluläre Antwort im Hinblick auf die Motilität. Diese wurden an proteinbiochemische Untersuchungen des EGFR, sowie zentraler regulatorischer Signalproteine (AKT und ERK1/2) gekoppelt. Ergänzend erfolgte schließlich auch eine Kombination aus Bestrahlung und Einsatz spezifischer Signalweginhibitoren.

3.3.1. Einfluss der Photonenstrahlung auf die Zellmigration

Die Migrationsversuche erfolgten 24 Stunden nach Photonenbestrahlung. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde im Labor das Transportmedium gegen frisches Medium (mit FCS) ausgetauscht und die Zellen 24 Stunden inkubiert. In den Boydenkammern wurde ausschließlich Medium mit FCS (10 % für U87 und U87 EGFR++, 5 % für LN229 und LN229 EGFR++) eingesetzt, sowohl in den Vertiefungen der unteren als auch der oberen Platte. Es bestand demnach in Migrationsrichtung kein äußerer, chemischer Stimulus für die Zellen. Die Ergebnisse der Migrationsanalysen der Wildtyp- sowie EGFR-überexprimierenden Zelllinien sind in Abbildung 26 gezeigt.

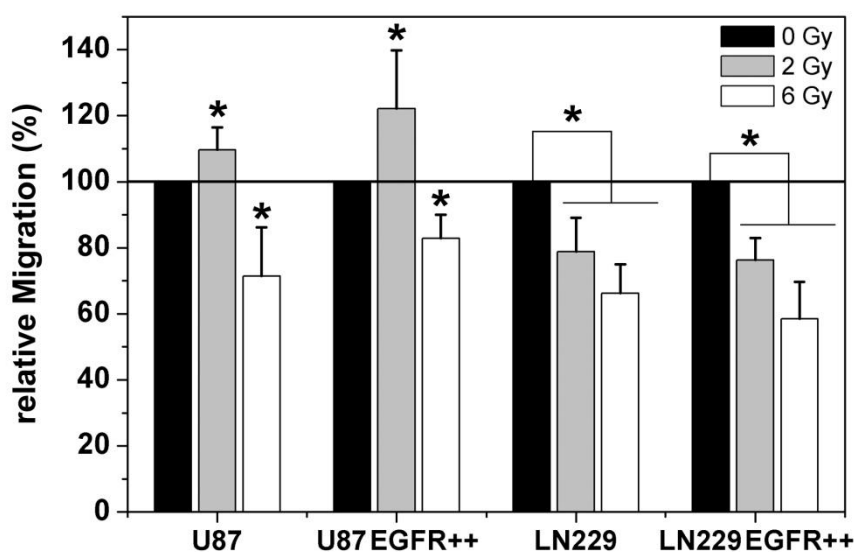


Abbildung 26: Zellmigration 24 Stunden nach Photonenbestrahlung

Die Zelllinien U87, U87 EGFR++, LN229 und LN229 EGFR++ wurden mit 2 Gy (graue Balken) und 6 Gy (weiße Balken) Photonen bestrahlt. Als Referenz dienten unbestrahlte Zellen (0 Gy, schwarze Balken). Die Anzahl migrierender Zellen wurde in der Boydenkammer ermittelt und auf die Migration der Kontrollproben (100 %) relativiert. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Migration in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche ($N > 3$). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*), bestimmt.

Die Zelllinien U87 und U87 EGFR++ zeigten eine signifikante Zunahme der Migration nach Bestrahlung mit 2 Gy Photonen auf 110 % bzw. 122 %. Bei einer höheren Dosis von 6 Gy war der Anteil migrierender Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollprobe deutlich verringert (71 % bzw. 83 %). Bei LN229 und LN229 EGFR++ zeigte sich eine andere Reaktion. Hier wurde eine dosisabhängige Reduktion der Zellmigration auf 78 % bzw. 76 % nach 2 Gy und auf 66 % bzw. 58 % nach 6 Gy festgestellt. Alle Änderungen waren statistisch signifikant im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

3.3.2. Einfluss der Photonenstrahlung auf den EGFR

Aufgrund der Zelllinien-spezifischen Änderungen in der Migration nach 2 Gy Photonenstrahlung (Abbildung 26), wurde bei gleicher Dosis der Phosphorylierungs- und Expressionsstatus des EGFR mittels Western Blot untersucht. Da sich die Änderungen in der Migration zwischen den Wildtyp- und Überexpressionslinien nicht unterschieden, beschränkten sich die proteinbiochemischen Analysen auf U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺. Die Herstellung der Zelllysate fand zu verschiedenen, definierten Zeitpunkten nach Bestrahlung (5, 30, 60, 120, 180, 240, 300 Minuten) statt. In Abbildung 27 sind die densitometrischen Auswertungen von mindestens drei unabhängigen Versuchen grafisch dargestellt, jeweils kombiniert mit einer repräsentativen Western Blot Aufnahme eines einzelnen Versuches.

Die Western Blot Analysen für U87 EGFR⁺⁺ zeigten nach 2 Gy Photonenbestrahlung eine deutliche zeitabhängige Zunahme der EGFR-Phosphorylierung (120 bis 300 Minuten). Die Expression des EGFR blieb unverändert mit einer leichten Tendenz zur Expressionsreduktion ab 240 Minuten. Bei LN229 EGFR⁺⁺ konnten weder signifikante Phosphorylierungs- noch Expressionsänderungen für den EGFR festgestellt werden.

3.3.3. Einfluss der Photonenstrahlung auf intrazelluläre Signalproteine

Parallel zur proteinbiochemischen Untersuchung des EGFR wurden aus den nach Bestrahlung zu definierten Zeitpunkten hergestellten Zelllysaten (5, 30, 60, 120, 180, 240, 300 Minuten) auch die Signalproteine AKT und ERK1/2 hinsichtlich ihrer Phosphorylierung und Expression untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 28 dargestellt.

Die Phosphorylierung von AKT und ERK1/2 stieg für U87 EGFR⁺⁺ ab 180 Minuten nach 2 Gy Photonenbestrahlung zeitabhängig signifikant an, während die Proteinexpression, abgesehen von einer leichten Erhöhung bei AKT, keine Änderungen aufwies. Hinsichtlich der Expression nach Bestrahlung unterschieden sich die Zelllinien kaum. Für LN229 EGFR⁺⁺ wurde lediglich eine sehr starke kontinuierliche Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung verzeichnet. Eine Phosphorylierung von AKT konnte zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

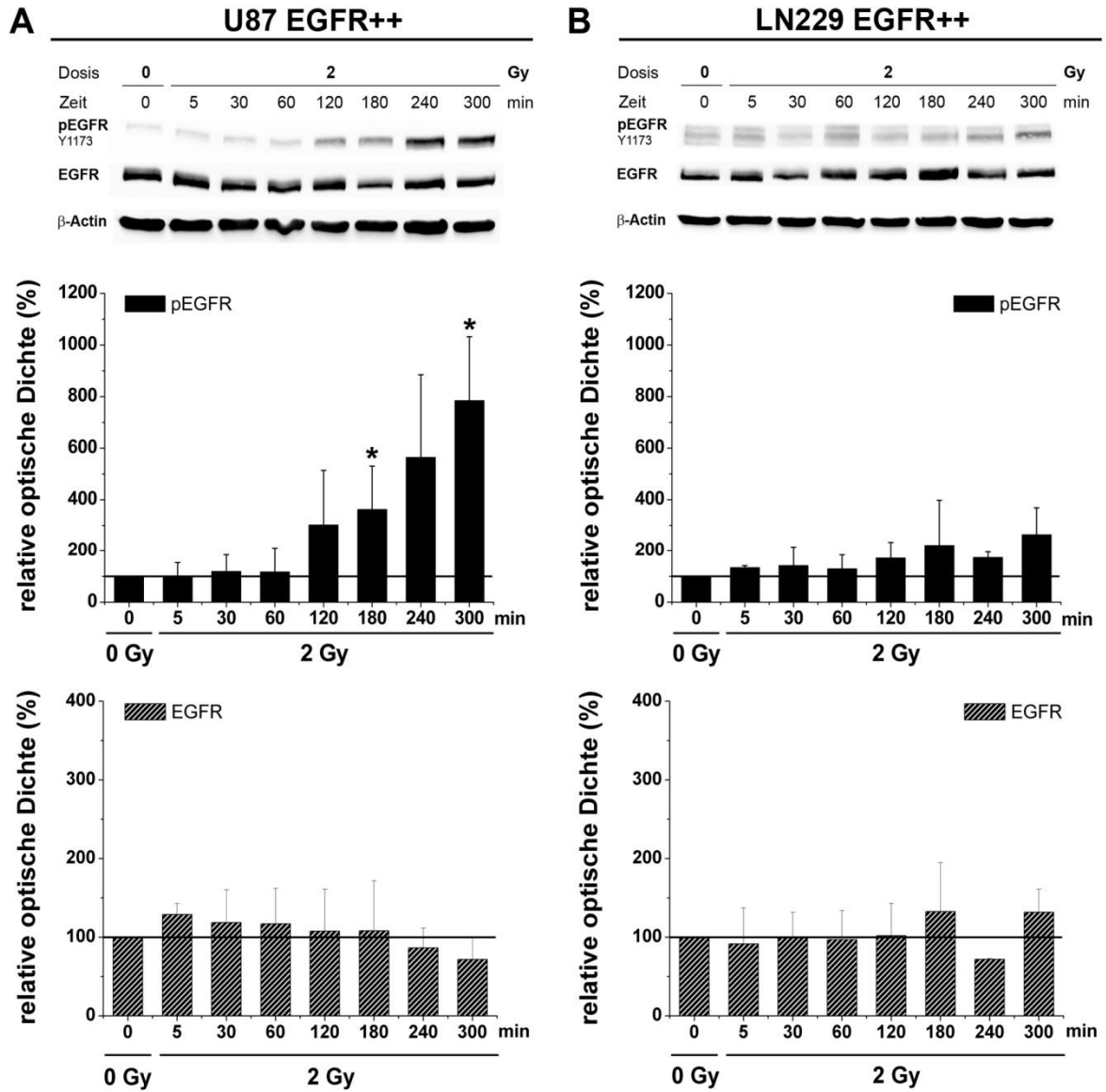


Abbildung 27: Phosphorylierung und Expression des EGFR nach Photonenbestrahlung

Die Zelllinien U87 EGFR++ (A) und LN229 EGFR++ (B) wurden mit 2 Gy Photonen bestrahlt und nach definierten Zeitpunkten lysiert. Die Phosphorylierung (schwarze Balken) und die Expression (gestreifte Balken) des EGFR wurden mittels Western Blot analysiert. Das Bandenmuster eines repräsentativen Versuches ist in Kombination mit der densitometrischen Auswertung dargestellt. Für die Quantifizierung diente β-Actin als Haushaltsprotein zur Normalisierung. Unbestrahlte Zellen (0 Gy) wurden als Referenz auf 100 % gesetzt. In den Diagrammen aufgetragen ist die relative optische Dichte in Prozent als Mittelwerte (± SD) der unabhängigen Versuche (N > 3). Mittels t-Test (p < 0,05) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*), bestimmt.

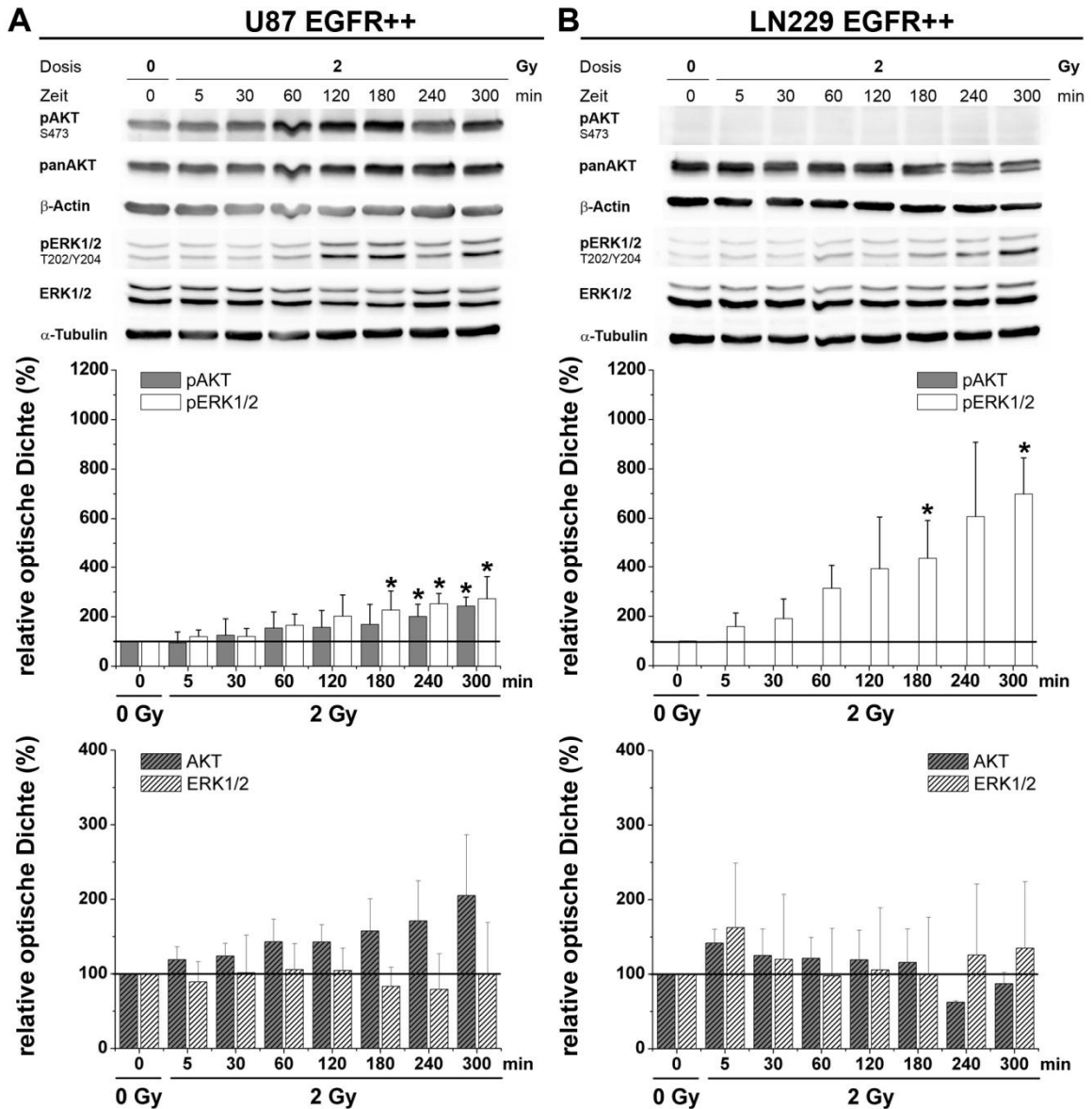


Abbildung 28: Phosphorylierung und Expression von AKT und ERK1/2 nach Photonenbestrahlung

Die Zelllinien U87 EGFR++ (A) und LN229 EGFR++ (B) wurden mit 2 Gy Photonen bestrahlt und nach definierten Zeitpunkten lysiert. Phosphorylierung (einfarbige Balken) und Expression (gestreifte Balken) von AKT (graue Balken) und ERK1/2 (weiße Balken) wurden mittels Western Blot analysiert. Das Bandenmuster eines repräsentativen Versuches ist in Kombination mit der densitometrischen Auswertung dargestellt. Für die Quantifizierung dienten β-Actin bzw. α-Tubulin als Haushaltsprotein zur Normalisierung. Unbestrahlte Zellen (0 Gy) wurden als Referenz auf 100 % gesetzt. In den Diagrammen aufgetragen ist die relative optische Dichte in Prozent als Mittelwerte (± SD) der unabhängigen Versuche (N > 3). Mittels t-Test (p < 0,05) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*), bestimmt.

3.3.4. Kombination von Photonenbestrahlung und Behandlung der Zellen mit Inhibitoren des EGFR, PI3K und MAPK Signalweges

Nach der Analyse der Wirkung der Photonenstrahlung auf die Migration der Glioblastomzellen und den EGFR, sowie der Signalproteine AKT und ERK1/2, wurden diese Bestrahlungsversuche in Kombination mit den Inhibitoren AG1478, LY294002 und U0126 wiederholt.

3.3.4.1. Zellmigration nach Kombinationsbehandlung

Zunächst wurde die Migration nach Kombination von Bestrahlung und Inhibitorbehandlung untersucht. Dies geschah ebenfalls 24 Stunden nach Bestrahlung. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte 30 Minuten vor der Bestrahlung bzw. vor dem Füllen der Kulturflaschen für den Transport. Die Boydenkammer-Bedingungen entsprachen denen der Photonenbestrahlung ohne Inhibitoren. In Abbildung 29 sind die Boydenkammerergebnisse der Photonenbestrahlung unter Einsatz der Inhibitoren AG1478, LY294002 und U0126 gezeigt.

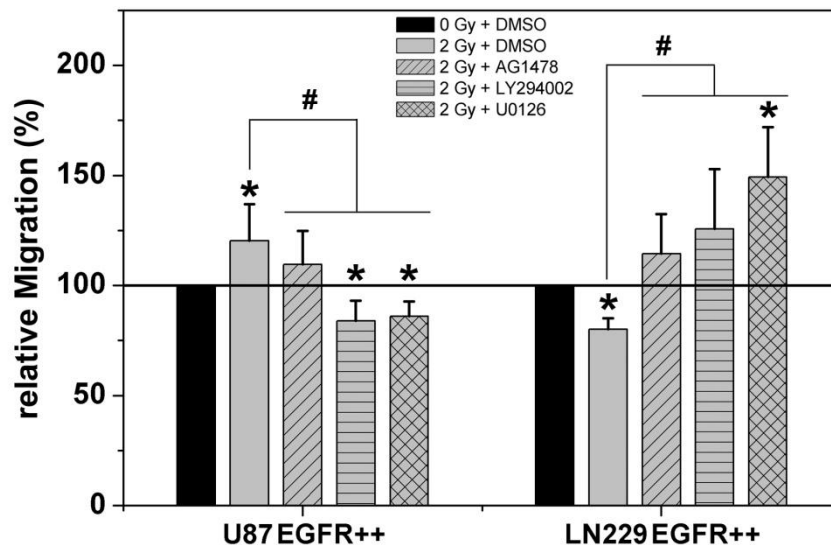


Abbildung 29: Zellmigration 24 Stunden nach Photonenbestrahlung und Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126

Die Zelllinien U87 EGFR++ und LN229 EGFR++ wurden mit 2 Gy (graue Balken) Photonen allein oder in Kombination mit AG1478 (1 μ M; quer gestreifte Balken), LY294002 (10 μ M; horizontal gestreifte Balken) bzw. U0126 (10 μ M; Balken mit Netzmuster) behandelt. Als Referenz dienen unbestrahlte Zellen (0 Gy, schwarze Balken), denen DMSO zugesetzt wurde. Die Anzahl migrierender Zellen wurde in der Boydenkammer ermittelt und auf die Migration der Kontrollproben (100 %) relativiert. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Migration in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche (N > 3). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*) und bezogen auf die mit 2 Gy ohne Inhibitor behandelte Probe (#), bestimmt.

Die Kombinationsversuche zeigten, dass die bei U87 EGFR⁺⁺ auftretende, Strahlen-induzierte Migrationssteigerung durch die Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren signifikant reduziert werden kann. Bei Einsatz von AG1478 verringerte sich die relative Migration von 120 % (nur Bestrahlung) auf 110 % (Kombination), wobei sich der Wert der Kombinationsbehandlung nicht signifikant von der unbestrahlten Kontrollprobe (100 %) unterschied. Eine Behandlung der Zellen mit LY294002 oder U0126 führte zu einer Reduktion der Migration auf etwa 85 %, was sowohl signifikant zur unbestrahlten Kontrolle, als auch zu der mit 2 Gy ohne Inhibitor behandelten Probe war.

Bei LN229 EGFR⁺⁺ ließ sich ein gegensätzlicher Effekt feststellen. Der bei der Photonenbestrahlung beobachtete Rückgang der Migration war bei Behandlung mit den Inhibitoren nicht mehr vorhanden. Stattdessen stieg die Migration über das Niveau der unbestrahlten Probe an, auf bis zu 149 % für U0126.

3.3.4.2. Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 nach Kombinationsbehandlung

Inwiefern die Inhibitoren die Wirkung der Photonenstrahlung in Bezug auf die Phosphorylierung und die Expression des EGFR und der gekoppelten Signalproteine AKT und ERK1/2 beeinflussten, ist in Abbildung 30 dargestellt. Untersucht wurde in diesen Versuchen der Zeitpunkt 300 Minuten nach Photonenbestrahlung.

Die zu diesem Zeitpunkt nach Photonenbestrahlung auftretende Steigerung der EGFR-Phosphorylierung konnte durch die Behandlung der Zellen mit AG1478 in Kombination mit Photonenstrahlung bei beiden Zelllinien signifikant auf etwa 35 %, bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle (100 %), gehemmt werden. Gleiches galt für die ERK1/2-Phosphorylierung mit einer Reduktion auf 82 % für U87 EGFR⁺⁺ bzw. auf 51 % für LN229 EGFR⁺⁺. Für die Phosphorylierung von AKT ergaben sich nach Behandlung mit AG1478 keine Änderungen. Die Inhibitoren LY294002 und U0126 führten bei U87 EGFR⁺⁺ Zellen spezifisch zu einer signifikanten Hemmung der Phosphorylierung von AKT bzw. ERK1/2. In LN229 EGFR⁺⁺ Zellen war lediglich die ERK1/2-Phosphorylierung bei Behandlung mit U0126 signifikant reduziert. Die Expression der drei Proteine wurde nur in einzelnen Fällen in geringem Maße durch die Bestrahlung mit Photonen bzw. die kombinierte Inhibitorbehandlung beeinflusst.

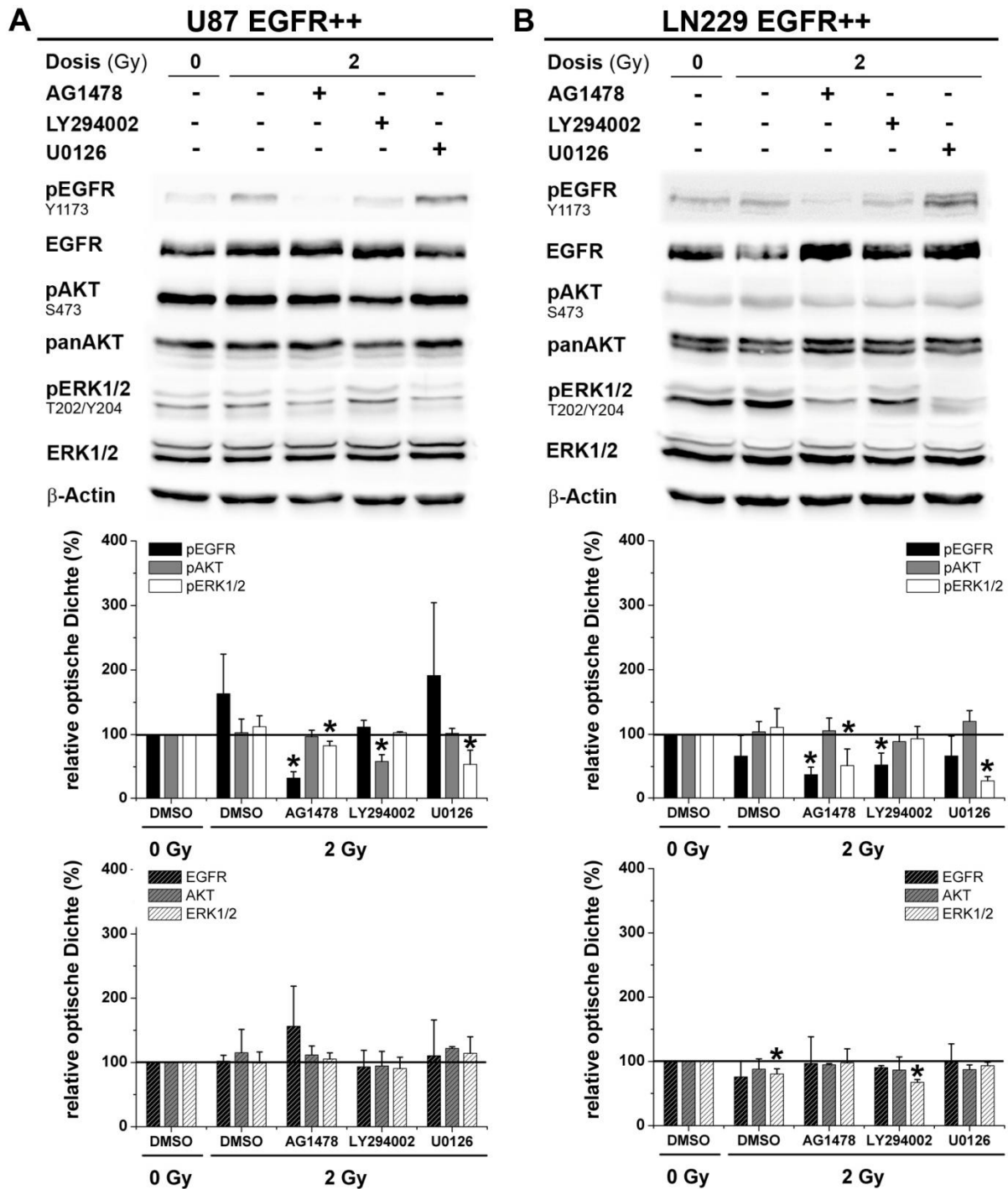


Abbildung 30: Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 300 Minuten nach Photonenbestrahlung und Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126

Die Zelllinien U87 EGFR++ (A) und LN229 EGFR++ (B) wurden mit 2 Gy Photonen allein oder in Kombination mit AG1478 (1 μ M), LY294002 (10 μ M) bzw. U0126 (10 μ M) behandelt und 300 Minuten nach Bestrahlung lysiert. Phosphorylierung (einfarbige Balken) und Expression (gestreifte Balken) von EGFR (schwarze Balken), AKT (graue Balken) und ERK1/2 (weiße Balken) wurden mittels Western Blot analysiert. Das Bandenmuster eines repräsentativen Versuches ist in Kombination mit der densitometrischen Auswertung dargestellt. Für die Quantifizierung diente β -Actin als Haushaltsprotein zur Normalisierung. Unbestrahlte Zellen (0 Gy) wurden als Referenz auf 100 % gesetzt. In den Diagrammen aufgetragen ist die relative optische Dichte in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche (N = 3). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*), bestimmt.

3.4. Bestrahlung der Zellen mit schweren ^{12}C -Ionen

Analog zu den Bestrahlungsversuchen mit Photonen erfolgten die Untersuchungen der Wirkung von schweren Kohlenstoffionen (^{12}C) auf die Motilität der Zellen und die EGFR-gekoppelten Signalwege. Die Anzahl unabhängiger Versuche wurde dabei stark von der limitierten Strahlzeit an der GSI in Darmstadt begrenzt.

3.4.1. Einfluss der ^{12}C -Strahlung auf die Zellmigration

Die Migrationsuntersuchungen in der Boydenkammer fanden 24 Stunden nach ^{12}C -Bestrahlung unter den gleichen Bedingungen wie für die bereits beschriebenen Versuche mit Photonen statt. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der relativen Migration nach 2 Gy und 6 Gy ^{12}C -Strahlung.

Bei allen vier Zelllinien war die Migration nach ^{12}C -Bestrahlung signifikant reduziert. Für U87 und U87 EGFR++ gab es mit einer relativen Migration von etwa 74 % bzw. 58 % nur sehr geringe Unterschiede zwischen 2 Gy und 6 Gy ^{12}C -Strahlung. Demgegenüber konnte bei LN229 und LN229 EGFR++ mit einer Reduktion auf ungefähr 66 % nach 2 Gy und 40-49 % nach 6 Gy Ionenstrahlung eine deutliche Dosisabhängigkeit beobachtet werden.

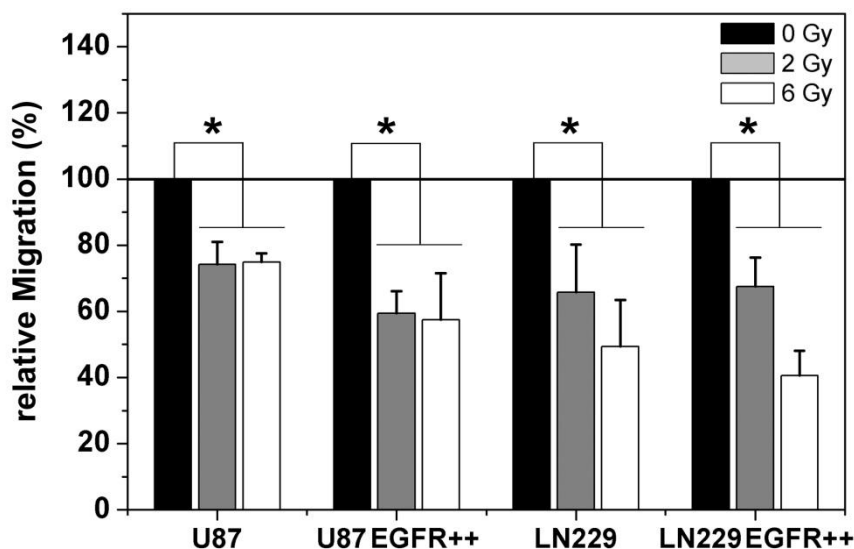


Abbildung 31: Zellmigration 24 Stunden nach ^{12}C -Bestrahlung

Die Zelllinien U87, U87 EGFR++, LN229 und LN229 EGFR++ wurden mit 2 Gy (graue Balken) und 6 Gy (weiße Balken) ^{12}C -Ionen bestrahlt. Als Referenz dienten unbestrahlte Zellen (0 Gy, schwarze Balken). Die Anzahl migrierender Zellen wurde in der Boydenkammer ermittelt und auf die Migration der Kontrollproben (100 %) relativiert. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Migration in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche ($N > 3$). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*), bestimmt.

3.4.2. Einfluss der ^{12}C -Strahlung auf den EGFR

Die Analysen der Phosphorylierung und Expression des EGFR nach ^{12}C -Bestrahlung wurden für die Zelllinien U87 EGFR $^{++}$ und LN229 EGFR $^{++}$ durchgeführt (Abbildung 32). Die Herstellung der Zellysate fand 5, 60, 180 und 300 Minuten nach Bestrahlung statt.

Die ^{12}C -Bestrahlung ergab kaum signifikante Änderungen in der Phosphorylierung oder Expression des EGFR. Zu einem Zeitpunkt war die Phosphorylierung bei LN229 EGFR $^{++}$ (300 Minuten) signifikant verringert.

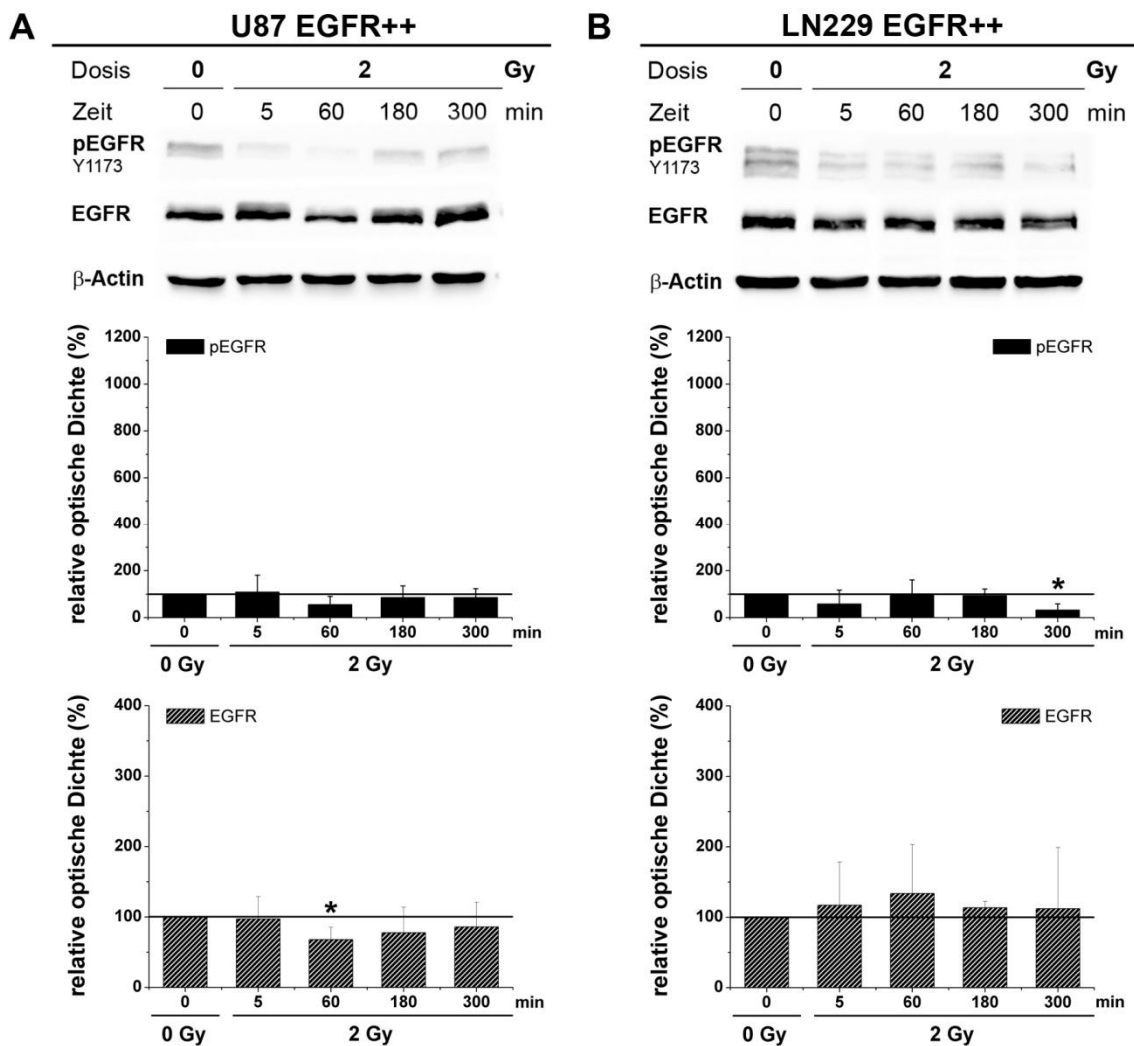


Abbildung 32: Phosphorylierung und Expression des EGFR nach ^{12}C -Bestrahlung

Die Zelllinien U87 EGFR $^{++}$ (A) und LN229 EGFR $^{++}$ (B) wurden mit 2 Gy ^{12}C -Ionen bestrahlt und nach definierten Zeitpunkten lysiert. Phosphorylierung (schwarze Balken) und Expression (gestreifte Balken) des EGFR wurden mittels Western Blot analysiert. Das Bandenmuster eines repräsentativen Versuches ist in Kombination mit der densitometrischen Auswertung dargestellt. Für die Quantifizierung diente β -Actin als Haushaltsprotein zur Normalisierung. Unbestrahlte Zellen (0 Gy) wurden als Referenz auf 100 % gesetzt. In den Diagrammen aufgetragen ist die relative optische Dichte in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche (N = 3). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*), bestimmt.

3.4.3. Einfluss der ¹²C-Strahlung auf intrazelluläre Signalproteine

Die Phosphorylierung und Expression der Signalproteine AKT und ERK1/2 wurden ebenfalls 5, 60, 180 und 300 Minuten nach ¹²C-Bestrahlung mittels Western Blot untersucht (Abbildung 33). Es konnten keine signifikanten Änderungen in der Phosphorylierung und Expression von AKT und ERK1/2 nach ¹²C-Bestrahlung festgestellt werden.

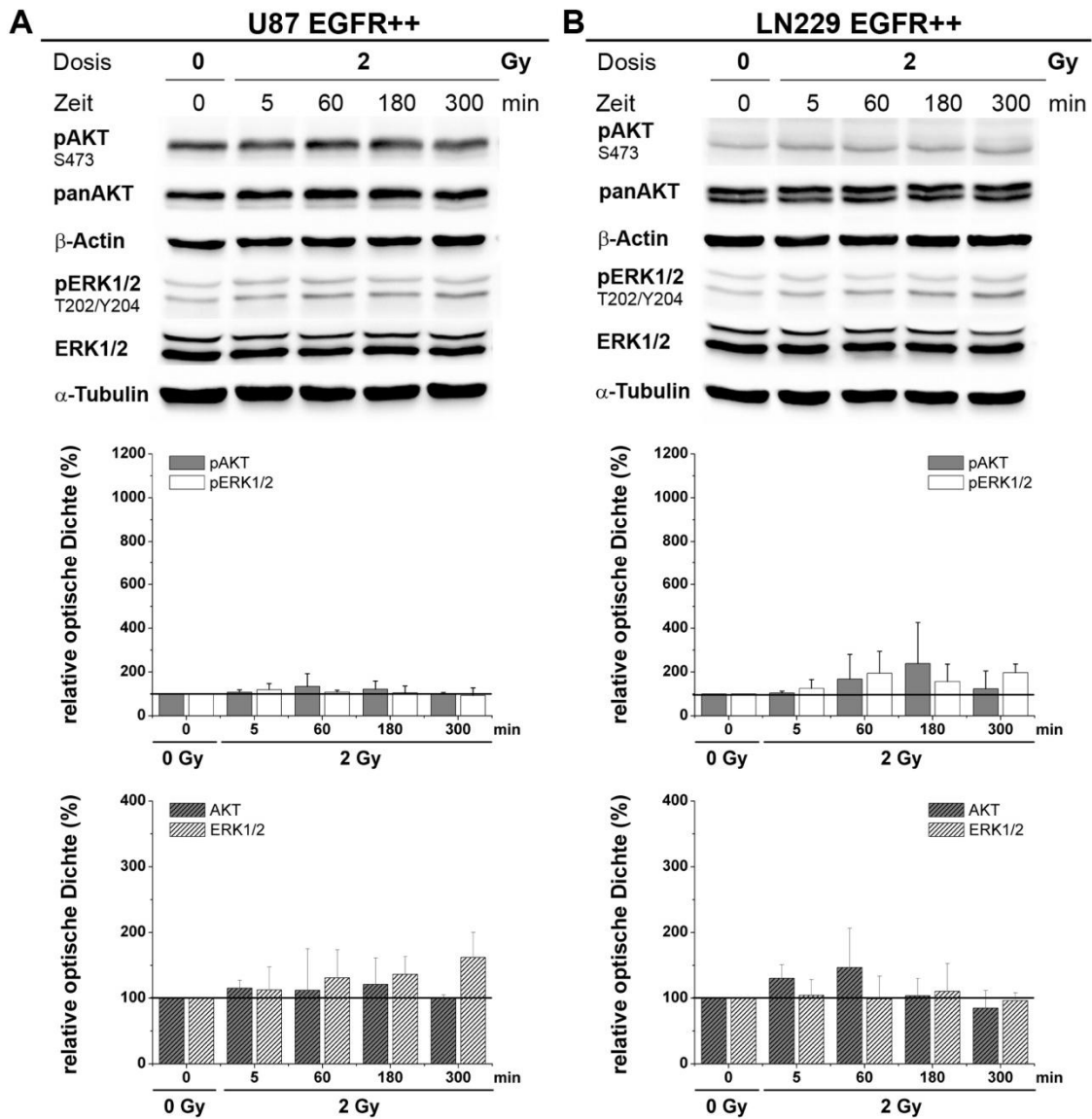


Abbildung 33: Phosphorylierung und Expression von AKT und ERK1/2 nach ¹²C-Bestrahlung

Die Zelllinien U87 EGFR++ (A) und LN229 EGFR++ (B) wurden mit 2 Gy ¹²C-Ionen bestrahlt und nach definierten Zeitpunkten lysiert. Phosphorylierung (einfarbige Balken) und Expression (gestreifte Balken) von AKT (graue Balken) und ERK1/2 (weiße Balken) wurden mittels Western Blot analysiert. Das Bandenmuster eines repräsentativen Versuches ist in Kombination mit der densitometrischen Auswertung dargestellt. Für die Quantifizierung diente β-Actin bzw. α-Tubulin als Haushaltsprotein zur Normalisierung. Unbestrahlte Zellen (0 Gy) wurden als Referenz auf 100 % gesetzt. In den Diagrammen aufgetragen ist die relative optische Dichte in Prozent als Mittelwerte (± SD) der unabhängigen Versuche (N > 3). Mittels t-Test (p < 0,05) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*), bestimmt.

3.4.4. Kombination von ^{12}C -Bestrahlung und Behandlung der Zellen mit Inhibitoren des EGFR, PI3K und MAPK Signalweges

Die ^{12}C -Bestrahlung wurde analog zur Photonenbestrahlung mit der Behandlung mit den Inhibitoren AG1478, LY294002 und U0126 kombiniert.

3.4.4.1. Zellmigration nach Kombinationsbehandlung

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der Boydenkammeranalysen 24 Stunden nach ^{12}C -Bestrahlung und Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126 dargestellt.

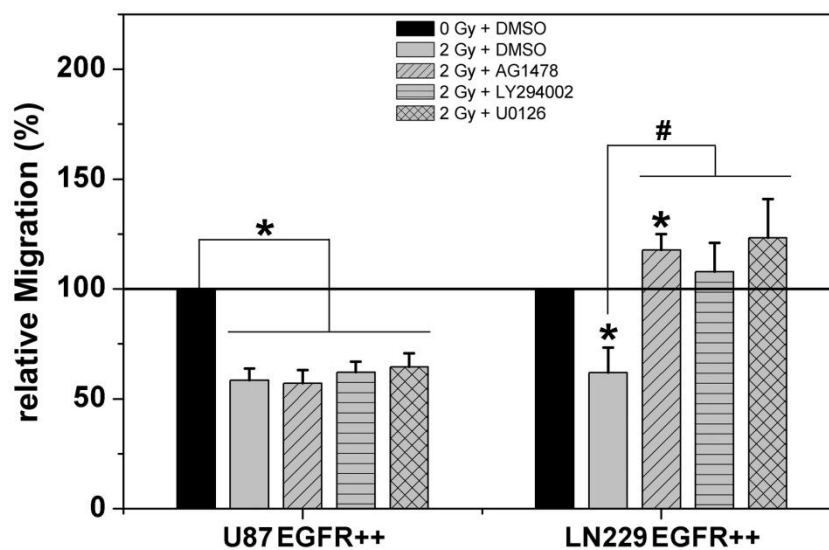


Abbildung 34: Zellmigration 24 Stunden nach ^{12}C -Bestrahlung und Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126

Die Zelllinien U87 EGFR++ und LN229 EGFR++ wurden mit 2 Gy (graue Balken) ^{12}C -Ionen allein oder in Kombination mit AG1478 (1 μM ; quer gestreifte Balken), LY294002 (10 μM ; horizontal gestreifte Balken) bzw. U0126 (10 μM ; Balken mit Netzmuster) behandelt. Als Referenz dienten unbestrahlte Zellen (0 Gy, schwarze Balken), denen DMSO zugesetzt wurde. Die Anzahl migrierender Zellen wurde in der Boydenkammer ermittelt und auf die Migration der Kontrollproben (100 %) relativiert. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Migration in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche (N = 3). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*) und bezogen auf die mit 2 Gy ohne Inhibitor behandelte Probe (#), bestimmt.

Die Migration der U87 EGFR++ Zellen wurde durch die ^{12}C -Bestrahlung signifikant auf ungefähr 60 % reduziert. Hierbei spielte die Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren keine Rolle. Ähnlich stark war auch die relative Migration der LN229 EGFR++ Zellen nach ^{12}C -Bestrahlung allein verringert, allerdings wurde bei der Kombination mit den Inhibitoren

eine signifikante Erhöhung der Migration auf das Niveau der unbestrahlten Probe oder darüber hinaus beobachtet.

3.4.4.2. Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 nach Kombinationsbehandlung

Aufgrund der begrenzten ^{12}C -Strahlzeit konnten die Untersuchungen der Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 nach Bestrahlung in Kombination mit der Inhibitorbehandlung nur in einem unabhängigen Versuch durchgeführt werden. In Abbildung 35 sind daher die Western Blot Bilder dieses Einzelversuches ohne densitometrische Auswertung gezeigt.

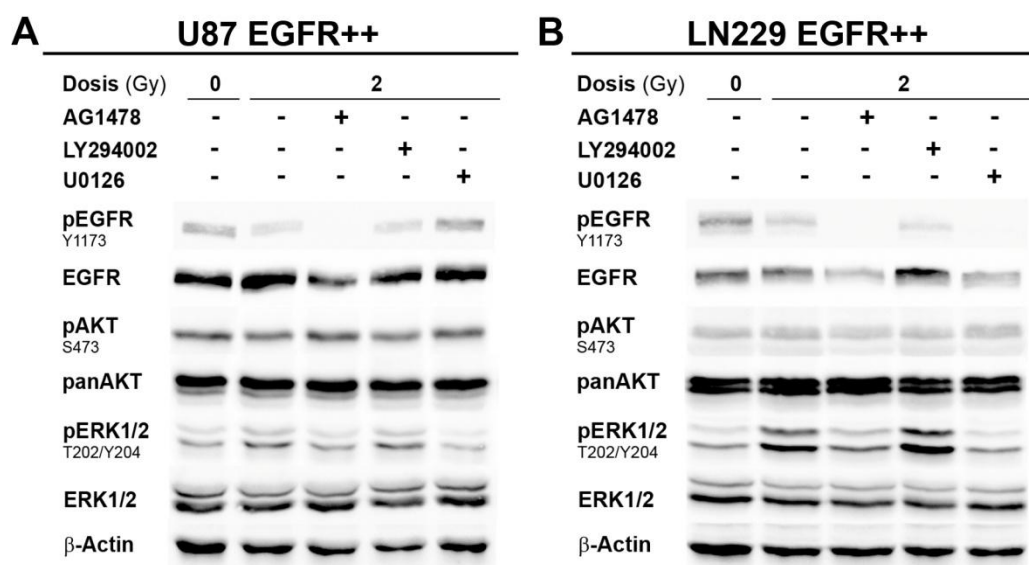


Abbildung 35: Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 300 Minuten nach ^{12}C -Bestrahlung und Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126

Die Zelllinien U87 EGFR++ (A) und LN229 EGFR++ (B) wurden mit 2 Gy ^{12}C -Ionen allein oder in Kombination mit AG1478 (1 μM), LY294002 (10 μM) bzw. U0126 (10 μM) behandelt und 300 Minuten nach Bestrahlung lysiert. Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 wurden mittels Western Blot analysiert. β -Actin diente als Haushaltsprotein. Dargestellt ist ein Einzelversuch.

Der Einzelversuch zeigte, dass die Behandlung mit AG1478 und ^{12}C -Ionen bei beiden Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der EGFR-Phosphorylierung führte. Außerdem war die Phosphorylierung von ERK1/2 ebenfalls reduziert. Der PI3K-Inhibitor LY294002 hatte kaum Einfluss auf die Phosphorylierung der untersuchten Proteine. Dagegen konnte für den MAPK-Inhibitor U0126 eine deutliche Schwächung der ERK1/2-Phosphorylierung detektiert werden.

4. Diskussion

Die Standardtherapie von Glioblastomen kann derzeit, trotz immenser technischer Fortschritte in der Radiotherapie und neuer chemotherapeutischer Ansätze, keine vollständige Heilung des Patienten erzielen. Die Frage nach der biologischen Wirkung von Strahlung ist dabei in der Radiotherapie vor allem mit der Einführung moderner Bestrahlungstechniken immer mehr in den Vordergrund gerückt. Für die konventionelle Strahlentherapie mit Photonen verstärken sich die Hinweise auf eine Strahlen-vermittelte Induktion der Zellmigration, die das Risiko einer Rezidivbildung erhöhen kann. Zum Einfluss von Kohlenstoffionen, die in der modernen Schwerionentherapie verwendet werden, gibt es zurzeit keine ausreichenden Erkenntnisse. Darum wurde im Rahmen dieser Dissertation das Migrationsverhalten von Glioblastomzellen, anhand zweier humaner Zelllinien, nach Photonen- und Schwerionenbestrahlung untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Rolle des EGFR und der Signalproteine AKT und ERK1/2 in der Regulation der Zellmigration mit und ohne Bestrahlung.

Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse vergleichend diskutiert und mit Literaturdaten in Bezug gesetzt. Außerdem wird ein Ausblick auf mögliche Konsequenzen für die Radiotherapie gegeben.

4.1. Charakterisierung der Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zeigten Zelllinien-spezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Morphologie, ihrer EGFR-Expression und ihrem Ansprechen auf Strahlung. Diesen Merkmalen liegt ein unterschiedlicher Genotyp zugrunde, der aufgrund von Chromosomenaberrationen und DNA-Mutationen bei Tumorzellen zu einem abnormalen Phänotyp führt. Das Genom der Linie U87 wurde 2010 von Clark et al. vollständig sequenziert. Es ist gekennzeichnet von sehr großen Chromosomenaberrationen und weist verschiedene Klassen genetischer Mutationen auf (Clark et al. 2010). Dabei wurde vor allem die homozygote Mutation im PTEN Gen identifiziert. Außerdem waren vielfach Gene, die in der Zelladhäsion involviert sind, in der Liste mutierter Gene vertreten. Dies könnte mit dem beobachteten netzartigen Wachstum von U87 Zellen und der Bildung von Zellclustern in Zusammenhang stehen. LN229 zeigte hingegen ein typisches epitheliales Zellwachstum (Abbildung 17). Die EGFR-überexprimierenden Zelllinien U87 EGFR++ und

LN229 EGFR⁺⁺ verhielten sich morphologisch wie die Wildtypzellen. Die Überexpression des EGFR beeinflusste die Zelllinie dementsprechend nicht in ihrem Wachstum.

Das EGFR Gen gehört bei den Glioblastomen zu den am häufigsten amplifiziert und/oder mutiert vorliegenden Genen (Collins 1995). Dies führt zur Überexpression des EGFR bzw. zur Expression verschiedener EGFR-Varianten mit deregulierter Funktion (Fenstermaker und Ciesielski 2007). Die Zelllinien U87 und LN229 exprimierten beide den Wildtyp-EGFR allerdings zeigte U87 eine etwas stärkere Expression als LN229 (Abbildung 18). Diesen Unterschied in der EGFR-Expression beobachteten auch andere Autoren (Carrasco-Garcia et al. 2011). Mutierte EGFR-Varianten wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Allerdings kamen Sublinien von U87 und LN229 zum Einsatz (U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺), die eine starke Überexpression des Wildtyp-EGFR aufwiesen und sich für die Untersuchungen der EGFR-Phosphorylierung nach EGF-Behandlung oder Bestrahlung als geeignet herausstellten.

Die genetischen Unterschiede der Zelllinien führten auch zu einem unterschiedlichen Überleben nach Bestrahlung. Dabei erwiesen sich U87 und U87 EGFR⁺⁺ als die strahlenresistenteren Linien sowohl nach Photonen- als auch ¹²C-Bestrahlung (Abbildung 19). Dies wurde besonders nach 6 Gy Photonenstrahlung mit einem klonogenen Überleben von 20 % bei U87 und U87 EGFR⁺⁺, im Vergleich zu LN229 und LN229 EGFR⁺⁺ mit rund 10 % deutlich. Für 6 Gy ¹²C-Ionen war das Überleben kaum mehr quantifizierbar, da es unter 1 % lag. Bei geringen Dosen Photonenstrahlung waren die Unterschiede zwischen den Zelllinien nicht so stark ausgeprägt (75 % für U87, 65 % für LN229). Sie zeigten sich allerdings deutlich für 2 Gy ¹²C-Ionen. In diesem Fall überlebten rund 20 % U87 und U87 EGFR⁺⁺ Zellen, während es bei LN229 und LN229 EGFR⁺⁺ etwa 10 % waren. Diese Zahlen entsprechen denen der Photonenbestrahlung mit 6 Gy.

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein. So wurde für U87 in dieser Arbeit ein Anteil klonogener Zellen von 75 % nach 2 Gy Photonenbestrahlung ermittelt. Vergleichbare Literaturdaten liegen bei 70-80 % (Delmas et al. 2002; Combs et al. 2012). Combs et al. stellten zudem 2009 in einer vergleichenden Studie dar, dass die Zelllinie U87 strahlenresistenter ist als LN229 (Combs et al. 2009a). Die Autoren gehen davon aus, dass die erhöhte Strahlensensitivität von LN229 in Zusammenhang mit einer p53 Mutation und einer p16 sowie p14 Deletion steht. Die Deregulation dieser Tumorsuppressorgene führt zu einem verkürzten oder fehlenden G2 Arrest, was eine schlechte Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden zur Folge hat. U87 dagegen ist eine p53 Wildtypzelllinie und strahlenresistenter. Die

Studie von Combs et al. zeigte zudem die erhöhte biologische Wirksamkeit (RBW) von ^{12}C -Ionen relativ zu Photonen, wie sie auch in dieser Arbeit zu beobachten war. Eine physikalische Dosis von 2 Gy ^{12}C -Ionen erzielte hier ähnliche Effekte wie 6 Gy Photonen. Dies korreliert mit der in der Literatur für ^{12}C -Ionen angegebenen RBW von ungefähr 3 für U87 und LN229 Zellen (Combs et al. 2009a).

Die in der Morphologie, Rezeptorexpression und Strahlenreaktion festgestellten Unterschiede der beiden Glioblastomzelllinien ließen vermuten, dass sie sich auch hinsichtlich ihrer Migration und der Aktivität von EGFR-gekoppelten Signalwegen nach Bestrahlung unterscheiden. Dies wird in den Abschnitten 4.3 und 4.4 näher erörtert.

Für die Untersuchung der Zellmigration nach Bestrahlung unter standardisierten Bedingungen war es im Vorfeld nötig, die Viabilität der Zellen zum Zeitpunkt der Migrationstests zu charakterisieren. Die Boydenkammerversuche starteten 24 Stunden nach Bestrahlung und beinhalteten eine 16stündige Inkubation. Um auszuschließen, dass eine Reduktion der Migration auf ein Absterben der Zellen zurückzuführen ist, musste sicher gestellt werden, dass bestrahlte Zellen über einen Zeitraum von 40 Stunden nach der Bestrahlung noch vital waren. Ein parallel zur Boydenkammer durchgeführter Viabilitätstest zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen (Abbildung 20). Damit ist davon auszugehen, dass die Zellvitalität im Versuchszeitraum nicht beeinträchtigt war und die beobachteten Migrationsänderungen von einem Strahleffekt induziert wurden.

4.2. EGF-vermittelte Zellstimulierung

Der Wachstumsfaktor EGF ist ein natürlicher Ligand des EGF-Rezeptors und induziert nach Bindung an die extrazelluläre Domäne die Dimerisierung des Rezeptors. Dies führt in der Folge zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne und zur Phosphorylierung von Tyrosinen am regulatorischen C-terminalen Rezeptorende (Hong et al. 2010). Die phosphorylierten Tyrosine fungieren als Bindungsstellen für intrazelluläre Signalproteine mit einer SH2 (Src homology 2) oder PTB (phosphotyrosine binding) Domäne (Shoelson 1997). Dadurch werden externe Stimuli an zellinterne Signalkaskaden übertragen. Der EGFR verfügt über sechs wichtige Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148, Y1173), die mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und Effizienz durch die Bindung von EGF am Rezeptor phosphoryliert werden (Guo et al. 2003). Die Stelle Y1173 zählt laut einer Studie von Sturla et al. zur Gruppe der stark phosphorylierten Tyrosin-Reste nach

EGF-Stimulierung (Sturla et al. 2005). Sie ist die Hauptbindungsstelle für SHC-Adapterproteine mit einer SH2 Domäne und spielt eine kritische Rolle in der Aktivierung der MAPK/ERK Signalkaskade (Saito et al. 2004).

Die EGFR-Phosphorylierung wurde im Rahmen dieser Dissertation anhand der EGFR-überexprimierenden Glioblastomzelllinien (U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺) nach EGF-Stimulierung untersucht. Die proteinbiochemischen Analysen zeigten eine konzentrationsabhängig ansteigende Phosphorylierung von Y1173 im Bereich von 1 bis 100 ng/ml EGF (Abbildung 21). Dieses Ergebnis war Zelllinien-unabhängig und korreliert stark mit Analysen von Guo et al., die für die humane epidermoide Karzinomzelllinie A431 bis zu einer Konzentration von 1000 ng/ml EGF eine kontinuierliche Steigerung der Y1173-Phosphorylierung beobachteten (Guo et al. 2003). Die für 100 ng/ml EGF in dieser Arbeit gezeigte starke Y1173-Phosphorylierung konnte durch Behandlung der Zellen mit AG1478 vollständig gehemmt werden (Abbildung 22). Dabei handelt es sich um einen EGFR-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor, der kompetitiv und reversibel die ATP-Bindungsstelle der Kinasedomäne blockiert und dadurch unter anderem die Proliferation verschiedener humaner Glioblastomzelllinien hemmt (Carrasco-Garcia et al. 2011). Zu den in der Behandlung solider Tumoren bereits zugelassenen EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren zählen Gefitinib und Erlotinib, die auch in klinischen Therapiestudien für Gliome vielversprechende Ergebnisse zeigten (Halatsch et al. 2006).

Infolge der Stimulierung der Zelllinien U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ mit EGF wurde neben der gesteigerten Phosphorylierung auch eine deutliche Reduktion der EGFR-Expression beobachtet. Diese lässt sich, laut Literaturangaben, auf einen intrazellulären Abbau des aktivierten Rezeptors zurückführen. Die Bindung von EGF an den EGFR induziert dabei die Internalisierung des EGF-Rezeptor-Komplexes hauptsächlich über Clathrin-bedeckte Vesikel. Dies hat einen lysosomalen Abbau des EGFR zur Folge und wird als EGF-induzierte Herabregulation des EGFR bezeichnet (Sorkin und Goh 2008). Über diesen Mechanismus wird in der Zelle die Intensität und Dauer der EGFR-vermittelten Signaltransduktion reguliert. Dabei gibt es, abhängig vom Zelltyp und vom Liganden, eine Vielzahl verschiedener Internalisierungsmechanismen. So werden z. B. in kornealen Epithelzellen nach der Bindung von TGF- α die internalisierten EGFR-Moleküle nicht abgebaut, sondern an die Plasmamembran zurückgeführt (McClintock und Ceresa 2010).

In Verbindung mit den Analysen der EGFR-Phosphorylierung nach EGF-Behandlung wurden auch die Signalproteine AKT und ERK1/2 repräsentativ für den PI3K und MAPK/ERK

DISKUSSION

Signalweg untersucht. Der PI3K Signalweg wird unter anderem durch Rezeptortyrosinkinasen, wie den EGFR, reguliert (Abbildung 36, rechts). Über Adapterproteine bindet PI3K an phosphorylierte Tyrosine des EGFR und führt, über seine Funktion als Lipidkinase, zur Phosphorylierung von PIP₂ (Phosphatidylinositol (4,5)-triphosphat) zu PIP₃ (Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat). Dieses rekrutiert die Kinase AKT an die Zellmembran, wo sie phosphoryliert wird und dadurch eine Vielzahl gekoppelter Signalkaskaden regelt (Manning und Cantley 2007).

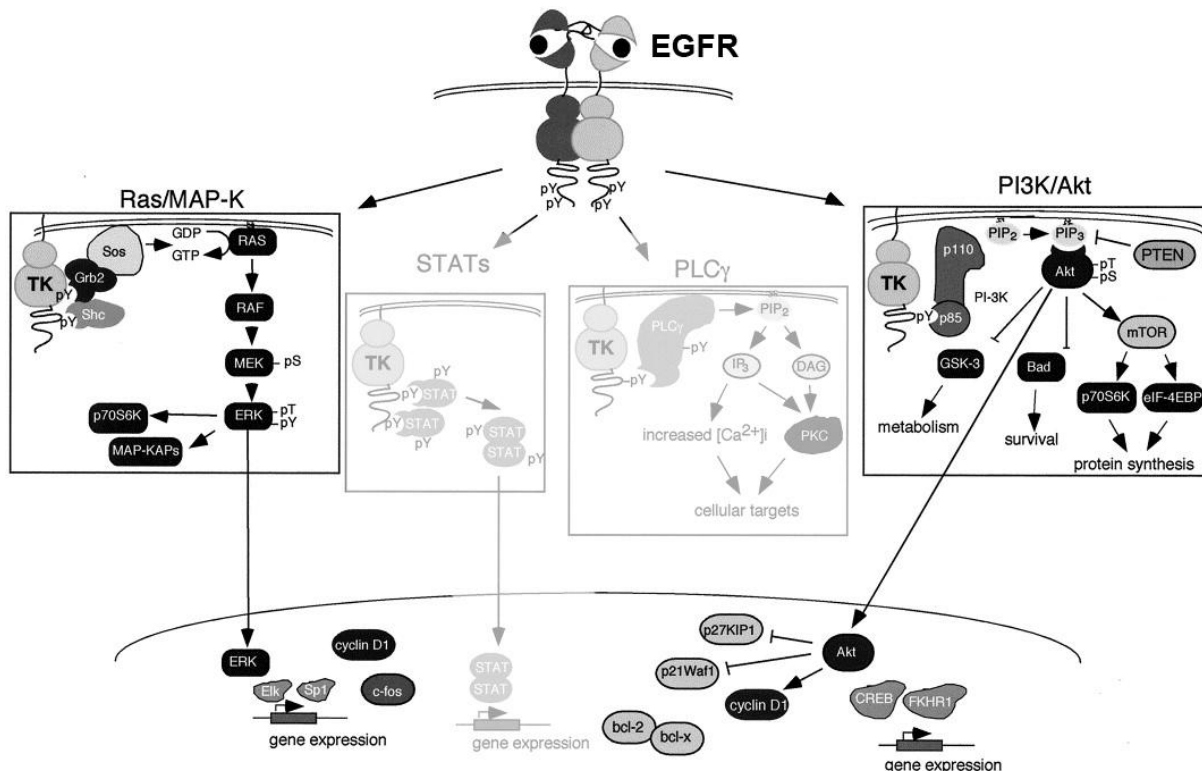


Abbildung 36: EGFR-gekoppelte Signalwege (Marmor et al. 2004)

Ligandenbindung (z. B. von EGF) induziert die Dimerisierung des EGFR, was in der Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne und der Phosphorylierung von Tyrosinresten resultiert. Dadurch werden Adapterproteine an den Rezeptor gebunden, die z. B. die Signaltransduktion über den MAPK/ERK oder PI3K Signalweg induzieren.

In den U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ Zellen induzierte die EGF-Behandlung eine Phosphorylierung von AKT (Abbildung 24). Allerdings waren Zelllinien-spezifische Unterschiede zu vermerken. U87 EGFR⁺⁺ wies auch unter nicht stimulierenden Bedingungen eine generelle AKT-Phosphorylierung auf. Dies ist durch das in U87 Zellen mutiert vorliegende PTEN Enzym bedingt. In aktiver Form unterbricht diese Phosphatase den PI3K Signalweg durch Dephosphorylierung von Phosphatidylinositolphosphaten (PIP₃ zurück zu PIP₂). Ein Verlust der PTEN Funktion resultiert in einer Deregulation der PI3K und einer damit verbunden konstitutiven Phosphorylierung von AKT (Koul 2008). Die Stimulierung

mit EGF führte daher in den PTEN mutierten U87 EGFR⁺⁺ Zellen zu keiner erheblichen Steigerung der AKT-Phosphorylierung. LN229 EGFR⁺⁺ weist hingegen die PTEN Wildtypform auf, wodurch der PI3K Signalweg negativ reguliert wird. Dadurch war AKT unter nicht stimulierenden Bedingungen kaum phosphoryliert und eine Behandlung mit EGF bewirkte eine deutlich verstärkte AKT-Phosphorylierung. Die Funktion von PTEN beschränkt sich allerdings nicht nur auf den PI3K Signalweg. So dephosphoryliert aktives PTEN z. B. auch FAK und die SHC Tyrosinkinase, wodurch der Rac und MAPK Signalweg reguliert wird. PTEN interagiert dabei mit dem EGFR und anderen Rezeptortyrosinkinasen auf vielfältige Art und Weise und stellt daher eine wichtige Variable für den Erfolg von Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Therapie von Gliomen dar (Abounader 2009). Durch den EGFR Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 wurde in den Versuchen zur EGF-Stimulierung die AKT-Phosphorylierung in U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ Zellen auf das Niveau unstimulierter Zellen gesenkt. Das verdeutlicht, dass AKT direkt an den EGFR gekoppelt ist. Der Einsatz eines PI3K-Inhibitors (LY294002) führte zur spezifischen Hemmung der AKT-Phosphorylierung trotz phosphoryliertem EGFR. LY294002 unterbricht durch Hemmung der PI3K die Signaltransduktion vom EGFR zu AKT. Dieser Inhibitor wird aufgrund eingeschränkter Selektivität, toxischen Nebeneffekten und ungeeigneten pharmazeutischen Eigenschaften derzeit nur in präklinischen Studien verwendet (Fan und Weiss 2010).

Die Signaltransduktion vom EGFR konnte auch in Richtung des MAPK/ERK Signalweges anhand von ERK1/2 nachgewiesen werden. Nach EGF-Behandlung zeigte sich in beiden Zelllinien eine gesteigerte ERK1/2-Phosphorylierung (Abbildung 24), die durch Inkubation mit AG1478 effektiv unterdrückt werden konnte. Die Phosphorylierung von EGFR infolge der EGF-Stimulierung führt in dieser Kaskade zur Bindung des Adapterproteins Grb2 über SHC an den EGFR (Abbildung 36, links). Grb2 interagiert an der Zellmembran mit dem GTP-Austauschfaktor Sos, wodurch an der GTPase Ras ein GDP gegen ein GTP ausgetauscht wird. Ras aktiviert Raf, welches die Phosphorylierung von MEK1/2 induziert. Diese wiederum phosphoryliert ERK1/2, das letztendlich die Aktivierung multipler zytoplasmatischer und nukleärer Proteine bewirkt (Katz et al. 2007). Der in dieser Arbeit verwendete MAPK Signalweginhibitor U0126 hemmt selektiv die ERK-Kinasen MEK1 und MEK2 und unterbricht damit die Signaltransduktion auf dieser Ebene. Eine Behandlung von U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ mit U0126 äußerte sich demzufolge in einer spezifischen Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung trotz phosphoryliertem EGFR.

Die beschriebenen EGFR-gekoppelten Signalkaskaden beeinflussen eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z. B. die Proliferation, den Stoffwechsel, das Überleben oder die Zellmigration. Die Rolle des EGFR in der Regulation der Zellmigration sollte im Rahmen dieser Dissertation charakterisiert werden. Migrationsanalysen zeigten, dass EGF zu einer erheblich gesteigerten Migration von U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ Zellen führt (Abbildung 23). Dieser Effekt konnte durch Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 signifikant reduziert werden. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Beobachtungen hinsichtlich der EGFR-Phosphorylierung lässt sich schlussfolgern, dass die EGF-induzierte Migrationssteigerung an die Phosphorylierung des EGFR gekoppelt ist. Der EGFR ist demzufolge an der Regulation der Migration in den Glioblastomzelllinien beteiligt. Allerdings wird hier die Migration vermutlich auch von anderen EGFR-unabhängigen Mechanismen reguliert, da die EGF-induzierte Migration durch den EGFR-spezifischen Inhibitor nicht vollständig auf das Niveau der unstimulierten Zellen reduziert werden konnte.

Die Rolle des EGFR in der Regulation der Zellmigration wurde auch von anderen Autoren z. B. für Zellen des retinalen Pigmentepithels (Zhang et al. 2013), ösophageale und orale Plattenepithelkarzinomzellen (Andl et al. 2003; Inoue et al. 2012), kolorektale Krebszellen (Minder et al. 2012), Brustkrebszellen (Lee et al. 2011) und insbesondere Glioblastomzellen (Lund-Johansen et al. 1990; Rappl et al. 2008; Khalil et al. 2012) gezeigt. In den Untersuchungen von Andel et al. und Lee et al. war der PI3K Signalweg entscheidend in die Signaltransduktion und damit in die EGFR-vermittelten Zellmigration involviert. Andere wiesen eine entscheidende Rolle des MAPK/ERK Signalweges nach (Minder et al. 2012). Vor allem aber in den Studien an Glioblastomzelllinien waren sowohl AKT als auch ERK1/2 an der Steigerung der Zellmotilität durch den EGFR beteiligt (Rappl et al. 2008; Khalil et al. 2012). Die Ergebnisse der Inhibitorversuche deuten auf Zelllinien-spezifische Regulationsmechanismen hinsichtlich der EGF-induzierten Zellmigration hin. In U87 EGFR⁺⁺ Zellen wurde beobachtet, dass eine Hemmung des PI3K und MAPK Signalweges, mittels der Inhibitoren LY294002 bzw. U0126, die EGF-vermittelte Migration signifikant senkte (Abbildung 25). LN229 EGFR⁺⁺ Zellen hingegen zeigten nach Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 eine lediglich geringe Reduktion der Migration. Die Inhibition von ERK1/2 über U0126 änderte das Migrationsverhalten nach EGF-Stimulierung in dieser Zelllinie nicht. Offensichtlich ist der PI3K Signalweg bei beiden Glioblastomzelllinien an der Signaltransduktion und der EGF-induzierten Migration beteiligt,

während der MAPK/ERK Signalweg nur bei der Zelllinie U87 EGFR++ in die Regulation involviert ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen:

- I) Der EGFR sowie AKT und ERK1/2 werden durch EGF-induzierte Phosphorylierung in beiden Glioblastomzelllinien aktiviert.
- II) Die Zellmigration der untersuchten Zelllinien wird durch EGF stimuliert. Dies kann durch Inhibitoren des EGFR, AKT bzw. ERK1/2 Zelllinien-abhängig gehemmt werden.
- III) Der EGFR ist über den PI3K und/oder MAPK/ERK Signalweg an der Regulation der Zellmigration in Glioblastomzellen beteiligt.

4.3. Einfluss der Photonenstrahlung auf die Zellmigration und den EGFR

Die Bestrahlung mit Photonen ist fester Bestandteil der konventionellen Radiotherapie bei Glioblastomen. Dabei sollen in erster Linie die Zellen, die bei einer chirurgischen Entfernung des Tumors nicht entfernt werden konnten, an der Bildung von Rezidiven oder Metastasen gehindert werden. Dieses Ziel kann nur durch eine Unterbindung der Teilungsfähigkeit und der Einschränkung der Invasivität und Motilität der residualen Zellen erreicht werden. Um die Therapie hinsichtlich dieser Aspekte optimieren zu können, ist es von immenser Bedeutung die spezifische Wirkung der Strahlung auf Tumorzellen zu charakterisieren.

Die hier durchgeführten Migrationsuntersuchungen in der Boydenkammer fanden 24 Stunden nach Photonenbestrahlung ohne einen chemotaktischen Reiz statt. Das heißt, die Ergebnisse beruhen auf der ungerichteten, randomisierten Bewegung der Zellen durch die Poren einer Membran. Diese war auf der Startseite mit humanem Kollagen IV beschichtet, welches zunächst von den Zellen durch Proteolyse, das heißt invasive Mechanismen, abgebaut werden musste. Die in dieser Arbeit dargestellten Migrationsänderungen gingen demzufolge von Änderungen der migratorischen und invasiven Eigenschaften der Zellen aus. Der Einfachheit halber wird aber weiterhin nur von der Zellmigration die Rede sein.

Im Bereich klinisch relevanter Dosen (2 Gy) zeigten sich Zelllinien-spezifische Unterschiede. U87 und U87 EGFR++ Zellen wiesen eine signifikant erhöhte Migration nach 2 Gy

Photonenbestrahlung gegenüber unbestrahlten Kontrollzellen auf. Die Zellmigration von LN229 und LN229 EGFR⁺⁺ Zellen hingegen war in diesem Dosisbereich deutlich reduziert (Abbildung 26). Höhere Dosen führten in allen Zelllinien zu einer verringerten Motilität. Die Zelllinie LN229 reagiert demzufolge hinsichtlich ihrer Migration sensitiv auf die Bestrahlung mit Photonen. In U87 Zellen kam es hingegen zu einer Strahlen-induzierten Migrationssteigerung.

Diese Wirkung der Photonenstrahlung wurde von anderen Autoren für U87 Glioblastomzellen ebenfalls beobachtet (Wild-Bode et al. 2001; Goetze et al. 2007; Rieken et al. 2011; Steinle et al. 2011). Goetze et al. zeigten eine Erhöhung der ungerichteten Migration auf 121 % 24 Stunden nach 3 Gy Photonen. Unter chemotaktischen Bedingungen konnten Steinle et al. eine 30-50%ige Steigerung der gerichteten Migration nachweisen. Wild-Bode et al. beobachteten sowohl für U87 als auch LN229 Zellen eine erhöhte Migration und Invasion 24 Stunden nach Bestrahlung mit verschiedenen sublethalen Dosen. Allerdings handelte es sich in diesen Studien um eine auf Chemotaxis beruhende Migration und Invasion. Unter unstimulierenden Bedingungen, das heißt ohne einen Konzentrationsgradienten im Transwellmigrationsassay, kann sich das Verhalten von Zellen anders darstellen. Dementsprechend stehen die aktuellen Ergebnisse der Migrationsanalysen für LN229 Zellen nicht zwingend im Widerspruch zu den Literaturdaten. Wie stark das Verhalten von den Umgebungsbedingungen und auch der Methode zur Untersuchung der Zellmigration abhängt, zeigt eine 3D-Studie von Eke et al., in der Glioblastomzellen in einer dreidimensionalen Kollagenumgebung bestrahlt wurden (Eke et al. 2012). Die Migration und Invasion der Zellen war in dieser Studie nach Photonenbestrahlung nicht verändert. Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu zahlreichen, unterschiedlichen *in vitro* Studien, die der Photonenstrahlung eine migrationssteigernde Wirkung zusprechen. Diese Studien beschränken sich nicht nur auf Glioblastome. Auch für Brustkrebs- und Lungenkrebszellen, sowie für Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches wurde gezeigt, dass Strahlung die Zellmigration fördert (Zhou et al. 2011; Pickhard et al. 2011). *In vivo* Xenograft-Studien in Mäusen geben Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Bestrahlung und Metastasierung als Folge erhöhter Zellmotilität (Rofstad et al. 2004). Die Ergebnisse dieser Dissertation unterstützen die Ansicht, dass die Migration von Glioblastomzellen unter bestimmten Bedingungen durch Photonenstrahlung gefördert werden kann.

Mögliche molekulare Mechanismen, die zur Strahlen-induzierten Migration führen, wurden und werden intensiv studiert und involvieren z. B. eine erhöhte Expression von $\alpha\beta$ -Integrinen

(Goetze et al. 2007; Rieken et al. 2011), Expressionsänderungen von Matrix-Metalloproteasen (MMP-2 oder MMP-9; Wild-Bode et al. 2001) oder die Aktivierung von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen (Steinle et al. 2011). Der EGFR sowie gekoppelte zentrale Signalwege wurden ebenfalls bereits in Verbindung mit der Induktion der Zellmigration durch Strahlung gebracht (Pickhard et al. 2011). Grundlage dafür ist auf der einen Seite die Tatsache, dass der EGFR in der Regulation der Zellmigration eine wichtige Rolle spielt, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt und im Abschnitt 4.2 beschrieben wurde. Auf der anderen Seite existieren zahlreiche Studien, die eine Aktivierung des EGFR durch Photonenstrahlung zeigen (Schmidt-Ullrich et al. 1997; Dent et al. 1999; Yacoub et al. 2006; Lee et al. 2008). Die Strahlen-induzierte Migrationssteigerung könnte demzufolge mit der Strahlen-induzierten Aktivierung des EGFR und assoziierter Signalwege in Verbindung stehen.

Ob die Photonenstrahlung in den in dieser Arbeit verwendeten Glioblastomzelllinien den EGFR aktiviert, wurde zunächst durch Analysen des Phosphorylierungsstatus von EGFR, AKT und ERK1/2 nach Photonenbestrahlung geklärt. Analog zu den Migrationsuntersuchungen wurden auch hier Zelllinien-spezifische Unterschiede festgestellt. In U87 EGFR⁺⁺ Zellen kam es infolge der Bestrahlung mit 2 Gy Photonen zu einer zeitabhängigen Zunahme der EGFR-Phosphorylierung (Abbildung 27). LN229 EGFR⁺⁺ Zellen hingegen zeigten keine Änderung der EGFR-Phosphorylierung.

Die Wirkung der Strahlung auf die U87 EGFR⁺⁺ Zellen korreliert teilweise mit Literaturdaten. Yacoub et al. zeigten für die humane epidermoide Karzinomzelllinie A431 ebenfalls eine zeitabhängige Induktion der EGFR-Phosphorylierung nach Photonenbestrahlung, allerdings in zwei Phasen. Nach einer initialen primären Phosphorylierung innerhalb von 10 Minuten, folgt eine sekundäre Phosphorylierungsphase 90 bis 360 Minuten nach Bestrahlung (Yacoub et al. 2006). Ähnliche Daten wurden auch von Dent et al. für eine Brustkrebszelllinie gezeigt (Dent et al. 1999). Bei den U87 EGFR⁺⁺ Zellen wurde lediglich die verzögerte sekundäre Phosphorylierungsphase 120 bis 300 Minuten nach Photonenbestrahlung beobachtet. Die beschriebene primäre Phosphorylierung konnte nicht detektiert werden, was darauf zurückzuführen ist, dass Daten während der initialen Phase (bis 10 min nach Bestrahlung) aus technischen und logistischen Gründen nicht zuverlässig erhoben werden konnten.

Den molekularen Mechanismus der zur Strahlen-induzierten Aktivierung des EGFR führt, fasste Valerie et al. in einem Review-Artikel als den „inside-out and outside-in“ Mechanismus zusammen (Valerie et al. 2007). Demnach induziert Strahlung die Bildung von reaktiven

Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) innerhalb der Zellen, wodurch Proteintyrosin Phosphatasen (PTPasen) inhibiert werden. Das führt zur Einschränkung der Dephosphorylierung des EGFR, was sich infolge in einer Steigerung der EGFR-Phosphorylierung und Induktion intrazellulärer Signalkaskaden äußert. Die Verbindung von Strahlen-induzierter RNS-Bildung und der Aktivierung des EGFR wurde z. B. von Lee et al. in Lungenkarzinomzellen nachgewiesen (Lee et al. 2008). Die initiale primäre Signalinduktion aktiviert unter anderem Mechanismen, die an der Zelloberfläche zur Spaltung und Aktivierung von parakrinen Liganden, wie TGF- α , führen (Dent et al. 1999). Diese binden an Zelloberflächenrezeptoren und reaktivieren so den EGFR und intrazelluläre Signalmoleküle, was als verzögerte sekundäre Phosphorylierungsphase beobachtet wird.

Auch die Signalproteine AKT und ERK1/2 wiesen infolge der Photonenbestrahlung von U87 EGFR⁺⁺ Zellen eine, ähnlich zum EGFR, zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung auf (Abbildung 28). In der Literatur wurde, analog zur Phosphorylierung des EGFR, sowohl für AKT als auch ERK1/2 eine zweiphasige Phosphorylierung nach Bestrahlung beschrieben (Schmidt-Ullrich et al. 2003). In dieser Arbeit wurde allerdings nur die späte Phosphorylierungsphase beobachtet, passend zu den Ergebnissen für den EGFR. Die Strahlen-vermittelte Induktion der EGFR-Phosphorylierung führt in der U87 EGFR⁺⁺ Zelllinie zur Signaltransduktion über den PI3K und MAPK/ERK Signalweg. Bei LN229 EGFR⁺⁺ Zellen konnte zwar keine Änderung der EGFR-Phosphorylierung nach Bestrahlung festgestellt werden, allerdings kam es zu einer starken zeitabhängigen Phosphorylierung von ERK1/2. Dieses Phänomen ist vermutlich auf EGFR-unabhängige Regulationsmechanismen in der Signalkaskade zurückzuführen. Eine Phosphorylierung von AKT konnte in diesen Bestrahlungsversuchen weder für die bestrahlten noch für die unbestrahlten Zellen nachgewiesen werden. Bei den unbestrahlten Kontrollzellen existierte kein äußerer Stimulus und die AKT-Phosphorylierung wurde in diesem Fall durch PTEN unterdrückt. Die Photonenstrahlung stellte zudem keinen Stimulus dar, denn in bestrahlten LN229 Zellen kam es zu keiner messbaren AKT-Phosphorylierung. Das bedeutet, dass die Photonenstrahlung in diesen Zellen weder eine Aktivierung des EGFR noch des PI3K Signalweges induziert. Schlussfolgernd kann ausgesagt werden, dass es Zelllinien-abhängig zu unterschiedlichen Signalreaktionen auf Photonenstrahlung kommt.

Durch Kombinationsversuche mit Inhibitoren gegen den EGFR, AKT und ERK1/2 wurde in dieser Arbeit schließlich gezeigt, dass die durch Photonen induzierte EGFR-Aktivierung in Zusammenhang mit den beobachteten Migrationsänderungen steht. Der EGFR-spezifische

Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 konnte sowohl die Strahlen-induzierte Migrationssteigerung (Abbildung 29) als auch die Strahlen-induzierte Phosphorylierung 300 Minuten nach Bestrahlung (Abbildung 30) in U87 EGFR⁺⁺ Zellen signifikant hemmen. Das zeigt, dass die gesteigerte EGFR-Phosphorylierung an der Regulation der Migration nach Photonenbestrahlung beteiligt war. Wurden die Signalproteine AKT und ERK1/2 mittels Inhibitoren gegen PI3K und MEK gehemmt, konnte sogar eine Reduktion der Migration der U87 EGFR⁺⁺ Zellen unterhalb des Migrationsniveaus unbestrahlter Zellen erreicht werden. Diese Inhibitoren bewirkten demzufolge eine noch effektivere Reduktion der Migration als der EGFR-Inhibitor AG1478. Dies weist zum einen darauf hin, dass die Strahlen-induzierte Migration in stärkerem Maße von AKT und ERK1/2 als vom EGFR abhängt. Zum anderen kann man in diesem Zusammenhang darauf schließen, dass AKT und ERK1/2 nach Photonenbestrahlung, unabhängig vom EGFR, auch von anderen regulatorischen Signalproteinen kontrolliert werden. Insgesamt wird aber die Hypothese unterstützt, dass die Photonenstrahlung den EGFR aktiviert, der die Signalweiterleitung über PI3K/AKT und MAPK/ERK stimuliert, was schlussendlich zur Strahlen-induzierten Migrationssteigerung führt. Dieser Zusammenhang wurde auch von Pickhard et al. für Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches postuliert (Pickhard et al. 2011). Photonenstrahlung führte in diesen Zellen ebenfalls zur Aktivierung des EGFR sowie des PI3K und MAPK/ERK Signalweges und zu einer Steigerung der Zellmigration. Die Inhibierung von EGFR, PI3K bzw. MEK mit AG1478, LY294002 bzw. PD98059 reduzierte jeweils die Strahlen-induzierte Migration. Frühere Studien von anderen Autoren zeigten gleiche Zusammenhänge, allerdings hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit von A431 Zellen nach Photonenbestrahlung (Schmidt-Ullrich et al. 1997; Dent et al. 1999). Die Inhibierung des EGFR mit AG1478 führte zur Reduktion der Strahlen-induzierten Proliferation, jedoch bewirkte der Einsatz des MAPK-Inhibitors U0126 eine noch stärkere Proliferationseinschränkung. Diese Daten korrelieren stark mit den Beobachtungen zur Migration nach Bestrahlung und Inhibitorbehandlung in U87 EGFR⁺⁺ Zellen.

In LN229 EGFR⁺⁺ Zellen zeigte sich bei der Kombination von Bestrahlung und Inhibitoren ein anderes Bild. Die nach 2 Gy Photonenbestrahlung beobachtete Reduktion der Migration, war nach Behandlung mit den Inhibitoren gegen EGFR, AKT und ERK nicht mehr festzustellen. Stattdessen stieg das Migrationspotential der bestrahlten und mit einem Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen an (Abbildung 29). Dieses unerwartete Verhalten steht im Widerspruch zu den Beobachtungen in U87 EGFR⁺⁺ Zellen.

Daher wurden zusätzliche Kontrollversuche durchgeführt, in denen die Zellen nicht bestrahlt, sondern nur mit Inhibitoren behandelt wurden. Die Migrationsanalysen in der Boydenkammer erfolgten analog zu den Bestrahlungsversuchen 24 Stunden nach Behandlung und zeigten ein ähnliches Bild. Die Migration von LN229 EGFR⁺⁺ Zellen stieg nach Behandlung mit den Inhibitoren an, während sie bei U87 EGFR⁺⁺ Zellen reduziert wurde (Abbildung 37).

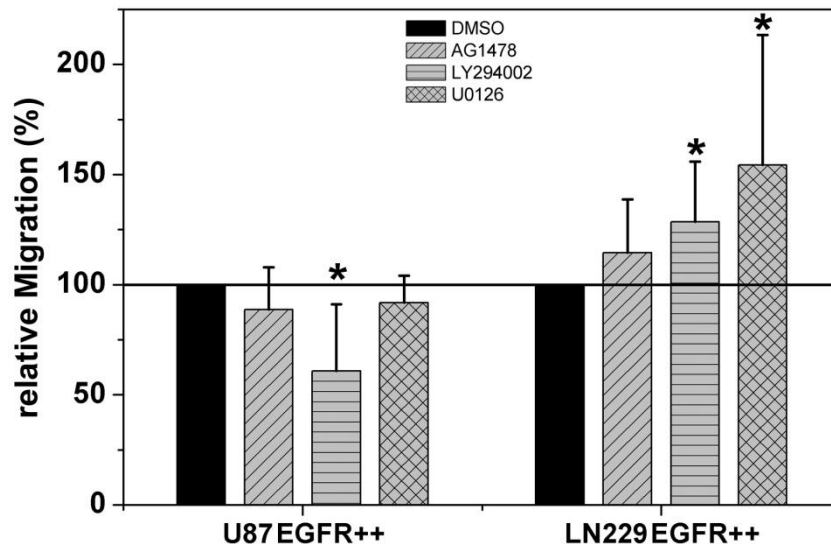


Abbildung 37: Zellmigration 24 Stunden nach Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126

Die Zelllinien U87 EGFR⁺⁺ und LN229 EGFR⁺⁺ wurden mit AG1478 (1 μ M; quer gestreifte Balken), LY294002 (10 μ M; horizontal gestreifte Balken) bzw. U0126 (10 μ M; Balken mit Netzmuster) behandelt. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen (DMSO, schwarze Balken). Die Anzahl migrierender Zellen wurde in der Boydenkammer ermittelt und auf die Migration der Kontrollproben (100 %) relativiert. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Migration in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche (N > 3). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbehandelte Probe (*), bestimmt.

Dieses Phänomen kann anhand der vorliegenden Daten nicht erklärt werden. Das nach Inhibitorbehandlung analoge migratorische Verhalten der LN229 Zellen sowohl mit als auch ohne Bestrahlung verdeutlicht aber, dass deren Zellmigration auf Zelllinien-spezifischen Regulationsmechanismen beruht, die sich von denen der U87 Zellen unterscheiden. Diese Schlussfolgerung wird von den Proteinanalysen nach Photonenbestrahlung unterstützt, die eine stark Zelllinien-abhängige Reaktion von migrationsregulierenden Signalproteinen zeigten.

Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche bei LN229 Zellen deuten darauf hin, dass eine Hemmung zentraler Signalproteine, wie PI3K oder MEK, auch zu einer Steigerung der Zellmotilität führen kann. Von anderen Autoren wurde gezeigt, dass z. B. die Integrinaktivität differenziell vom MAPK/ERK Signalweg reguliert wird (Hughes et al. 1997), und dass, unter

bestimmten Bedingungen, die Inhibierung von MEK zu einer gesteigerten Migration führen kann (Wang et al. 1999). Gleiches gilt für den PI3K Signalweg. So wurde von Vaidya et al. gezeigt, dass eine Inhibierung von PI3K mittels LY294002 eine Erhöhung der Zellmotilität bewirken kann (Vaidya et al. 2006). Zudem ist bekannt, dass die AKT Isoformen AKT1 und AKT2 die Migration von Zellen sehr unterschiedlich beeinflussen. Laut Zhou et al. migrieren AKT2 knock-out Zellen einer humanen embryonalen Nierenzelllinie schneller als die Wildtyp-Zellen, während AKT1 knock-out Zellen langsamer migrieren (Zhou et al. 2006). Demgegenüber zeigten Irie et al. eine gesteigerte Migration von Brustepithelzellen nach Herabregulation von AKT1, wohingegen eine AKT2 Herabregulation zur Inhibierung der Migration führte (Irie et al. 2005). Im Rahmen dieser Dissertation wurde nicht zwischen den AKT Isoformen unterschieden. Weiterführende Untersuchungen des Migrationsverhaltens von LN229 sollten eine differentielle Analyse von AKT1 und AKT2, durch Einsatz von shRNAs oder Isoform-spezifischen Phospho-Antikörpern, einschließen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen:

- I) Die Photonenstrahlung kann die Aktivierung/Phosphorylierung des EGFR sowie AKT und ERK1/2 in Glioblastomzellen bewirken.
- II) Die Photonenstrahlung kann Zelllinien-abhängig eine gesteigerte Zellmigration von Glioblastomzellen induzieren. Diese kann durch Inhibitoren des EGFR, AKT bzw. ERK1/2 Signalweges gehemmt werden.
- III) Der EGFR ist über den PI3K und/oder MAPK/ERK Signalweg an der Regulation der Strahlen-induzierten Zellmigration in Glioblastomzellen beteiligt.

Es besteht demzufolge ein kausaler, wenn auch Zelllinien-spezifischer, Zusammenhang zwischen der Strahlen-induzierten Aktivierung des EGFR und der Strahlen-vermittelten Migrationssteigerung.

4.4. Einfluss der ^{12}C -Ionenstrahlung auf die Zellmigration und den EGFR

Während die Bestrahlung von Tumoren mit Photonenstrahlung heutzutage im medizinischen Alltag zur Standardtherapie zählt, halten seit einigen Jahren „neue Strahlen“ Einzug in die Tumorthherapie. Neben Protonen spielen schwere Kohlenstoffionen eine immer bedeutendere

Rolle, insbesondere in der Behandlung von Tumoren, die sehr widerstandsfähig gegenüber herkömmlicher Bestrahlung sind und sich in der unmittelbaren Nähe von strahlenempfindlichen Organen befinden. Die Vorteile der Schwerionenstrahlung, wie ihre hohe Eindringtiefe ins Gewebe, ihre hohe Präzision und ihre hohe biologische Wirksamkeit, sind hinreichend bekannt (Newhauser und Durante 2011). Über ihren Einfluss auf die Invasivität und Motilität der einzelnen Tumorzelle und deren regulatorische Prozesse existieren allerdings bisher wenige bis keine wissenschaftlichen Daten. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation die Wirkung von schweren Kohlenstoffionen auf die Migration von Glioblastomzellen *in vitro* untersucht.

Für alle Glioblastomzelllinien konnte eine Reduktion der ungerichteten, randomisierten Migration 24 Stunden nach 2 Gy und 6 Gy ^{12}C -Ionenstrahlung beobachtet werden. In U87 Zellen gab es nur geringe Unterschiede zwischen der Wirkung von 2 Gy und 6 Gy, während LN229 Zellen eine deutliche Dosisabhängigkeit zeigten (Abbildung 31).

Die inhibierende Wirkung der Kohlenstoffionen auf die Motilität von Tumorzellen wurde auch von anderen Autoren beschrieben. Goetze et al. zeigten für U87 Zellen sowie eine kolorektale Karzinomzelllinie 24 Stunden nach Bestrahlung eine dosisabhängige Erniedrigung der ungerichteten Zellmigration für 1 bis 10 Gy ^{12}C -Ionenstrahlung (Goetze et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Studie zur Wirkung von Kohlenstoffionen auf die chemotaktische Migration von Glioblastomzellen (Rieken et al. 2012). *In vivo* wurde von Ogata et al. eine dosisabhängige Reduktion der Anzahl von Lungenmetastasen in Mäusen nach Bestrahlung von subkutanen Osteosarkomtumoren mit Kohlenstoffionen beobachtet und kombiniert mit migrationsreduzierenden *in vitro* Daten einer humanen Fibrosarkomzelllinie veröffentlicht (Ogata et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Dissertation ergänzen die wissenschaftlichen Kenntnisse hinsichtlich der hemmenden Wirkung von Kohlenstoffionen auf die Migration von Glioblastomzellen.

Die Daten der Photonenbestrahlung von U87 EGFR++ und LN229 EGFR++ Zellen haben den Zusammenhang zwischen der Strahlen-induzierten Migrationsänderung und der Aktivierung des EGFR belegt. Über die Wirkung der Schwerionenstrahlung auf den EGFR liegen bisher keine Informationen vor. Anhand der aktuellen Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass ^{12}C -Ionen eine Phosphorylierung des EGFR induzieren. Es konnten allerdings Tendenzen einer reduzierten EGFR-Phosphorylierung beobachtet werden. Gleiches gilt für die EGFR-gekoppelten Signalproteine AKT und ERK1/2, die nach ^{12}C -Bestrahlung im Vergleich zur Kontrollprobe zu keinem Zeitpunkt stärker phosphoryliert vorlagen.

Zum Einfluss von Kohlenstoffionen auf intrazelluläre Signalwege gibt es bisher wenige Literaturdaten (Mitra et al. 2005; Tomiyama et al. 2010; Ogata et al. 2011). Ogata et al. führten z. B. die, in humanen Lungenadenokarzinomzellen, beobachtete Inhibierung der Zellmigration unter anderem auf die Reduktion der Phosphorylierung von AKT nach ^{12}C -Bestrahlung zurück (Ogata et al. 2011). Tomiyami et al. untersuchten Regulationsmechanismen des ^{12}C -induzierten apoptotischen Zelltods von Glioblastomzelllinien und beobachteten eine initiale Herunterregulation der ERK1/2-Phosphorylierung bis 12 Stunden nach Bestrahlung, gefolgt von einer späteren Reaktivierung des MAPK/ERK Signalweges (Tomiyama et al. 2010).

Die Kombination von Schwerionenstrahlung und Inhibitoren des EGFR bzw. von AKT oder ERK1/2 führte zu keiner weiteren Senkung des migratorischen Potentials der U87 EGFR++ Zellen (Abbildung 34), obwohl die Inhibitoren die Phosphorylierung der entsprechenden Signalproteine reduzierten (Abbildung 35). Bei der Bestrahlung dieser Zelllinie kann demzufolge die Wirksamkeit der Kohlenstoffionen, hinsichtlich der Reduktion der Zellmigration, durch die Hemmung des EGFR sowie des PI3K und MAPK/ERK Signalweges nicht verstärkt werden. In LN229 EGFR++ Zellen war auch in diesem Fall der bereits beschriebene migrationsfördernde Effekt der drei Inhibitoren trotz ^{12}C -Bestrahlung zu beobachten. Die dafür verantwortlichen Zelllinien-spezifischen Regulationsmechanismen sind demnach unabhängig von der Art der Strahlung.

Festzustellen ist, dass der Einsatz der beschriebenen Inhibitoren kombiniert mit der ^{12}C -Bestrahlung keinen weiteren Vorteil hinsichtlich der Hemmung der Zellmotilität bringt. Für andere chemische Inhibitoren wurde bisher nur gezeigt, dass sie in Kombination mit Schwerionenstrahlung die Zelltod-induzierende Wirksamkeit der Strahlung erhöhen (Hamada 2009).

Zusammenfassend lässt sich feststellen:

- I) Die ^{12}C -Ionenstrahlung führt in den untersuchten Glioblastomzellen nicht zur Aktivierung/Phosphorylierung des EGFR sowie AKT und ERK1/2.
- II) Die ^{12}C -Ionenstrahlung hemmt die Zellmigration von Glioblastomzellen.
- III) Inhibitoren des EGFR oder der PI3K bzw. MAPK/ERK Signalwege können die Strahlen-vermittelte Hemmung der Zellmigration in Glioblastomzellen nicht verstärken.

4.5. Vergleich der Wirkung von Photonen- und ^{12}C -Ionenstrahlung auf die Zellmigration und den EGFR

Die biologische Wirkung der Photonen- und ^{12}C -Ionenstrahlung auf die Zellmigration von Glioblastomzellen wurde im Rahmen dieser Dissertation geklärt. Dabei wurden Strahlenspezifische sowie Zelllinien-spezifische Unterschiede festgestellt. Die wichtigsten Migrationsdaten sind in Abbildung 38 vergleichend dargestellt.

In U87 bzw. U87 EGFR++ Zellen führt die Photonenstrahlung zu einer Erhöhung der Zellmigration, während die ^{12}C -Ionenstrahlung die Motilität dieser Zelllinie deutlich verringert. Demgegenüber zeigen LN229 bzw. LN229 EGFR++ Zellen sowohl nach Photonen- als auch ^{12}C -Bestrahlung ein verringertes migratorisches Potential.

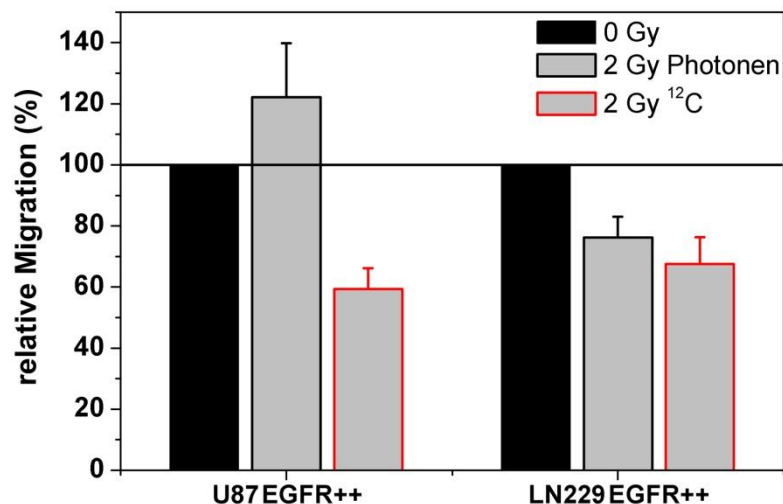


Abbildung 38: Vergleich der Zellmigration 24 Stunden nach Photonen- und ^{12}C -Bestrahlung

Die Zelllinien U87 EGFR++ und LN229 EGFR++ wurden mit 2 Gy Photonen (schwarz umrandete Balken) oder ^{12}C -Ionen (rot umrandete Balken) bestrahlt. Als Referenz dienten unbestrahlte Zellen (0 Gy, schwarze Balken). Die Anzahl migrierender Zellen wurde in der Boydenkammer ermittelt und auf die Migration der Kontrollproben (100 %) relativiert. Im Diagramm aufgetragen ist die relative Migration in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche ($N > 3$). Alle Änderungen sind signifikant bezogen auf die unbestrahlte Probe (t-Test; $p < 0,05$).

Insbesondere die migrationsinduzierende Wirkung der Photonenstrahlung stellt aus therapeutischer Sicht ein Problem dar. Eine während der Radiotherapie induzierte Migrationssteigerung kann zum Auswandern von Einzelzellen aus dem Bestrahlungsvolumen führen, wodurch das Risiko der lokalen Rezidivbildung erhöht wird. Bei der Bestrahlung mit schweren Kohlenstoffionen besteht dieses Risiko für Glioblastomzellen nicht. Außerdem wurde die aus der Literatur bekannte Radiosensitivierung der Zellen durch

DISKUSSION

Schwerionenbestrahlung in Form eines geringeren Überlebens bestätigt. Neben den zahlreichen bereits beschriebenen Vorzügen der Schwerionenstrahlung, stellt die motilitätshemmende Wirkung einen weiteren Vorteil von ^{12}C -Ionen für die Radiotherapie solider, stark invasiver Tumoren dar.

Die vorliegenden Daten unterstützen die Arbeitshypothese, nach der sich die migrationsinduzierende Wirkung der Photonen in U87 Zellen auf eine Strahlen-vermittelte Aktivierung von EGFR-gekoppelten Signalwegen zurückführen lässt. ^{12}C -Ionen haben hingegen keinen aktivierenden Einfluss auf den EGFR sowie auf die zentralen Signalproteine AKT und ERK. In Abbildung 39 ist anhand der Phosphorylierung des EGFR in U87 EGFR++ Zellen die beschriebene Wirkung der beiden Strahlenarten vergleichend dargestellt.

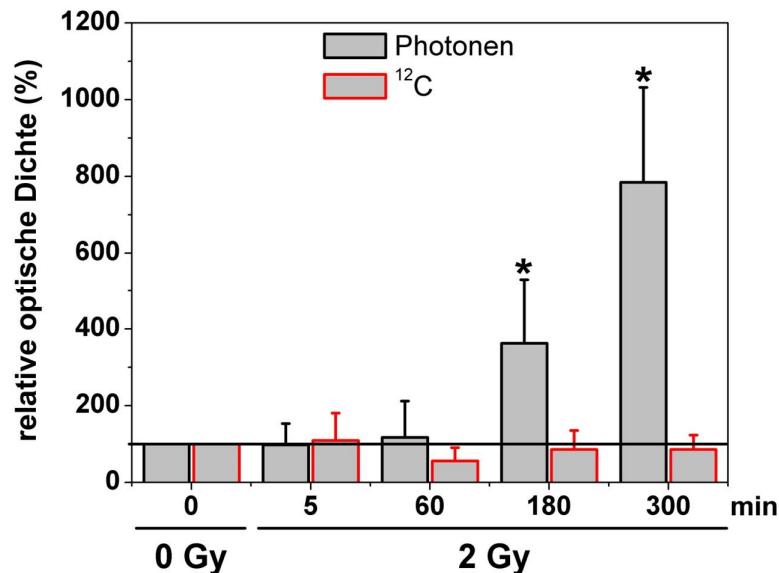


Abbildung 39: Vergleich der Phosphorylierung des EGFR nach Photonen- und ^{12}C -Bestrahlung

Die Zelllinie U87 EGFR++ wurde mit 2 Gy Photonen (schwarz umrandete Balken) oder ^{12}C -Ionen (rot umrandete Balken) bestrahlt und nach definierten Zeitpunkten lysiert. Die Phosphorylierung des EGFR wurde mittels Western Blot analysiert. Für die densitometrische Auswertung diente β -Actin als Haushaltsprotein zur Normalisierung. Unbestrahlte Zellen (0 Gy) wurden als Referenz auf 100 % gesetzt. In den Diagrammen aufgetragen ist die relative optische Dichte in Prozent als Mittelwerte (\pm SD) der unabhängigen Versuche (N = 3). Mittels t-Test ($p < 0,05$) wurde die Signifikanz der Änderungen, bezogen auf die unbestrahlte Probe (*), bestimmt.

Hinsichtlich der Phosphorylierung des EGFR und der gekoppelten Signalwege wurden nicht nur Strahlen-spezifische sondern auch Zelllinien-abhängige Unterschiede deutlich. LN229 EGFR++ Zellen zeigten, im Gegensatz zu U87 EGFR++ Zellen, weder nach Photonen- noch ^{12}C -Ionenstrahlung eine Phosphorylierung des EGFR, was mit den Beobachtungen bezüglich der Zellmigration korreliert. Die Tatsache, dass ^{12}C -Ionen in den

Zelllinien keine Aktivierung des EGFR und der untersuchten, migrationsregulierenden Signalwege auslösen, spricht ebenfalls für die Schwerionenbestrahlung.

In der Konsequenz kann ausgesagt werden, dass es im Fall der Glioblastome vielversprechend sein kann, Patienten mit Kohlenstoffionen zu bestrahlen. In der klinischen Routine von Schwerionenbestrahlungszentren nehmen Glioblastome allerdings noch keine große Rolle ein. Im Therapiezentrum von Chiba in Japan machen Hirntumorpatienten nur 2,0 % der mit ^{12}C -Ionen bestrahlten Patienten aus (Okada et al. 2010). Zu den typischen Tumorarten, die auch im Heidelberger HIT bestrahlt werden, gehören derzeit Tumoren der Schädelbasis (Chordome und Chondrosarkome), Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches, Knochensarkome, Enddarmrezidive und Prostatakrebs (Fokas et al. 2009; Okada et al. 2010; Debus und Haberer 2012). Glioblastome werden aber in klinischen Studien auch mit ^{12}C -Ionen bestrahlt. In einer Phase I/II Studie von Mizoe et al. wurden Glioblastompatienten mit einer Kombination aus Röntgenradiotherapie, Chemotherapie und ^{12}C -Iontherapie behandelt (Mizoe et al. 2007). Eine Erhöhung der ^{12}C -Ionendosis ging mit einem längeren Überleben der Patienten einher, was den positiven Nutzen der Schwerionenbestrahlung für die Radiotherapie verdeutlicht. Die Kombination aus Photonenbestrahlung und Schwerionenbestrahlung ist dabei aktuell auch bei anderen Tumorentitäten eine gängige Methode (Schulz-Ertner und Tsujii 2007; Hartel et al. 2010; Jensen et al. 2012). Zusätzlich werden als Chemotherapeutika unter anderem Inhibitoren des EGFR eingesetzt, der aufgrund seiner zentralen Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse ein wichtiges Zielmolekül der Tumorthherapie darstellt (Ronellenfitsch et al. 2010). In einer Studie von Jensen et al. werden am HIT in Heidelberg z. B. adenoidzystische Karzinome mit IMRT und Cetuximab, einem EGFR-spezifischen Antikörper, und einem ^{12}C -Ionen „Boost“ behandelt (Jensen et al. 2011). Durch solche kombinierenden Therapieansätze könnte z. B. die negative Nebenwirkung der Photonenstrahlung, in Form einer Migrationsinduktion, durch die Hemmung des EGFR mittels Cetuximab und die Inhibition der Zellmotilität mittels Schwerionen ausgeschlossen werden.

4.6. Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde die radiobiologische Wirkung von Photonen- und Schwerionenstrahlung auf die Migration von Glioblastomzellen untersucht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine therapeutische Photonenbestrahlung von Glioblastomen die Zellmotilität steigern und damit zu einem erhöhten Risiko einer lokalen Rezidivbildung führen kann. Die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen würde in diesem Fall zu einem Versagen der Radiotherapie beitragen. Anhand der aktuellen Daten zur Schwerionenstrahlung kann die Aussage getroffen werden, dass mit einer solchen Wirkungseinschränkung in der Therapie mit Kohlenstoffionen bei Glioblastomen nicht zu rechnen ist. Allerdings geben die *in vitro* Analysen lediglich Hinweise zur biologischen Wirkung der verschiedenen Strahlenarten *in vivo*. Weitere Studien mit einer besseren Annäherung an die *in vivo* Situation und die Therapiebedingungen müssen folgen. 3D-Modelle, in denen z. B. die Einwanderung von Tumorzellen in Matrigel, einer Mischung aus verschiedenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix, untersucht wird, bieten eine Alternative zum Transmigrationsassay. In solchen Systemen kann die Wirkung der Strahlung auf die Zellmigration und -invasion bereits anders aussehen, wie es Eke et al. zeigten (Eke et al. 2012). Für die Anpassung an die *in vivo* Verhältnisse sind zudem Tiermodelle unumgänglich.

Festzuhalten bleibt, dass es deutliche Strahlen-spezifische und Zelllinien-spezifische Unterschiede im Migrationsverhalten von Tumorzellen gibt. Wie sehr die Wirkung der Strahlung auch von der Zelllinie abhängt, zeigt eine aktuelle Studie von Fujita et al. (Fujita et al. 2012). Bei einer von vier Pankreastumorzelllinien (PANC-1) führte die Bestrahlung mit 2 Gy ¹²C-Ionen *in vitro* zu einer Erhöhung des invasiven Potentials der Zellen. Die Migration dieser Zellen blieb hingegen unverändert. Damit gibt es *in vitro* erstmals Hinweise darauf, dass die Schwerionenstrahlung womöglich die Invasivität von bestimmten Tumorzellen fördern könnte. Inwiefern diese Wirkung allerdings auch *in vivo* auftritt und welche Konsequenzen dies für die Schwerionentherapie hätte, muss noch geklärt werden.

Eine wichtige Rolle spielen die molekularen Mechanismen, die die Zellmigration nach Bestrahlung regulieren. Diese sind derzeit noch nicht ausreichend bekannt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde für die konventionelle Bestrahlung mit Photonen nachgewiesen, dass die Strahlen-induzierte Migrationssteigerung mit einer Strahlen-induzierten Aktivierung des EGFR zusammenhängt. Welche Mechanismen allerdings hinter der migrationshemmenden Wirkung der Kohlenstoffionen stehen, ist noch unzureichend geklärt und bedarf weiterer

Untersuchungen. Gezeigt wurde aber, dass der EGFR durch Schwerionenstrahlung nicht aktiviert wird. Zahlreiche andere molekulare Schaltstellen der Zellmigration bieten Ansatzpunkte für die Aufklärung der noch lückenhaft erforschten Strahlenbiologie von Schwerionen. Dazu gehört z. B. der „Connective Tissue Growth Factor“ (CTGF), der von Demuth et al. als stark migrationsfördernder Faktor in Glioblastomen identifiziert wurde (Demuth et al. 2008). Integrine spielen eine zentrale Rolle in der Zellmigration und werden in ihrer Expression von Strahlung beeinflusst (Rieken et al. 2012). Sie kolokalisieren zudem während der Zellmigration mit dem Monocarboxylat-Transporter 4 (MCT4) in makromolekularen Adhäsionspunkten (Gallagher et al. 2009). Dies gibt Anhaltspunkte für eine Wechselbeziehung zwischen Zellmigration und Tumorstoffwechsel. Der Einfluss des metabolischen Milieus, insbesondere von Laktat, auf das Migrationspotential von Tumorzellen ist schon länger bekannt (Goetze et al. 2011). Außerdem wurde eine Rolle des EGFR im Tumorstoffwechsel nachgewiesen. Dabei fördert der Rezeptor den Glukosetransport in die Zelle, indem er mit dem Natrium-gekoppelten Glukosetransporter-1 (SGLT-1) heterodimerisiert (Weihua et al. 2008). In Lungenadenokarzinom- und Plattenepithelzellen des Kopf-Hals-Bereiches kann diese Aktivierung einen Beitrag zur Strahlenresistenz liefern (Huber et al. 2012).

Aufgrund der vielfältigen möglichen Wechselbeziehungen zwischen Strahlung und Zellmigration ist eine detaillierte *in vitro* als auch *in vivo* Charakterisierung der Strahlenbiologie von Photonen und Schwerionen in Zukunft anzustreben.



5. Anhang

5.1. Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
ADP	Adenosindiphosphat
AG1478	4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline
AKT	= PKB, Protein Kinase B
ATP	Adenosintriphosphat
Ba	Barium
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
Cdc42	Cell division cycle 42
dest.	destilliert
DMEM	Dulbeccos's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
CO ₂	Kohlendioxid
Cs	Cäsium
Cu	Kupfer
D	Dosis
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
E	Energie
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
ErbB	Rezeptorfamilie homolog zum Erythroblastic Leukemia Vial Oncogen

ANHANG

ERK	Extracellular signal-related kinase
FAK	Focal adhesion kinase-1
FCS	Fetal calf serum
GSI	Gesellschaft für Schwerionenforschung
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
H	Wasserstoff
HIT	Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IMPT	Intensitätsmodulierte Partikeltherapie
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
keV	Kiloelektronenvolt
LET	Linearer Energietransfer
LY294002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on
MAPK	mitogen-activated protein kinase
monokl.	monoklonal
N	Anzahl unabhängiger Versuche
NEAA	Non-essential amino acid
OH	Hydroxyl
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline + Tween-20
PE	Plating efficiency
Pen	Penicillin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-triphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
polykl.	polyklonal
PTCOG	Particle Therapy Co-Operative Group
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RKI	Robert-Koch-Institut

RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIS	Schwerionensynchrotron
SOBP	Spread-out bragg peak
Src	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Strep	Streptomycin
TGF	Transforming growth factor
TK	Tyrosinkinase
TMZ	Temozolomid
U0126	1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien
UNILAC	Universal Ion Linear Accelerator
WASP/WAVE	Wiskott-Aldrich syndrome protein family
WHO	World Health Organization
XTT	2,3-Bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid-Salz
Y1173	Tyrosin 1173
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

5.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relative Häufigkeiten der Gliome (Preusser et al. 2011).....	2
Abbildung 2: Therapieschema für neu diagnostizierte Glioblastome (Becker und Yu 2012).....	2
Abbildung 3: Direkte und indirekte Wirkung von ionisierender Strahlung auf die DNA (Hall und Giaccia 2006).....	3
Abbildung 4: Tiefendosisprofile von Photonen- und Teilchenstrahlung (Kraft 2000).....	5
Abbildung 5: Vergleich von dünn- und dicht-ionisierender Strahlung (Kraft 2008).....	6
Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Beschleunigeranlage der GSI Darmstadt (www.gsi.de).....	9
Abbildung 7: Darstellung eines ausgedehnten Bragg-Peaks (Scholz 2000).....	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Raster-Scan-Verfahrens (Kraft 2000).....	11
Abbildung 9: Vergleich der Bestrahlungspläne einer ¹² C- (IMPT, links) und Röntgenbestrahlung (IMRT, rechts; Kraft 2008).....	11
Abbildung 10: Schematischer Ablauf der Zellmigration (Palmer et al. 2011).....	15
Abbildung 11: Regulation der Zellmigration (Ridley et al. 2003).....	16
Abbildung 12: Mechanismen der Tumorzellinvasion und -migration (Friedl und Wolf 2003).....	17
Abbildung 13: Die ErbB Rezeptoren und ihre Liganden (Hynes und MacDonald 2009).....	19
Abbildung 14: Signaltransduktion nach EGFR Aktivierung (Zandi et al. 2007).....	20
Abbildung 15: Onkogene Mechanismen des EGFR (Zandi et al. 2007).....	22
Abbildung 16: Schematischer Aufbau einer Vertiefung der Boydenkammer.....	32
Abbildung 17: Phasenkontrastaufnahmen der Wildtyp-Zelllinien U87 und LN229.....	42
Abbildung 18: EGFR-Expression der Glioblastomzelllinien.....	43
Abbildung 19: Klonogenes Überleben nach Photonen- und ¹² C-Bestrahlung.....	44
Abbildung 20: Zellviabilität 24 Stunden nach Bestrahlung während den Boydenkammer-Versuchen.....	45
Abbildung 21: Konzentrationsabhängige EGFR Stimulierung durch EGF.....	46
Abbildung 22: Stimulierung des EGFR mit EGF und Inhibierung mit AG1478.....	47
Abbildung 23: Zellmigration nach Behandlung mit EGF und AG1478.....	48
Abbildung 24: Einfluss der EGF-Stimulierung auf die intrazellulären Signalproteine AKT und ERK1/2.....	49
Abbildung 25: EGF-stimulierte Zellmigration nach Behandlung mit LY294002 oder U0126.....	50
Abbildung 26: Zellmigration 24 Stunden nach Photonenbestrahlung.....	51
Abbildung 27: Phosphorylierung und Expression des EGFR nach Photonenbestrahlung.....	53
Abbildung 28: Phosphorylierung und Expression von AKT und ERK1/2 nach Photonenbestrahlung.....	54
Abbildung 29: Zellmigration 24 Stunden nach Photonenbestrahlung und Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126.....	55
Abbildung 30: Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 300 Minuten nach Photonenbestrahlung und Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126.....	57
Abbildung 31: Zellmigration 24 Stunden nach ¹² C-Bestrahlung.....	58
Abbildung 32: Phosphorylierung und Expression des EGFR nach ¹² C-Bestrahlung.....	59
Abbildung 33: Phosphorylierung und Expression von AKT und ERK1/2 nach ¹² C-Bestrahlung.....	60

ANHANG

Abbildung 34: Zellmigration 24 Stunden nach ^{12}C -Bestrahlung und Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126.....	61
Abbildung 35: Phosphorylierung und Expression von EGFR, AKT und ERK1/2 300 Minuten nach ^{12}C -Bestrahlung und Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126.....	62
Abbildung 36: EGFR-gekoppelte Signalwege (Marmor et al. 2004)	67
Abbildung 37: Zellmigration 24 Stunden nach Behandlung mit AG1478, LY294002 und U0126	75
Abbildung 38: Vergleich der Zellmigration 24 Stunden nach Photonen- und ^{12}C -Bestrahlung.....	79
Abbildung 39: Vergleich der Phosphorylierung des EGFR nach Photonen- und ^{12}C -Bestrahlung.....	80

5.3. Puffer und Lösungen

5.3.1. Zellkultur

Zellkulturmedium für U87 und U87 EGFR++ Zellen:

DMEM 4,5 g/l Glukose und L-Gluthamin

Zusatz von:	FBS Gold	10 %
	NEAA	1 %

Zellkulturmedium für LN229 und LN229 EGFR++ Zellen:

DMEM 4,5 g/l Glukose und L-Gluthamin

Zusatz von:	FBS Gold	5 %
	NEAA	1 %

PBS-EDTA:

PBS	1x
EDTA	2 mM

5.3.2. Boydenkammer

Humanes Kollagen IV-Stammlösung (10 mg/ml):

Kollagen-Lyophilisat	25 mg
60 % Ethanol	2,5 ml
1 M Salzsäure	25 µl

lösen über Nacht bei 4 °C; Lagerung: -20 °C

Humanes Kollagen IV-Gebrauchslösung (1,5 mg/ml):

Humanes Kollagen IV-Stammlösung	0,2 ml
60 % Ethanol	1,132 ml

gut vortexen; Lagerung: 4 °C

Gelatinelösung (10x)

Gelatine	100 mg
dest. H ₂ O	100 ml
Eisessig	120 µl

lösen bei 60 °C für 60 Minuten; aliquotieren à 10 ml, Lagerung: -20 °C

Puffer nach Weise:

Puffertablette	1
dest. H ₂ O	1 l

Reinigungslösung (Tergazym):

Tergazym	30 g
dest. H ₂ O	3 l
lösen bei 56 °C	

5.3.3. SDS-PAGE und Western Blot

Modifizierter RIPA Lysepuffer:

Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM
Natriumdeoxycholat	0,25 %
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
NP-40	1 %
ansetzen in Reinst-H ₂ O	
<u>vor Gebrauch frisch zufügen:</u>	
Protease-Inhibitor Cocktail	5 µl/ml
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	10 µl/ml

Reduzierender Elektrophorese-Auftragspuffer (6x):

Glycerol	50 %
Dithiothreitol	0,6 M
SDS	10,28 %
Tris-HCl pH 6,8	0,35 M
Bromphenolblau	0,012 %
ansetzen in Reinst-H ₂ O	

Trenngel (8 %):

Reinst-H ₂ O	2,16 ml
Tris-HCl (3 M, pH 8,8)	1,25 ml
Acrylamid (30 %)	1,33 ml
Glycerol (50 %)	100 µl
SDS (10 %)	50 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	100 µl
TEMED	4 µl

Sammelgel (5 %):

Reinst-H ₂ O	1,63 ml
Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	0,72 ml
Acrylamid (30 %)	0,50 ml
Glycerol (50 %)	60 µl
SDS (10 %)	30 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	60 µl
TEMED	4,8 µl

SDS-Laufpuffer:

Tris-HCl	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %
ansetzen in Reinst-H ₂ O	

Blottingpuffer (Maniatis):

Tris-HCl	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol	20 %
ansetzen in Reinst-H ₂ O	

PBST

PBS	1x
Tween20	0,1 % oder 0,05 %

Strippuffer:

Tris-HCl (pH 7,4)	125 mM
SDS	5 %
β-Mercaptoethanol	0,7 %
ansetzen in Reinst-H ₂ O	

5.4. Kits

Kit	Vertriebsfirma	Standort
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza Rockland Inc.	Rockland, ME, USA
In Vitro Toxicology Assay Kit XTT based	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Bonn, Deutschland

5.5. Antikörper

Antikörper	Vertriebsfirma	Standort
Kaninchen (polykl.) EGFR	Cell Signaling	Frankfurt/Main, Deutschland
Kaninchen (polykl.) EGFR [pY ¹¹⁷³]	Cell Signaling	Frankfurt/Main, Deutschland
Kaninchen (monokl.) AKT [pS ⁴⁷³]	Cell Signaling	Frankfurt/Main, Deutschland
Kaninchen (monokl.) panAKT	Cell Signaling	Frankfurt/Main, Deutschland
Kaninchen (monokl.) ERK1/2 [pT ²⁰² /Y ²⁰⁴]	Cell Signaling	Frankfurt/Main, Deutschland
Kaninchen (polykl.) ERK1/2	Santa Cruz Biotech.	Heidelberg, Deutschland
Maus (monokl.) β -Actin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kaninchen (polykl.) α -Tubulin	Abcam	Cambridge, UK
HRP-konjugiert Esel Anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch	Suffolk, UK
HRP-konjugiert Esel Anti-Maus	Jackson ImmunoResearch	Suffolk, UK

Primärantikörper	Blocklösung	Verdünnung	Verdünnung Sekundärantikörper
pEGFR Y1173	5 % Milchpulver	1:500	1:5000
EGFR	5 % Milchpulver	1:500	1:5000
pAKT S473	5 % BSA	1:3000	1:10000
panAKT	5 % BSA	1:3000	1:5000
pERK1/2 T202/Y204	5 % BSA	1:3000	1:10000
ERK1/2	5 % BSA	1:2000	1:5000
β -Actin	5 % BSA	1:10000	1:20000
α -Tubulin	5 % BSA	1:10000	1:20000

5.6. Chemikalien

Chemikalie	Vertriebsfirma	Standort
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
AG1478 (Tyrostatin)	Cell Signaling	Frankfurt/Main, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
BSA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Casy®Clean	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
Casy®ton	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DMEM high glucose (4,5 g/l)	PAA	Cölbe, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific	Bonn, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
EGF (human)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eisessig	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
FBS Gold (entspricht FCS)	PAA	Cölbe, Deutschland
Gelatine	Calbiochem, Merck	Darmstadt, Deutschland
Geneticin G418	PAA	Cölbe, Deutschland
Glycerol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Hämcolor Lösung 2 + 3	Merck	Darmstadt, Deutschland
Humanes Kollagen IV (Plazenta)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Immersionsöl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
LY294002	Cell Signaling	Frankfurt/Main, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Methylenblau	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Nagellack	Rossmann	Burgwedel, Deutschland

ANHANG

Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA	Cölbe, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	Bonn, Deutschland
PBS	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA	Cölbe, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ponceau S-Färbelösung	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Puffertablette "Puffer nach Weise"	Merck	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
SDS	Roth	Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tergazym	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tris	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Trypsin EDTA (1x)	PAA	Cölbe, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
U0126	Cell Signaling	Frankfurt/Main, Deutschland

5.7. Materialien und Geräte

Material/Gerät	Vertriebsfirma	Standort
96 well Platten	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Absauganlage	Neuberger	Freiburg, Deutschland
Boydenkammer (AP48)	NeuroProbe	Gaithersburg, MD, USA
Casy [®] Zellzähler 1TT	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
Chemilumineszenz-Imagingsystem Fusion SL-4	PeqLab	Erlangen, Deutschland
Einfrierbehälter	Nalge Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Deckgläser	VWR	Darmstadt, Deutschland
Einmal-Pipetten	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Flow (Safe 2020)	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland

ANHANG

Folienschweißgerät	MoFix GmbH	Bad Rappenau, Deutschland
Glasgefäße	Schott	Mainz, Deutschland
Hamilton-Spritze	Hamilton	Bonaduz, Schweiz
Inkubator (Heracell 150)	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland
Insulinspritze	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Kamera Nikon D100	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Nalge Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Mikroplate Reader UV-3550	BioRad	München, Deutschland
Mikroskope		
➤ Axiophot	Zeiss	Göttingen, Deutschland
➤ Olympus IM	Olympus	Hamburg, Deutschland
Nitrozellulose-Membran	Whatman	Dassel, Deutschland
Objektträger	Menzel	Braunschweig, Deutschland
PCTE-Filter (0,8 µm Porengröße)	NeuroProbe	Gaithersburg, MD, USA
pH-Meter	Schott Geräte	Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Pipettus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße		
➤ 50 ml; 15 ml	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
➤ 2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
➤ 0,2 ml	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Photonenquelle		
➤ Röntgenröhre Isovolt DS1	Seifert	Ahrensburg, Deutschland
➤ Gammacell 2000	Nuklear Data	Frankfurt/Main, Deutschland
SDS-Gelelektrophoresesystem	PeqLab	Erlangen, Deutschland
Semi-dry Western Blot System	GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
Spannungsgerät	PeqLab	Erlangen, Deutschland
Schüttler		
➤ Horizontal	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
➤ Orbital	Thieme Labor- technik GmbH	Bensheim, Deutschland
Thermoblock	Labnet	Woodbridge, NJ, USA
Vortexer	Biometra	Göttingen, Deutschland
Wasserbad (Aqualine AL 5)	Lauda	Königshofen, Deutschland

ANHANG

Whatman-Filterpapier	Whatman	Dassel, Deutschland
Wattestäbchen	Rossmann	Burgwedel, Deutschland
Zellkulturgefäße	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	BD Falcon	Erembodegem, Belgien
Zentrifugen		
➤ Biofuge 15; Rotor 3042	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland
➤ Megafuge 1,0R; Rotor 2252	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland
➤ Fresco 17; Rotor 3424	Thermo Scientific	Langenselbold, Deutschland



6. Literaturverzeichnis

- Abounader R. **2009**. Interactions between PTEN and receptor tyrosine kinase pathways and their implications for glioma therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy* 9: 235-245.
- Andl CD, Mizushima T, Nakagawa H, Oyama K, Harada H, Chruma K, Herlyn M, Rustgi AK. **2003**. Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 278: 1824-1830.
- Becker KP und Yu J. **2012**. Status quo--standard-of-care medical and radiation therapy for glioblastoma. *Cancer Journal* 18: 12-19.
- Boyden S. **1962**. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Experimental Medicine* 115: 453-466.
- Carman CV. **2009**. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *Journal of Cell Science* 122: 3025-3035.
- Carrasco-Garcia E, Saceda M, Grasso S, Rocamora-Reverte L, Conde M, Gomez-Martinez A, Garcia-Morales P, Ferragut JA, Martinez-Lacaci I. **2011**. Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. *Experimental Cell Research* 317: 1476-1489.
- Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF. **2010**. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genetics* 6: e1000832 [published online 2010 January 29] Available from: www.plosgenetics.org.
- Collins VP. **1995**. Gene amplification in human gliomas. *Glia* 15: 289-296.
- Combs SE, Bohl J, Elsasser T, Weber KJ, Schulz-Ertner D, Debus J, Weyrather WK. **2009a**. Radiobiological evaluation and correlation with the local effect model (LEM) of carbon ion radiation therapy and temozolomide in glioblastoma cell lines. *International Journal of Radiation Biology* 85: 126-137.
- Combs SE, Nikoghosyan A, Jaekel O, Karger CP, Haberer T, Munter MW, Huber PE, Debus J, Schulz-Ertner D. **2009b**. Carbon ion radiotherapy for pediatric patients and young adults treated for tumors of the skull base. *Cancer* 115: 1348-1355.
- Combs SE, Zipp L, Rieken S, Habermehl D, Brons S, Winter M, Haberer T, Debus J, Weber KJ. **2012**. In vitro evaluation of photon and carbon ion radiotherapy in combination with chemotherapy in glioblastoma cells. *Radiation Oncology* 7: 9 [published online 2012 January 27] Available from: www.ro-journal.com.
- Debus J und Haberer T. **2012**. Das Heidelberger Ionenstrahl-Therapiezentrum (HIT). Stabsstelle für Presse- und Öffentlichkeitsarbeit des Universitätsklinikums Heidelberg und der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg.

- Delmas C, Heliez C, Cohen-Jonathan E, End D, Bonnet J, Favre G, Toulas C. **2002**. Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *International Journal of Cancer* 100: 43-48.
- Demuth T, Rennert JL, Hoelzinger DB, Reavie LB, Nakada M, Beaudry C, Nakada S, Anderson EM, Henrichs AN, McDonough WS, Holz D, Joy A, Lin R, Pan KH, Lih CJ, Cohen SN, Berens ME. **2008**. Glioma cells on the run - the migratory transcriptome of 10 human glioma cell lines. *BMC Genomics* 9: 54 [published online 2008 January 29] Available from: www.biomedcentral.com.
- Dent P, Reardon DB, Park JS, Bowers G, Logsdon C, Valerie K, Schmidt-Ullrich R. **1999**. 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. *Molecular Biology of the Cell* 10: 2493-2506.
- Eke I, Storch K, Kastner I, Vehlow A, Faethe C, Mueller-Klieser W, Taucher-Scholz G, Temme A, Schackert G, Cordes N. **2012**. Three-dimensional Invasion of Human Glioblastoma Cells Remains Unchanged by X-ray and Carbon Ion Irradiation In Vitro. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 84: e515-e523.
- Fan QW und Weiss WA. **2010**. Targeting the RTK-PI3K-mTOR axis in malignant glioma: overcoming resistance. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 347: 279-296.
- Fenstermaker RA und Ciesielski MJ. **2007**. EGFR Intron Recombination in Human Gliomas: Inappropriate Diversion of V(D)J Recombination? *Current Genomics* 8: 163-170.
- Fokas E, Kraft G, An H, Engenhart-Cabillic R. **2009**. Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves. *Biochimica et Biophysica Acta* 1796: 216-229.
- Friedl P und Wolf K. **2003**. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 3: 362-374.
- Fujita M, Otsuka Y, Imadome K, Endo S, Yamada S, Imai T. **2012**. Carbon-ion radiation enhances migration ability and invasiveness of the pancreatic cancer cell, PANC-1, in vitro. *Cancer Science* 103: 677-683.
- Galbraith CG, Yamada KM, Sheetz MP. **2002**. The relationship between force and focal complex development. *Journal of Cell Biology* 159: 695-705.
- Gallagher SM, Castorino JJ, Philp NJ. **2009**. Interaction of monocarboxylate transporter 4 with beta1-integrin and its role in cell migration. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 296: C414-C421.
- Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. **2001**. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 793-805.
- Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. **2009**. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nature Cell Biology* 11: 1287-1296.

- Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. **2002**. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends in Cell Biology* 12: 46-54.
- Goetze K, Scholz M, Taucher-Scholz G, Mueller-Klieser W. **2007**. The impact of conventional and heavy ion irradiation on tumor cell migration in vitro. *International Journal of Radiation Biology* 83: 889-896.
- Goetze K, Walenta S, Ksiazkiewicz M, Kunz-Schughart LA, Mueller-Klieser W. **2011**. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *International Journal of Oncology* 39: 453-463.
- Guo L, Kozlosky CJ, Ericsson LH, Daniel TO, Cerretti DP, Johnson RS. **2003**. Studies of ligand-induced site-specific phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14: 1022-1031.
- Halatsch ME, Schmidt U, Behnke-Mursch J, Unterberg A, Wirtz CR. **2006**. Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treatment Reviews* 32: 74-89.
- Hall E und Giaccia A. **2006**. *Radiobiology for the Radiologist*. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hamada N. **2009**. Recent insights into the biological action of heavy-ion radiation. *Journal of Radiation Research* 50: 1-9.
- Hartel C, Nikoghosyan A, Durante M, Sommer S, Nasonova E, Fournier C, Lee R, Debus J, Schulz-Ertner D, Ritter S. **2010**. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of prostate cancer patients treated with IMRT and carbon ions. *Radiotherapy and Oncology* 95: 73-78.
- Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. **2010**. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* 12: 675-684.
- Hong WK, Bast RC, Hait WN, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei III E. **2010**. *Cancer Medicine*. 8. Edition. People's Medical Publishing House-USA.
- Huber SM, Misovic M, Mayer C, Rodemann HP, Dittmann K. **2012**. EGFR-mediated stimulation of sodium/glucose cotransport promotes survival of irradiated human A549 lung adenocarcinoma cells. *Radiotherapy and Oncology* 103: 373-379.
- Hughes PE, Renshaw MW, Pfaff M, Forsyth J, Keivens VM, Schwartz MA, Ginsberg MH. **1997**. Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* 88: 521-530.
- Hynes NE und MacDonald G. **2009**. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 21: 177-184.
- Inoue H, Miyazaki Y, Kikuchi K, Yoshida N, Ide F, Ohmori Y, Tomomura A, Sakashita H, Kusama K. **2012**. Podoplanin promotes cell migration via the EGF-Src-Cas pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Journal of Oral Science* 54: 241-250.

- Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS. **2005**. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Biology* 171: 1023-1034.
- Jensen AD, Nikoghosyan A, Hinke A, Debus J, Munter MW. **2011**. Combined treatment of adenoid cystic carcinoma with cetuximab and IMRT plus C12 heavy ion boost: ACCEPT [ACC, Erbitux(R) and particle therapy]. *BMC Cancer* 11: 70 [published online 2011 February 15] Available from: www.biomedcentral.com.
- Jensen AD, Nikoghosyan AV, Lossner K, Herfarth KK, Debus J, Munter MW. **2012**. IMRT and carbon ion boost for malignant salivary gland tumors: interim analysis of the COSMIC trial. *BMC Cancer* 12: 163 [published online 2012 May 02] Available from: www.biomedcentral.com.
- Katz M, Amit I, Yarden Y. **2007**. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 1161-1176.
- Khalil AA, Jameson MJ, Broaddus WC, Lin PS, Chung TD. **2012**. Nicotine enhances proliferation, migration, and radioresistance of human malignant glioma cells through EGFR activation. *Brain Tumor Pathology* [published online 2012 May 22] Available from: www.springer.com.
- Koul D. **2008**. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biology and Therapy* 7: 1321-1325.
- Kraft G. **2008**. Tumorthérapie mit schweren Ionen. Second edition. Gesellschaft für Schwerionenforschung mbH, Verein zur Förderung der Tumorthérapie mit schweren Ionen e. V.
- Kraft G. **2000**. Tumorthérapie with ion beams. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* 454: 1-10.
- Lauffenburger DA und Horwitz AF. **1996**. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359-369.
- Lee HC, An S, Lee H, Woo SH, Jin HO, Seo SK, Choe TB, Yoo DH, Lee SJ, Hong YJ, Park MJ, Rhee CH, Park IC, Hong SI. **2008**. Activation of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling pathway by nitric oxide in response to ionizing radiation. *Molecular Cancer Research* 6: 996-1002.
- Lee MF, Pan MH, Chiou YS, Cheng AC, Huang H. **2011**. Resveratrol modulates MED28 (Magicin/EG-1) expression and inhibits epidermal growth factor (EGF)-induced migration in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 11853-11861.
- Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Humphrey PA, Bigner SH, Bigner DD, Laerum OD. **1990**. Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Research* 50: 6039-6044.

- Manning BD und Cantley LC. **2007**. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261-1274.
- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. **2004**. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 58: 903-913.
- McClintock JL und Ceresa BP. **2010**. Transforming growth factor- α enhances corneal epithelial cell migration by promoting EGFR recycling. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51: 3455-3461.
- Minder P, Bayha E, Becker-Pauly C, Sterchi EE. **2012**. Meprinalpha transactivates the epidermal growth factor receptor (EGFR) via ligand shedding, thereby enhancing colorectal cancer cell proliferation and migration. *Journal of Biological Chemistry* 287: 35201-35211.
- Mitra AK, Bhat N, Sarma A, Krishna M. **2005**. Alteration in the expression of signaling parameters following carbon ion irradiation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 276: 169-173.
- Mizoe JE, Tsujii H, Hasegawa A, Yanagi T, Takagi R, Kamada T, Tsuji H, Takakura K. **2007**. Phase I/II clinical trial of carbon ion radiotherapy for malignant gliomas: combined X-ray radiotherapy, chemotherapy, and carbon ion radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 69: 390-396.
- Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, Huang HJ. **1996**. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Research* 56: 5079-5086.
- Newhauser WD und Durante M. **2011**. Assessing the risk of second malignancies after modern radiotherapy. *Nature Reviews Cancer* 11: 438-448.
- Ogata T, Teshima T, Inaoka M, Minami K, Tsuchiya T, Isono M, Furusawa Y, Matsuura N. **2011**. Carbon ion irradiation suppresses metastatic potential of human non-small cell lung cancer A549 cells through the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway. *Journal of Radiation Research* 52: 374-379.
- Ogata T, Teshima T, Kagawa K, Hishikawa Y, Takahashi Y, Kawaguchi A, Suzumoto Y, Nojima K, Furusawa Y, Matsuura N. **2005**. Particle irradiation suppresses metastatic potential of cancer cells. *Cancer Research* 65: 113-120.
- Ohgaki H und Kleihues P. **2005**. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 479-489.
- Okada T, Kamada T, Tsuji H, Mizoe JE, Baba M, Kato S, Yamada S, Sugahara S, Yasuda S, Yamamoto N, Imai R, Hasegawa A, Imada H, Kiyohara H, Jingu K, Shinoto M, Tsujii H. **2010**. Carbon ion radiotherapy: clinical experiences at National Institute of Radiological Science (NIRS). *Journal of Radiation Research* 51: 355-364.
- Palmer TD, Ashby WJ, Lewis JD, Zijlstra A. **2011**. Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63: 568-581.

- Pickhard AC, Margraf J, Knopf A, Stark T, Piontek G, Beck C, Boulesteix AL, Scherer EQ, Pigorsch S, Schlegel J, Arnold W, Reiter R. **2011**. Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways. *BMC Cancer* 11: 388 [published online 2011 September 06] Available from: www.biomedcentral.com.
- Ponten J und Macintyre EH. **1968**. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 74: 465-486.
- Preusser M, de Ribaupierre S, Wohrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, Stupp R. **2011**. Current concepts and management of glioblastoma. *Annals of Neurology* 70: 9-21.
- PTCOG. **2013**. <http://ptcog.web.psi.ch/>.
- Rappl A, Piontek G, Schlegel J. **2008**. EGFR-dependent migration of glial cells is mediated by reorganisation of N-cadherin. *Journal of Cell Science* 121: 4089-4097.
- Ridley AJ. **2011**. Life at the leading edge. *Cell* 145: 1012-1022.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. **2003**. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709.
- Rieken S, Habermehl D, Mohr A, Wuerth L, Lindel K, Weber K, Debus J, Combs SE. **2011**. Targeting alphanubeta3 and alphanubeta5 inhibits photon-induced hypermigration of malignant glioma cells. *Radiation Oncology* 6: 132 [published online 2011 October 6] Available from: www.ro-journal.com.
- Rieken S, Habermehl D, Wuerth L, Brons S, Mohr A, Lindel K, Weber K, Haberer T, Debus J, Combs SE. **2012**. Carbon ion irradiation inhibits glioma cell migration through downregulation of integrin expression. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 83: 394-399.
- Robert Koch-Institut. **2012**. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM. **2003**. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature Cell Biology* 5: 599-609.
- Rofstad EK, Galappathi K, Mathiesen B. **2004**. Thrombospondin-1 treatment prevents growth of dormant lung micrometastases after surgical resection and curative radiation therapy of the primary tumor in human melanoma xenografts. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 58: 493-499.
- Ronellenfisch MW, Steinbach JP, Wick W. **2010**. Epidermal growth factor receptor and mammalian target of rapamycin as therapeutic targets in malignant glioma: current clinical status and perspectives. *Targeted Oncology* 5: 183-191.
- Saito T, Okada S, Ohshima K, Yamada E, Sato M, Uehara Y, Shimizu H, Pessin JE, Mori M. **2004**. Differential activation of epidermal growth factor (EGF) receptor downstream signaling pathways by betacellulin and EGF. *Endocrinology* 145: 4232-4243.

- Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Lammering G, Amorino G, Lin PS. **2003**. ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* 22: 5855-5865.
- Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, Kavanagh BD, Contessa JN, Rorrer WK, Chen PB. **1997**. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 15: 1191-1197.
- Scholz M. **2000**. Heavy ion tumour therapy. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 161: 76-82.
- Schulz-Ertner D, Karger CP, Feuerhake A, Nikoghosyan A, Combs SE, Jakel O, Edler L, Scholz M, Debus J. **2007a**. Effectiveness of carbon ion radiotherapy in the treatment of skull-base chordomas. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 68: 449-457.
- Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Hof H, Didinger B, Combs SE, Jakel O, Karger CP, Edler L, Debus J. **2007b**. Carbon ion radiotherapy of skull base chondrosarcomas. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 67: 171-177.
- Schulz-Ertner D und Tsujii H. **2007**. Particle radiation therapy using proton and heavier ion beams. *Journal of Clinical Oncology* 25: 953-964.
- Shoelson SE. **1997**. SH2 and PTB domain interactions in tyrosine kinase signal transduction. *Current Opinion in Chemical Biology* 1: 227-234.
- Sorkin A und Goh LK. **2008**. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Experimental Cell Research* 314: 3093-3106.
- Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D, Bourne HR. **2003**. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *Journal of Cell Biology* 160: 375-385.
- Steidl P, Richter D, Schuy C, Schubert E, Haberer T, Durante M, Bert C. **2012**. A breathing thorax phantom with independently programmable 6D tumour motion for dosimetric measurements in radiation therapy. *Physics in Medicine and Biology* 57: 2235-2250.
- Steinbach JP, Supra P, Huang HJ, Cavenee WK, Weller M. **2002**. CD95-mediated apoptosis of human glioma cells: modulation by epidermal growth factor receptor activity. *Brain Pathology* 12: 12-20.
- Steinle M, Palme D, Misovic M, Rudner J, Dittmann K, Lukowski R, Ruth P, Huber SM. **2011**. Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K(+) channels. *Radiotherapy and Oncology* 101: 122-126.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. **2005**. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352: 987-996.

- Sturla LM, Amorino G, Alexander MS, Mikkelsen RB, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. **2005**. Requirement of Tyr-992 and Tyr-1173 in phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by ionizing radiation and modulation by SHP2. *Journal of Biological Chemistry* 280: 14597-14604.
- Thompson LH. **2012**. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutation Research* 751: 158-246.
- Tomiyama A, Tachibana K, Suzuki K, Seino S, Sunayama J, Matsuda KI, Sato A, Matsumoto Y, Nomiya T, Nemoto K, Yamashita H, Kayama T, Ando K, Kitanaka C. **2010**. MEK-ERK-dependent multiple caspase activation by mitochondrial proapoptotic Bcl-2 family proteins is essential for heavy ion irradiation-induced glioma cell death. *Cell Death and Disease* 1: e60 [published online 2010 July 29] Available from: www.nature.com.
- Vaidya RJ, Ray RM, Johnson LR. **2006**. Akt-mediated GSK-3beta inhibition prevents migration of polyamine-depleted intestinal epithelial cells via Rac1. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 2871-2879.
- Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, Dent P. **2007**. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Molecular Cancer Therapeutics* 6: 789-801.
- van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. **2011**. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research* 728: 23-34.
- Wang XQ, Lindberg FP, Frazier WA. **1999**. Integrin-associated protein stimulates alpha2beta1-dependent chemotaxis via Gi-mediated inhibition of adenylate cyclase and extracellular-regulated kinases. *Journal of Cell Biology* 147: 389-400.
- Webb DJ, Zhang H, Horwitz AF. **2005**. Cell migration: an overview. *Methods in Molecular Biology* 294: 3-11.
- Weihua Z, Tsan R, Huang WC, Wu Q, Chiu CH, Fidler IJ, Hung MC. **2008**. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. *Cancer Cell* 13: 385-393.
- Welch HC, Coadwell WJ, Stephens LR, Hawkins PT. **2003**. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Letters* 546: 93-97.
- Wells A. **1999**. EGF receptor. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31: 637-643.
- Wells A und Marti U. **2002**. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 697-702.
- Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, Dichgans J, Wick W. **2001**. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Research* 61: 2744-2750.
- Yacoub A, Miller A, Caron RW, Qiao L, Curiel DA, Fisher PB, Hagan MP, Grant S, Dent P. **2006**. Radiotherapy-induced signal transduction. *Endocrine-related Cancer* 13: S99-S114.

- Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS. **2007**. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cellular Signalling* 19: 2013-2023.
- Zhang L, Wang F, Jiang Y, Xu S, Lu F, Wang W, Sun X, Sun X. **2013**. Migration of retinal pigment epithelial cells is EGFR/PI3K/AKT dependent. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 5: 661-671.
- Zhou GL, Tucker DF, Bae SS, Bhatheja K, Birnbaum MJ, Field J. **2006**. Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *Journal of Biological Chemistry* 281: 36443-36453.
- Zhou YC, Liu JY, Li J, Zhang J, Xu YQ, Zhang HW, Qiu LB, Ding GR, Su XM, Mei S, Guo GZ. **2011**. Ionizing radiation promotes migration and invasion of cancer cells through transforming growth factor-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 81: 1530-1537.







