

**Aus der
Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Radioonkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg**

**Effektivität von molekular zielgerichteten
Dreifach-Kombinationstherapien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Karim-Maximilian Niyazi

aus

Stuttgart

2009

**Aus der
Universitätsklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Radioonkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg**

**Effektivität von molekular zielgerichteten
Dreifach-Kombinationstherapien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Karim-Maximilian Niyazi

aus

Stuttgart

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Belka

2. Berichterstatter:

Professor Dr. W. Budach

Meinen Eltern Anne und Ismat gewidmet

*Ärzte haben es am besten von allen Berufen: Ihre Erfolge laufen herum und
ihre Misserfolge werden begraben.*

Jacques Tati, frz. Schauspieler und Komödiant

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1. Radioonkologie	10
1.2. DNA-Schaden und –Reparatur nach Bestrahlung	10
1.3. Zelltodmechanismen	11
1.4. Molekulare Komponenten der apoptotischen Signaltransduktion	12
1.4.1. Caspasen	12
1.4.2. Bcl-2-Familie	13
1.5. Apoptotische Signalwege	14
1.6. Todesrezeptoren und TRAIL	16
1.6.1. Mapatumumab und Lexatumumab	17
1.7. Wachstumshemmung	18
1.7.1. EGF-Rezeptor (EGFR)	18
1.7.2. EGFR-Blockade mittels Cetuximab (C225)	19
1.8. Klassische Zytotoxizität	20
1.8.1. Cisplatin	20
1.9. Klonogener Zelltod	21
1.10. Fragestellung	22
2. Material	24
2.1. Chemikalien	24
2.2. Puffer und Lösungen	24
2.3. Western-Blot	25
2.4. Zellkultur	26
2.5. Antikörper und Liganden	26
2.5.1. Antikörper zur Westernblotanalyse	26
2.6. Medikamente	27
2.7. Zellen	27
2.8. PCR	27
2.9. Verbrauchsmaterial	28
2.10. Geräte	28
2.11. Software	29
3. Methoden	30
3.1. Zellkultur	30
3.1.1. Zell-Kultivierung	30
3.1.2. Mediumwechsel	30
3.1.3. Passagierung der Zellen	30
3.1.4. Bestimmung der Zellzahl (Neubauer-Zählkammer)	31
3.2. Mykoplasmen-Detektion in Zellkulturen mittels PCR	32
3.3. Bestrahlung von Zellen	32
3.4. Fluoreszenzmikroskopie und Hoechst-Analysen	33
3.4.1. Prinzip	33
3.4.2. Unterscheidungskriterien	33
3.4.3. Vorbereitung	34
3.4.4. Herstellung der Färbelösung	34
3.4.5. Auszählung	34
3.5. FACS-Analysen	34
3.5.1. FACS-Theorie	34

3.5.2.	EGF-Rezeptor-Oberflächenexpression.....	35
3.6.	Western-Blotting.....	36
3.6.1.	Lysate	36
3.6.2.	Befüllung der Kammer	37
3.6.3.	Gel beladen.....	37
3.6.4.	Blotting.....	38
3.6.5.	Blocken	39
3.6.6.	Inkubation mit dem Primär-Antikörper.....	39
3.6.7.	Inkubation mit dem Zweit-Antikörper.....	39
3.6.8.	Detektion mit ECL-Kit.....	39
3.7.	Koloniebildung.....	39
3.7.1.	Ausgangszellzahl und Plating efficiency (PE)	40
3.7.2.	Verdünnung	40
3.7.3.	KoBi-Zählprogramm.....	41
3.8.	Allgemeine Statistik.....	42
4.	Ergebnisse.....	43
4.1.	Bestimmung der EGFR-Dichte.....	43
4.2.	Einzelwirkungen der Agenzien.....	44
4.3.	Zweifachkombinationen	45
4.4.	Dreifachkombinationen	46
4.5.	Isobologramm-Analyse	49
4.5.1.	Einführung.....	49
4.5.2.	Theoretischer Hintergrund	49
4.5.3.	Formale Definitionen.....	51
4.5.4.	Konzept.....	51
4.5.5.	Beispiel	52
4.5.6.	Ergebnisse der isobographischen Auswertung	58
4.6.	Bax-Abhängigkeit des kombinierten Effekts.....	61
4.7.	PI3K-Abhängigkeit	63
4.8.	Klonogenes Überleben.....	64
4.9.	Kombinationsversuche mit Cisplatin	67
4.9.1.	Bax-Abhängigkeit.....	69
4.9.2.	3D-Isobologramm-Analyse.....	71
5.	Diskussion	74
5.1.	Effektivität der Dreifachtherapie	74
5.1.1.	Endpunkt Apoptose.....	74
5.1.2.	Endpunkt klonogener Zelltod	74
5.1.3.	Vorarbeiten zu Kombinationstherapien	75
5.1.4.	Ausblick.....	76
5.2.	3D-Isobologramm-Analyse als neues Analyse-Werkzeug	76
5.3.	Beteiligte Moleküle.....	77
5.3.1.	Bax.....	77
5.3.2.	PI3K.....	77
5.4.	Ausblick und Rationale für die präklinische Validierung.....	78
6.	Zusammenfassung.....	79
7.	Literaturverzeichnis	81
8.	Abkürzungen	89
8.1.	Einheiten	89

8.2. Weitere Abkürzungen.....	89
9. Danksagung.....	93
10. Lebenslauf.....	95
11. Schriftenverzeichnis.....	97
11.1. Abstracts.....	97
11.2. Publikationen.....	98

1. Einleitung

1.1. Radioonkologie

Die Radioonkologie ist ein wichtiger Bestandteil der modernen Tumorthherapie (beispielsweise bei soliden Tumoren des HNO-Bereichs oder Bronchialkarzinomen im fortgeschrittenen Stadium).

Durch die in neuerer Zeit in der Onkologie entwickelten multimodalen Konzepte bestehend aus Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie hat die Radioonkologie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Um die Bedeutung der Strahlentherapie abzuschätzen, kann man auf ältere Statistiken zurückgreifen, bei denen 40 % der neu diagnostizierten Krebsfälle durch lokale Behandlungen (Chirurgie und/oder Strahlentherapie) erfolgreich therapiert wurden. Dabei war die Strahlentherapie in 15 % aller Fälle die Haupt-Therapieform. Nur etwa 2 % der in erster Linie mit Chemotherapie behandelten Patienten überlebten längerfristig. Durch alleinige Strahlentherapie können etwa 18 % der behandelten Tumorerkrankungen geheilt werden (24, 80).

1.2. DNA-Schaden und –Reparatur nach Bestrahlung

Ionisierende Strahlung kann Wasser oder andere Moleküle spalten (sog. Radiolyse), wodurch Radikale entstehen (ROS, Reactive Oxygen Species). Diese können die Chromosomen angreifen und in diesen Brüche setzen.

Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch den Zellzyklus, der sich aus 4 definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G1, S, G2 und M-Phase. Das Fortschreiten einer Zelle aus der G0-Ruhephase in die G1-Phase (Gap-Phase 1) des Zellzyklus und aus der G1-Phase in die S-Phase wird durch den G1-Restriktionspunkt in der späten G1-Phase reguliert (22).

Ziel der Mitose ist die identische Replikation der Zelle. Daher muss vorher in der S-Phase der DNA-Gehalt verdoppelt werden. Dies ist der wunde Punkt des

Zellzyklus, weshalb um diese Phase mehrere sog. „Checkpoints“ eingerichtet sind, um die korrekte DNA-Verdopplung zu überwachen.

Besonders strahlensensibel sind Zellen in der M-Phase des Zellzyklus, in der sich die Zelle desto häufiger befindet, je häufiger sie sich teilt. Daher sind Krebszellen genuin anfällig für eine Strahlentherapie. Hinzu kommt deren unzureichendes Reparatursystem, was häufig den Preis für eine schnelle und ungehemmte Proliferation darstellt.

Die normale menschliche Zelle besitzt für die verschiedenen Arten von DNA-Schäden ausgefeilte Reparaturmechanismen.

Bei der Basenexzisionsreparatur wird beispielsweise ein Fehler in der Basenpaarung eines der beiden DNA-Stränge behoben, bei der Nukleotidexzisionsreparatur, bei der zwei Formen unterschieden werden, werden entweder Fehler in transkriptionsinaktiven Bereichen der DNA behoben oder in der aktuell zu transkribierenden DNA.

Den Doppelstrangbrüchen, welche etwa 1 % der gesamten DNA-Schäden ausmachen, wird die größte Bedeutung in Bezug auf die Wirkung der Strahlentherapie zugeschrieben.

1.3. Zelltodmechanismen

Die auf der ROS-vermittelten DNA-Schädigung der Zellen basierende Wirkung der Strahlentherapie führt beispielsweise über bestimmte molekulare Signalkaskaden zur Apoptose, zieht eine Nekrose nach sich oder führt zu einem Wachstumsarrest, welcher in eine Seneszenz mündet.

Unter Apoptose (*griech.: απόπτωσης - in etwa das Abfallen, der Niedergang*) versteht man den Caspase-abhängigen programmierten Zelltod (zur ausführlichen Begriffsbildung siehe (49)), der über eine bestimmte Morphologie definiert wird.

Im Folgenden soll eine systematische Aufstellung gegeben werden, wie man Nekrose und Apoptose anhand der Morphologie, der biochemischen Veränderungen sowie der physiologischen Bedeutung differenzieren kann.

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose (76).

Apoptose	Nekrose
Programmierter „physiologischer“ Zelltod	„unphysiologischer“ Zelltod
Morphologische Veränderungen	
Zellschrumpfung, Vesikelbildung	Zellschwellung
Bildung von Membranausstülpungen	Verlust der Membranintegrität
Chromatin-Kondensation	Chromatin-Verlust
Biochemische Veränderungen	
DNA-Fragmentierung	Postlytische DNA-Fragmentierung
Genau regulierter, ATP-verbrauchender Prozess	Passiver, nicht regulierter Prozess ohne Energie-Verbrauch
Physiologische Bedeutung	
Phagozytose	Gewebsschädigung
Keine Entzündungsreaktion	Entzündungsreaktion

1.4. Molekulare Komponenten der apoptotischen Signaltransduktion

1.4.1. Caspasen

Intensiv erforscht wurde die apoptotische Signalkaskade an der Nematode *Caenorhabditis elegans*, bei der die pro-apoptotischen Todesgene *ced-3* und *ced-4* sowie das anti-apoptotische *ced-9* Gen entdeckt wurden (18). Dies legte

die Grundlage für die Entdeckung homologer Gene bzw. Proteine bei Säugetieren.

Durch die Entdeckung der Homologie zwischen der bereits bekannten ICE-Protease beim Menschen und dem ced-3 Protein war der Grundstein gelegt für die Entdeckung weiterer Mitglieder einer Gruppe von Cystein-Proteasen, die in der Folge als Caspasen bezeichnet wurden.

Der Name Caspase ist ein zusammengesetztes Kunstwort und bedeutet Cystein-Protease mit Aspartatspezifität in der Konsensussequenz (ein Übersichtsartikel findet sich in (74)).

Die Caspasen sind zentrale Exekutoren der hierarchisch gegliederten Apoptose-Kaskade und sind für die proteolytische Spaltung einer Vielzahl von Substraten verantwortlich, was letztlich zum apoptotischen Phänotyp führt.

1.4.2. Bcl-2-Familie

Bcl-2 leitet sich von B-cell-lymphoma/leucemia-2 ab und ist ein zu ced-9 homologes anti-apoptotisches Protein.

Es existieren drei Bcl-2-homologe Familien: Bcl-2 und Bcl-x_L als anti-apoptotische Moleküle, die Gruppe um Bax und Bak sowie die BH3-only Proteine, welche Bid und Bad enthalten (82).

Bax und Bak sind Multi-Domänen Proteine mit pro-apoptotischer Funktion, die mitochondriale Dysfunktion induzieren, aber auch am endoplasmatischen Retikulum apoptotische Prozesse regulieren (79).

Zellen, denen sowohl Bax wie auch Bak fehlen, sind resistent gegen multiple apoptotische Stimuli, die durch Aufhebung der mitochondrialen Integrität ablaufen, u. a. UV-Strahlung, Staurosporin, Tunicamycin oder Wachstumsfaktor-Deprivation. Außerdem sind zweifach defiziente Zelllinien komplett resistent gegenüber tBid-induzierter Cytochrom c Freisetzung (tBid ist die Caspasen-aktivierte Form von Bid und induziert im Normalfall die Oligomerisierung von Bak und Bax) (89).

Im Cytosol vorliegendes Bax kann Apoptose stimulieren durch Einbau in die Mitochondrienmembran. Um die Regulation seiner subzellulären Lokalisation zu

verstehen, wurde die lösliche Form von Bax auf seine molekulare Struktur untersucht. Bax besteht aus neun α -Helices, wobei die 9. α -Helix entscheidend für das mitochondriale Targeting und die Dimer-Formation verantwortlich zu sein scheint (82).

1.5. Apoptotische Signalwege

Der programmierte Zelltod erfolgt im Wesentlichen über zwei distinkte Wege. Allerdings sind diese Signalwege nicht vollständig getrennt, sondern weisen Querverbindungen auf. In **Abbildung 1** sind die zwei Wege gezeigt, zum einen der Todesrezeptor-vermittelte Zelltod über die extrinsische Signalkaskade sowie der intrinsische/mitochondriale Apoptoseweg.

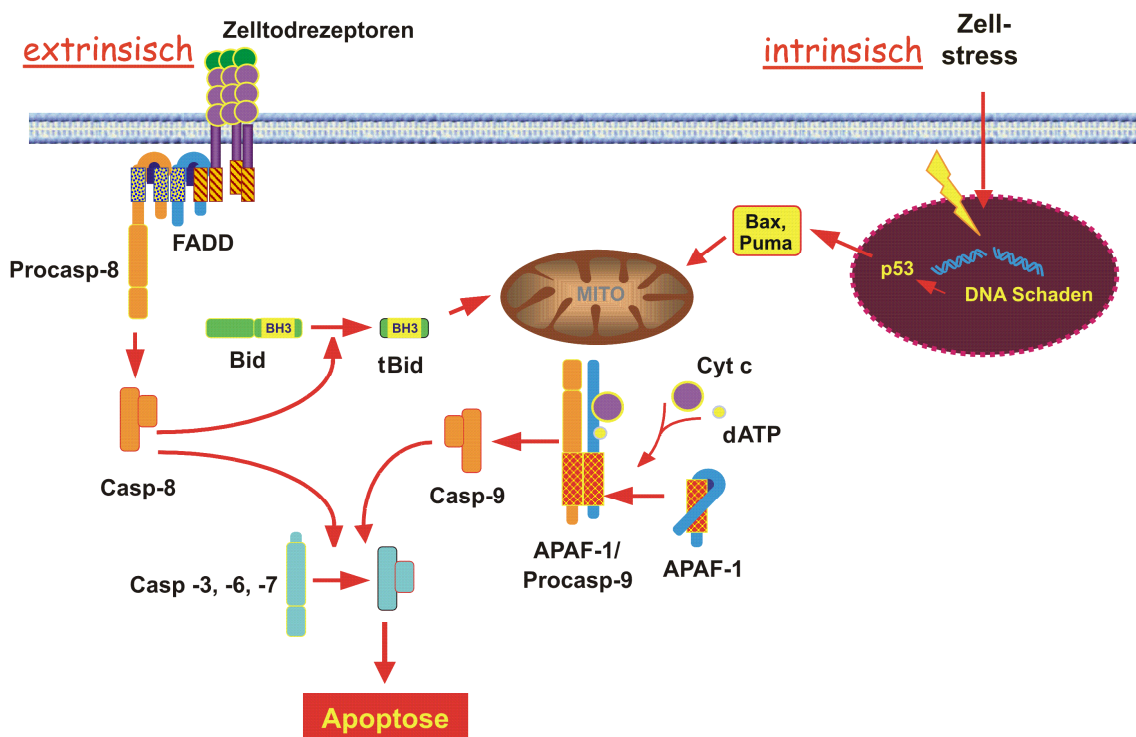


Abbildung 1: Gezeigt sind sowohl der extrinsische Rezeptor-vermittelte als auch der intrinsische (mitochondriale) Apoptoseweg. Die Querverbindung zwischen beiden Signalwegen über Bid ist ebenfalls dargestellt (mit freundlicher Genehmigung von/modifiziert nach P. Marini).

Im Rezeptor-vermittelten Weg (z. B. über CD95/Fas/Apo11) wird durch äußere Stimuli eine Kaskade in Gang gesetzt, an der die FADD (Fas associated death domain) beteiligt ist, welche mit dem inneren Anker des CD95-Rezeptors in Wechselwirkung steht. Die DD (death domain) von FADD wechselwirkt wiederum mit der Domäne DED der Procaspase 8 (eine Initiatorcaspase mit langer Pro-Domäne) und bildet den sog. DISC (Death inducing signaling complex). Dadurch wird Procaspase 8 zu Caspase 8 proteolytisch aktiviert, welche die Effektor-Caspase 3 aktiviert. Diese wiederum aktiviert Caspase-9; Caspase-3 spaltet außerdem den inhibitorischen Komplex an der ICAD (inaktive Caspase abhängige DNase), wodurch die CAD in den Zellkern transloziert und dort die DNA fragmentiert (27, 73).

Es existiert jedoch eine Querverbindung zum mitochondrialen Apoptoseweg: Caspase 8 aktiviert Bid zu tBid, was anscheinend über eine Aktivierung von Bax/Bak zu einer Ausschüttung von mitochondrialem Cytochrom c führt (41).

Dieser Effekt wird hauptsächlich für den intrinsischen Weg der Apoptose verantwortlich gemacht. Cytochrom c bildet einen Komplex mit dem Adaptorprotein APAF-1 und dATP, der als Apoptosom bezeichnet wird. Dieser Komplex führt wiederum zur Aktivierung der Effektor-Caspase 9. Im weiteren Verlauf werden die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert.

Cytochrom c wird auch durch andere Stimuli aus der Mitochondrienmembran freigesetzt. Dies sind z. B. ionisierende Strahlung oder p53-Aktivierung, was wohl über eine Signalkette geschieht, an der weitere Proteine wie Bak/Bax sowie Puma und Noxa beteiligt sind.

Es existieren auch hemmende Mediatoren wie Bcl-2, das zu den ced-9 homologen Proteinen gehört, welches den Apoptoseweg auf mehreren Ebenen hemmen kann (z. B. durch eine Ionenkanaleigenschaft, durch die der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ verhindert wird).

1.6. Todesrezeptoren und TRAIL

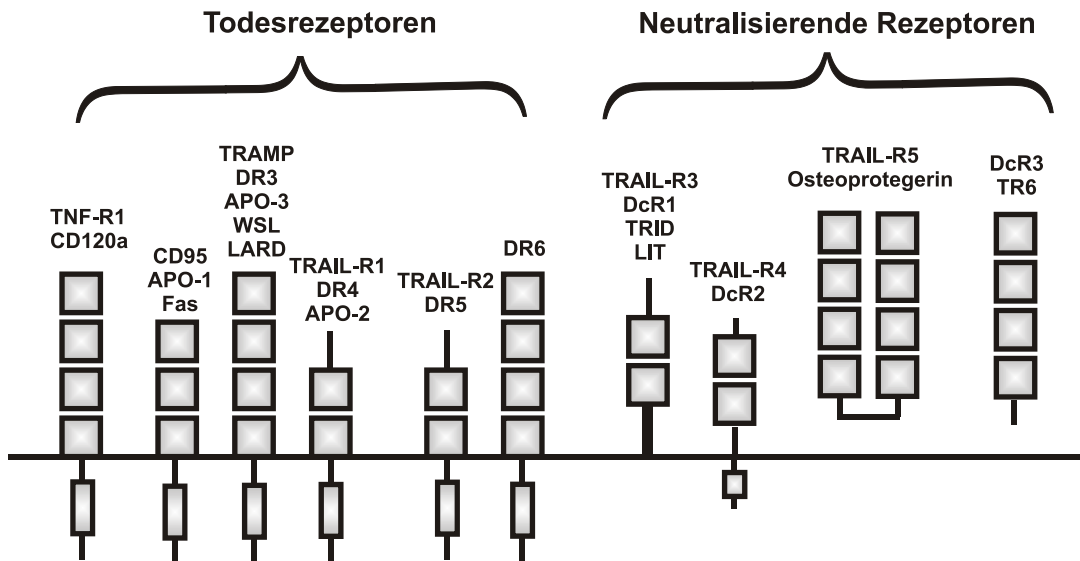


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Todesrezeptoren und ihrer neutralisierenden Rezeptoren (modifiziert nach (78)). Mitglieder dieser Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind durch ihre intrazelluläre Todesdomäne gekennzeichnet (graue Box). Die zwei bis vier Quadrate im extrazellulären Teil repräsentieren homologe Domänen reich an Cysteinresten. Die TRAIL neutralisierenden Rezeptoren (DcR1, DcR2) besitzen keinen intrazellulären Teil oder enthalten eine verkürzte, nicht funktionelle Todesdomäne. Osteoprotegerin (OPG) und DcR3 werden sezerniert.

TRAIL (TNF α -related apoptosis-inducing ligand) besteht aus 281 bzw. 291 Aminosäuren (in der menschlichen/murinen Form), wobei die beiden Proteine zu 65 % ähnlich sind. TRAIL ist ein Typ II Membran-Protein, dessen C-terminale Domäne klare Homologie zu TNF Familien-Mitgliedern besitzt. Das TRAIL-Gen ist im menschlichen Genom an der Position 3q26 lokalisiert. Sowohl das lösliche TRAIL als auch der Oberflächenrezeptor induzieren Apoptose in einer großen Anzahl von Zellen (91).

TRAIL ist ein wichtiger Mediator in der natürlichen Immunabwehr und spielt als Zytokin eine Rolle in der Wirtsabwehr transformierter Zellen, was Cretney et al. anhand von TRAIL defizienten Mäusen (TRAIL^{-/-}) zeigen konnten, indem sie nachwiesen, dass diese Mäuse anfälliger waren für spontane sowie experimentelle Tumormetastasierung und der Effekt bestimmter Immunmodulatoren aufgehoben wurde (21). Takeda et al. berichteten

außerdem, dass der TRAIL-Rezeptor auf murinen NK-Zellen exprimiert sei, wodurch er eine wichtige anti-metastatische Aufgabe wahrnehmen würde (83).

Seit der Entdeckung dieses pro-apoptotischen Proteins wurde seine Wirksamkeit für eine ganze Reihe von Tumorentitäten überprüft, u. a. Prostata (92), Schilddrüse (58), Ovarial-Ca (1), Nierenzell-Ca (33), Ewing-Sarkom (87) sowie beim Multiplen Myelom (Plasmozytom, M. Kahler, (30)).

Neben einer Vielzahl anderer Modelle werden zur Erklärung der geringen Normalgewebstoxizität häufig sogenannte Decoy-Rezeptoren herangezogen, die ubiquitär im Normalgewebe exprimiert sind. Diese sind ähnlich wie der TRAIL-Rezeptor aufgebaut, binden TRAIL, lösen aber subsequent nicht die Caspasen-Kaskade aus (56, 58), da ihnen die intrazelluläre Signal-Domäne fehlt (64).

In einzelnen Studien wurde eine Hirntoxizität beschrieben, weshalb TRAIL nicht als sinnvolles Therapeutikum für Hirntumoren erschien, jedoch wurde die Wirkung auf neuro-inflammatorische T-Zellen als Indiz dafür gewertet, dass TRAIL möglicherweise ein therapeutischer Ansatz für die Multiple Sklerose sein könnte (60).

1.6.1. Mapatumumab und Lexatumumab

Nach widersprüchlichen Daten zur Hepatotoxizität von TRAIL (32, 36, 40) konnte jedoch gezeigt werden, dass diese von der biochemischen Präparation des Liganden abhängt (48).

Zur weiteren Optimierung entwickelte die Firma Human Genome Sciences, Rockville, Kalifornien, USA die agonistischen TRAIL-Antikörper Mapatumumab und Lexatumumab, die aufgrund einer in vivo gegenüber TRAIL verlängerten Halbwertszeit ein noch höheres therapeutisches Potential besitzen sollen (69).

Auf der Zelloberfläche werden 5 verschiedene TRAIL-Rezeptoren exprimiert (78), wobei die agonistischen Antikörper Mapatumumab/HGS-ETR1 und Lexatumumab/HGS-ETR2 mit hoher Affinität und Spezifität gegen die Rezeptoren DR4 (R1) und DR5 (R2) gerichtet sind (69).

TRAIL-R1 (DR4) sowie TRAIL-R2 (DR5) bilden nach Bindung von TRAIL an den Rezeptor an der Zelloberfläche jeweils oligo- oder multimere Komplexe und transduzieren somit das Todessignal in die Zelle (77).

Die beiden Antikörper befinden sich momentan in klinischer Phase II-Testung und weisen bisher keine relevante Toxizität auf (3, 42).

1.7. Wachstumshemmung

1.7.1. EGF-Rezeptor (EGFR)

Der epidermal growth factor receptor (EGFR) ist ein etwa 170 kDa schweres Transmembran-Glykoprotein, das hauptsächlich auf Zellen epithelialen Ursprungs gefunden wird (85).

Der EGFR gehört zu den wichtigsten Wachstums-regulierenden Rezeptoren und übt seine Funktion hauptsächlich durch eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität aus, welche durch Bindung von Liganden aktiviert werden kann (16, 17, 66). Er spielt eine große Rolle bezüglich Proliferation, Metastasierung und Angiogenese (26). Bei klinisch relevanten Bestrahlungsdosen wird u. a. Akt/PKB aktiviert (20), wobei die Signalkaskade über Ras und die PI3K vorgeschaltet ist (34).

Eine Überexpression des EGFR findet sich in Karzinomen der Brust (hier spielt insbesondere der HER2-Rezeptor eine wichtige Rolle als prognostischer Faktor und als therapeutisches Target von Trastuzumab), der Blase, der Prostata, der Lunge (NSCLC) und bei Kopf-Hals-Tumoren (35, 59). Eine hohe Expression von EGFR ist zudem ein negativer prognostischer Faktor (72).

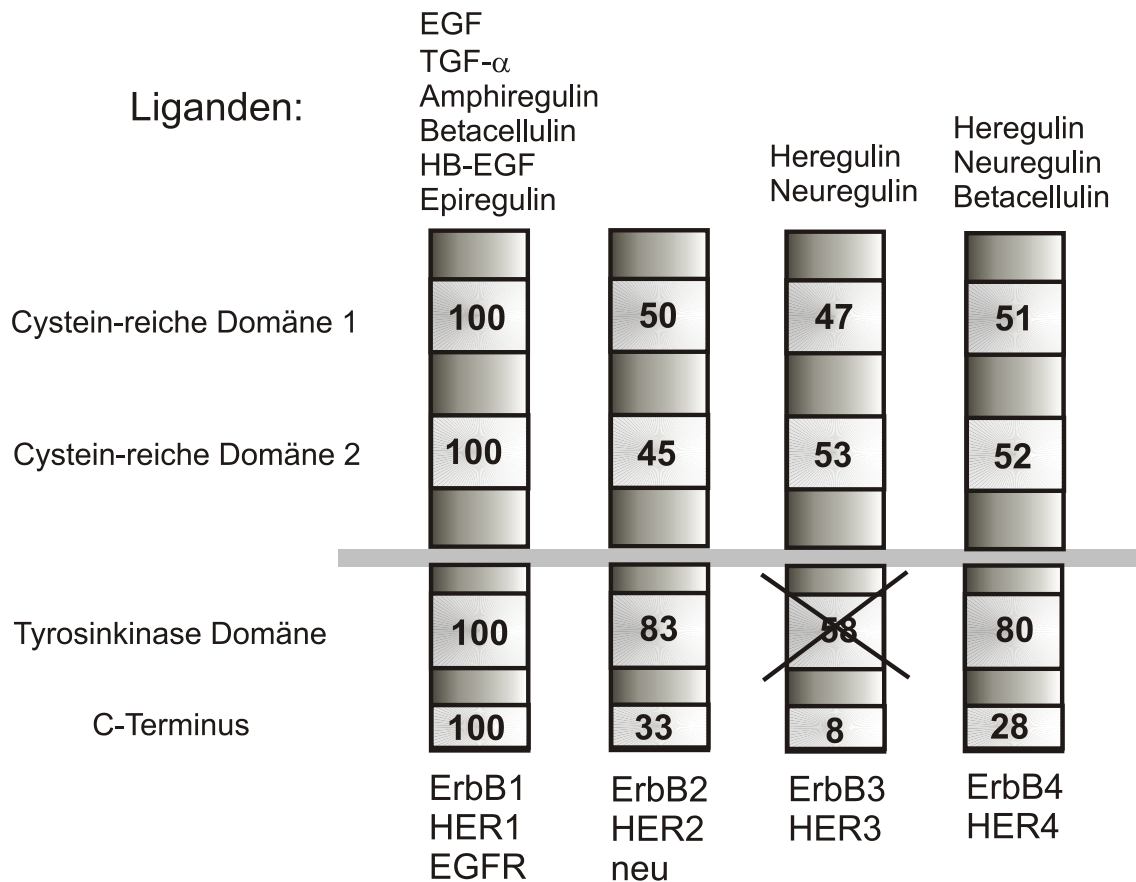


Abbildung 3: Die verschiedenen EGF-Rezeptor-Klassen (Darstellung modifiziert nach (35)). Schematische Darstellung der ErbB-Familienmitglieder sowie deren Liganden. Die angegebenen Zahlen stellen den Grad der Homologie bezogen auf den ErbB1 Rezeptor dar. Mit Ausnahme des Kinase-defizienten ErbB3 besteht eine starke Homologie zwischen den Domänen.

Die EGFR-Familie besteht aus vier verschiedenen Klassen mit einer starken Homologie in der intrazellulären Tyrosinkinase Domäne. Ein Target der vorliegenden Arbeit ist der HER1/ErbB1/EGF-Rezeptor.

1.7.2. EGFR-Blockade mittels Cetuximab (C225)

Derzeit laufen klinische Studien mit dem Inhibitor der extrazellulären Heterodimerisierung des EGF-Rezeptors, C225 (Cetuximab, Erbitux®).

C225 ist ein humanisierter chimärer Maus IgG1 Antikörper gegen EGFR mit einem Molekulargewicht von etwa 154 kDa. Dieser neuartige Antikörper wurde

erstmalig bei Plattenepithelkarzinom-Zelllinien des Kopf-Hals-Bereichs eingesetzt, welche den EGF-Rezeptor überexprimierten (13). Mit C225 konnten hier erhöhte Apoptoseraten erzielt werden, außerdem wurden Wachstumsinhibition und G1-Arrest-Phänomene beobachtet (13, 38).

Es konnte *in vitro* bei einigen Karzinom-Zelllinien gezeigt werden, dass C225 einen hemmenden Einfluss auf den PI3K-Signalweg besitzt (39).

Wenig später wurden Phase I Studien durchgeführt für das metastasierte kolorektale Karzinom. Der Erfolg der Therapie führte schließlich zur Zulassung als Zweitlinien-Therapie beim Irinotecan-refraktären kolorektalen Karzinom.

Präklinische Daten zeigten den Erfolg von C225 in Kombination mit Bestrahlung unter besonderer Berücksichtigung fraktionierter Schemata, was u. a. die lokale Kontrolle anbelangte und sich auf Reoxygenierung sowie Repopulation zurückführen ließ (44, 45).

Einige Gruppen testeten auch den am intrazellulären Rezeptor ansetzenden Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib (Iressa[®]), der *in vitro* pro-apoptotische Effekte zeigte und im Xenograft-Modell zu einer Wachstumsinhibition des Tumors führte (10).

Ein Nachteil der intrazellulär wirkenden Tyrosinkinase-Inhibitoren ist jedoch, dass diese bei bestimmten Mutationen der intrazellulären Domäne versagen, was beispielsweise auch für Gefitinib gezeigt werden konnte (51, 63).

1.8. Klassische Zytotoxizität

1.8.1. Cisplatin

Das zu den klassischen Zytostatika gehörende Chemotherapeutikum Cisplatin übt seinen anti-proliferativen Effekt hauptsächlich durch DNA-Vernetzung und den daraus resultierenden Funktionsverlust der DNA aus (Strukturformel siehe **Abbildung 4**). In seinem Zentrum ist ein Platinatom komplex gebunden. Cisplatin wird als Aqua-Cisplatin-Komplex aktiviert und greift am DNA-Strang bevorzugt an den Basen Adenin und Guanin an, wodurch es zu Intra- und Inter-DNA-Quervernetzungen kommt.

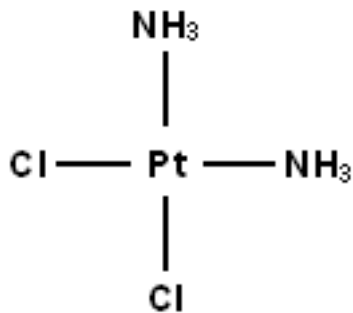


Abbildung 4: Strukturformel von Cisplatin.

Zudem kann Cisplatin Punktmutationen auslösen und führt zur Hemmung der DNA-Reparatur sowie der Telomeraseaktivität, was auch zur Apoptose-Induktion führen kann.

An Cytoplasten (enukleierten Zellen) konnte gezeigt werden, dass durch Cisplatin apoptotische Signalwege ohne DNA-Schädigung aktiviert werden können (52).

Die Einsatzgebiete sind vielfältig und reichen von Lungenkrebs (88), kolorektalem Karzinom (70), Ösophagus-Karzinom (15) über das Analkarzinom (8, 28) bis hin zu Kopf-Hals-Tumoren (68).

1.9. Klonogener Zelltod

Hauptziel der Strahlentherapie maligner solider Tumoren ist eine maximale Zerstörung des Tumors bei weitestgehender Schonung des Normalgewebes, was in dieser Form erstmals von Holthusen 1936 formuliert wurde (75).

Die Wirkung der Strahlentherapie bei malignen Erkrankungen basiert nach klassischer Ansicht auf dem reproduktiven Zelltod, verursacht durch Chromosomenaberrationen nach DNA-Schädigung.

Relevant für die Frage der Heilung ist, ob Tumorstammzellen die Behandlung überlebt haben. Zur Beantwortung dieser Frage und zur Evaluation möglicher

Therapie-Modalitäten wurde ein in vitro Assay entwickelt, der einen wichtigen Anhaltspunkt für die Beantwortung der klinischen Fragestellung bietet.

Dafür definiert man klonogene Zellen als solche, die unter bestimmten Umweltbedingungen in Zellkultur Kolonien von über 50 Zellen bilden. Diese Zahl kommt dadurch zustande, dass man 5 – 6 Zellteilungen als kritische Größe betrachtet und subletal beschädigte Zellen in der Kalkulation berücksichtigt (86).

Vergleicht man die Anzahl der Kolonien, die sich nach einer bestimmten Zeit mit fest definierter Ausgangszellzahl gebildet haben (das Verhältnis wird als „Plating Efficiency“ bezeichnet), mit einer unbehandelten Kontrolle, so kann man die „Surviving Fraction“ bestimmen. Trägt man diese semilogarithmisch auf, erhält man für alleinige Bestrahlung eine typische linear-quadratische Überlebenskurve, die eine Schulter besitzt, welche vom Zelltyp abhängt (bzw. dem bestrahlten Gewebe).

1.10. Fragestellung

Neue Konzepte in der Radioonkologie beruhen darauf, dass Bestrahlung verbunden mit molekular zielgerichteten Ansätzen synergistische Effekte erzielen kann. Bis jetzt wurden jedoch hauptsächlich Zweifachkombinationen betrachtet; aufgrund präexistenter Resistenzmechanismen erscheint aber eine Kombination von mehr als zwei Modalitäten sinnvoll zu sein, um den therapeutischen Effekt noch weiter zu verstärken. Dies kann einerseits durch gemeinsame Endstrecken, andererseits auch durch nur partiell überlappende Signalwege erreicht werden (5, 7).

Bisher ist bekannt, dass durch Bestrahlung alleine ein zytotoxischer Effekt zu erzielen ist, der jedoch nicht spezifisch für das Tumorgewebe ist.

Durch Kombination von Bestrahlung mit C225 konnte in früheren Arbeiten eine Verbesserung der Therapie erreicht werden (12).

Im Falle von C225 wurde vermutet, dass eine erhöhte Apoptoserate für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, was Folge von Interferenz mit Überlebens-Signalwegen oder verzögerter Reparatur der Doppelstrangbrüche sein könnte (25). Daher scheint C225 direkt die Sensitivität von klonogenen Tumorzellen gegenüber Bestrahlung zu erhöhen.

Außerdem konnten wir und andere zeigen, dass Bestrahlung Tumorzellen gegenüber dem Effekt weiterer zielgerichteter Agenzien sensitivieren kann wie beispielsweise TRAIL (4, 7, 55). Hierfür konnte unsere Arbeitsgruppe in vitro und in Tierexperimenten (Xenograft-Modell) zeigen, dass durch die simultane Behandlung mittels Bestrahlung und Gabe von Mapa-/Lexatumumab synergistische Effekte zu erzielen waren (54, 55).

Als Arbeitshypothese galt es daher zu prüfen, ob die Kombination der drei nicht kreuz-resistenten und sogar positiv interagierenden Behandlungsmodalitäten Bestrahlung, TRAIL sowie EGF-Rezeptor-Blockade von hohem Wert für die Krebstherapie sein würde.

Des Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern auch die Dreifachkombination nur einer zielgerichteten Substanz (TRAIL) mit einer klassischen Cisplatin-basierten Radiochemotherapie eine Verbesserung der Strahlentherapie in vitro bedeuten könnte.

2. Material

2.1. Chemikalien

BSA (10 µg/µl)	New England BioLabs
Gel 30 (30%-ige AA/BisAA-Lösung, 37,5:1)	Roth
Hoechst 33342	Calbiochem
Ponceau-S-Lösung	Sigma
Propidiumiodid	Calbiochem
Proteinmarker für SDS-PAGE	Fermentas
SDS-Laufpuffer	Roth

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Steinheim) oder Roth (Karlsruhe) bezogen, sofern nicht anders angegeben.

2.2. Puffer und Lösungen

PBS:	8,0 g/l NaCl 1,5 g/l Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ pH 7,4-7,6
SDS-Probenpuffer:	2 ml Glycerin 2 ml SDS, 10 % 0,025 g Bromphenolblau 2,5 ml Sammelpuffer ad 10 ml bidest. Wasser
SDS-Sammelpuffer:	60,6 g/l Tris 0,4 % (w/v) SDS auf pH 6,8 mit HCl einstellen

SDS-Trennpuffer:	18,17 g/l Tris 0,4 % (w/v) SDS auf pH 8,8 mit HCl einstellen
TBS:	150 mM NaCl 10 mM Tris ad 1000 ml dest. Wasser pH 8,0
TBS-Tween:	TBS + 0,05 % (v/v) Tween
Transferpuffer/Westernblot:	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Methanol pH 8,3
CST-Lysepuffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol 50 mM DTT 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

2.3. Western-Blot

2 Trenn-Gele	8 %	10 %	12 %	14 %
Trennpuffer	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Wasser	14,5 ml	12,5 ml	10,5 ml	8,5 ml
Gel 30	8 ml	10 ml	12 ml	14 ml
APS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
Temed	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
20 % SDS	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

Sammelgel	2 Gele (6 %)
Sammelpuffer	1,75 ml
Wasser	3,75 ml
Gel 30	1,5 ml
APS	70 µl
Temed	7 µl

2.4. Zellkultur

DMSO (für Zellkultur)	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Life Technologies
RPMI 1640 (Nährmedium)	Gibco, Life Technologies
McCoy's 5 A (Nährmedium)	Gibco, Life Technologies
MEM (Nährmedium)	Gibco, Life Technologies
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml, 10.000 µg/ml)	Biochrom-Seromed

2.5. Antikörper und Liganden

2.5.1. Antikörper zur Westernblotanalyse

rabbit anti-p-Akt (Ser473), 1:1000	Cell Signaling
rabbit anti-Akt, 1:1000	Cell Signaling
mouse β-Actin, 1:5000	Sigma

Sekundärantikörper

anti-mouse, HRP-konjugiert	Amersham Biosciences
anti-rabbit, HRP-konjugiert	Amersham Biosciences

FACS-Analysen

R-Phycoerythrin goat anti-mouse IgG	dianova, Hamburg
humanes IgG Serum	Sigma, Steinheim

2.6. Medikamente

C225 (Cetuximab, Erbitux [®])	Merck, Darmstadt
HGS-ETR1/-2	Human Genome Sciences, Rockville, Kalifornien, USA

2.7. Zellen

Die kolorektale Karzinom-Zelllinie Colo 205 und die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie FaDu (Karzinom des Hypopharynx, als Modellsystem für Kopf-Hals-Tumoren) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda, MD, USA bezogen.

Das Bax-Modellsystem bestehend aus der kolorektalen Zelllinie HCT116 Bax wt bzw. HCT116 Bax k.o. (Bax^{-/-}) wurde uns freundlicherweise von Peter T. Daniel, HU Berlin zur Verfügung gestellt (93).

2.8. PCR

Die benötigten Reagenzien für den Mykoplasmen-Test entstammen dem QIA Amp DNA Mini Kit. Wir verwendeten zudem die SAWADY Taq-DNA-Polymerase (Fa. PeqLab, Erlangen).

Für ein PCR-Volumen von 50 µl mit 1 µl DNA wurde folgender Mastermix hergestellt:

- 5 µl 10 x PCR Puffer S (+ KCl)
- 10 µl 5 x Enhancer Solution
- 2 µl 25mM MgCl₂
- 8 µl dNTP Mix
- 1 µl Primer P1 (~ 300 ng/µl)
- 1 µl Primer P4 (~ 300 ng/µl)
- 1,25 U Taq Polymerase (= 0,25 µl)
- 21,75 µl H₂O

2.9. Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	Greiner
Filterpapier Whatman 3 MM	Roth
Kopierfolien	Tartan
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham Biosciences
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
Röntgenfilm	Amersham Biosciences
15 ml/50 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner

2.10. Geräte

Bestrahlungsgerät	LINAC 6 MV, Firma Elekta
FACS Calibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Schüttler	Biometra

SDS-Gelelektrophoresekammer	Biometra
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Rotanta RPC Laborzentrifuge	Hettich
PCR Mastercycler Personal	Eppendorf

Mikroskope:

Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena
Konfokales Laserscan Mikroskop	Leica TCS NT

2.11. Software

Für die meisten Auswertungen wurde Microsoft Excel[®] 2000 verwendet. Statistische Berechnungen wurden entweder mit Mathematica 5.2[®], Wolfram Research (Friedrichsdorf, Deutschland) oder mit den Software-Paketen GraphPad InStat Version 3.00 sowie GraphPad Prism 3, San Diego, USA durchgeführt.

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Zell-Kultivierung

Alle verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ unter Wasserdampfsättigung kultiviert. Die im Folgenden beschriebenen Schritte gelten vor allem für adhärente Zelllinien wie die in den Versuchen verwendeten Colo 205, FaDu und HCT116.

3.1.2. Mediumwechsel

Zuerst wurden Nährlösung und PBS angewärmt (37 °C), die Zellkulturflasche als nächstes unter der Sterilbank abgesaugt und das Medium verworfen.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde dieses ebenfalls verworfen und erneut Medium supplementiert.

3.1.3. Passagierung der Zellen

Die ersten Schritte erfolgten analog zum Mediumwechsel; bevor aber das neue Medium dazugegeben wurde, wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit Trypsin-Lösung abgelöst.

Nach einigen Minuten wurde die Zellsuspension abgesaugt und je nach Versuch bei 25 °C für 4 min mit 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet beispielsweise in 5 ml Medium resuspendiert und anschließend die Zellzahl bestimmt, mittels derer die neue Aussaat geplant werden konnte.

Bei einigen Versuchen war es notwendig, die Zellen besonders schonend vom Flaschenboden zu entfernen. Dafür wurde die nicht-enzymatische CDS-Lösung verwendet (Cell Dissociation Solution, Sigma).

3.1.4. Bestimmung der Zellzahl (Neubauer-Zählkammer)

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Volumeneinheit einer Zellsuspension wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet, der ein Deckglas aufliegt.

Die Kammer enthält (bei den meisten Modellen) jeweils zwei Zählkammern, die wiederum je vier Großquadrate enthalten, welche wiederum in 16 Kleinquadrate aufgeteilt sind (siehe dazu **Abbildung 5**).

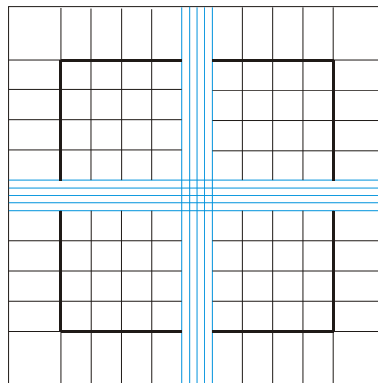


Abbildung 5: Die vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer. Es werden vier Großquadrate ausgezählt, über die man mittelt; dieser Mittelwert dient als Grundlage zur Bestimmung der Zellzahl/ml.

Ein kleiner Tropfen der Zellsuspension wird in die Neubauer-Kammer pipettiert und verteilt sich auf diese. Man zählt vier Großquadrate aus, bestimmt den Mittelwert μ und setzt diesen in folgende Formel ein (der Umrechnungsfaktor folgt aus $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ }\mu\text{l}$):

$$Z = \mu \times 10^4 \text{ [Zellen/ml]}$$

Um zu differenzieren, ob es sich um intakte oder nekrotische Zellen handelt, kann der Farbstoff Trypanblau verwendet werden; die nekrotischen Zellen werden blau angefärbt, da der Farbstoff aufgrund der nicht mehr intakten Membran in sie eindringen kann.

3.2. Mykoplasmen-Detektion in Zellkulturen mittels PCR

Zur Sicherstellung einer Mykoplasmen-freien Zellkultur wurde nach jedem Auftauen einer neuen Zell-Passage eine Mykoplasmen-PCR durchgeführt entsprechend den Protokollen der Firmen Qiagen und PeqLab.

3.3. Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einem 6 MV Elekta Linearbeschleuniger (siehe **Abbildung 6**).

Die Dosisrate der Photonenstrahlung pro Zeiteinheit betrug bei allen Experimenten 4 Gy/min.

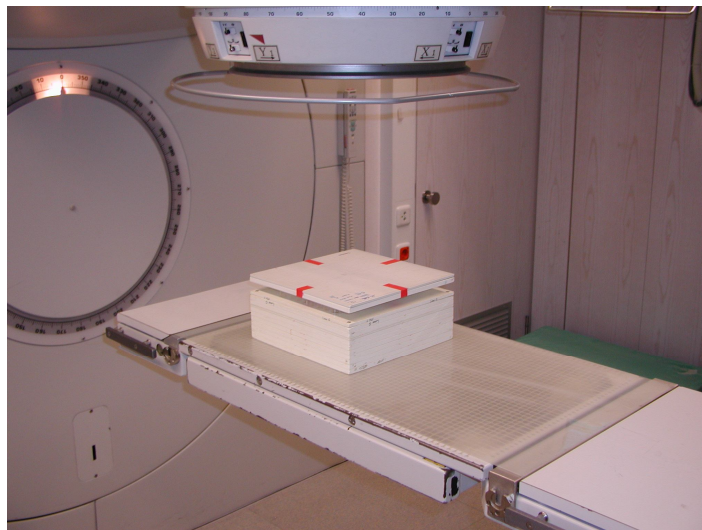


Abbildung 6: Bestrahlung von 24-Well-Platten mit dem 6 MV Elekta Linearbeschleuniger. Die oberste Platte stellt sicher, dass bei einem „Fokus-Haut-Abstand“ von 100 cm die 24-Well-Platten an der Stelle des Dosismaximums positioniert sind (Aufbaueffekt der Photonenstrahlung).

3.4. Fluoreszenzmikroskopie und Hoechst-Analysen

3.4.1. Prinzip

Für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche wurde ein Axiovert 25 (Carl Zeiss, Jena) verwendet.

Die DNA-Färbung mit dem membrangängigen Farbstoff Hoechst 33342 ist eine anschauliche Methode zur Darstellung und Evaluierung apoptotisch veränderter Zellkerne, da diese durch die Kernfragmentierung prominent erscheinen.

Nach Anregung des mit der DNA interkalierenden Farbstoffs mit einer Quecksilberlampe kann die Fluoreszenz unter Verwendung eines 380 nm-Filters detektiert werden. Die Dokumentation erfolgte mittels einer verstärkenden CCD-Videokamera (Axiolab MRM).

Die zusätzliche Färbung mittels Propidiumjodid (PI) gibt weitere Aufschlüsse über die Art des Zelltodes und erleichtert die Differenzierung zwischen Nekrose und Apoptose.

3.4.2. Unterscheidungskriterien

Mittels der Hoechst-PI-Färbung kann man anhand der Farbe und Morphologie des Zellkerns auf die Form des Zelltodes schließen.

Man unterscheidet nach (29) grob folgende Formen (abgesehen von den lebendigen Zellen mit homogen erscheinendem Zellkern):

- *Klassische frühe Apoptose*: Die Zelle enthält mehr als zwei DNA-Klumpen und fluoresziert blau (nur Anfärbung durch Hoechst, PI ist ausgeschlossen).
- *Klassische späte Apoptose*: Die Zelle enthält mehr als zwei DNA-Klumpen und fluoresziert rötlich; aufgrund der bereits eingetretenen Membranschädigung kann PI in die Zelle eindringen und so in die DNA interkalieren.
- *Nekrose*: Man erkennt einen rot fluoreszierenden, meist homogen berandeten Zellkern (die Zelle ist tot, der Kern jedoch intakt).

- *Hülle*: Zu sehen ist ein rötlicher Schatten, es ist kein Zellkern mehr vorhanden; dieses Phänomen tritt (wenn überhaupt) meist erst sehr spät nach Behandlung auf.

3.4.3. Vorbereitung

Zur Vorbereitung wurden Zellen in 24-well-Platten in Doppelkontrollen ausgesät (pro Well 0,5 ml Medium). Diese wurden i. d. R. min. 36 h kultiviert, bevor sie behandelt/bestraht wurden.

Entsprechend den Erfahrungswerten wurde eine Zellzahl von etwa 50.000 Zellen/ml angestrebt (für adhärente Zellen).

3.4.4. Herstellung der Färbelösung

Hoechst 33342 sollte 1:1000 verdünnt werden, PI 1:2000. Daher stellt man sich am besten eine Färbelösung her, die die beiden Farbstoffe in einer Verdünnung 1 + 2 enthält. Durch Zugabe von jeweils 5 µl in jedes Well hat man bereits eine Verdünnung von 1:100 (von kleinen Korrekturen durch das Volumen des Farbstoffs abgesehen). Folglich muss nur noch 1:10 vorverdünnt werden. Eine Färbelösung könnte dann beispielsweise 20 µl Hoechst 33342, 10 µl PI und 170 µl Medium enthalten.

3.4.5. Auszählung

Die Zellen wurden nach der Färbung für 10 – 15 min im Brutschrank inkubiert.

Anschließend erfolgte die manuelle Auszählung mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops, wobei Zellen in Doppelkontrollen (zwei Proben pro Behandlungsart) untersucht und min. drei verschiedene Blickfelder ausgezählt wurden. Die Experimente wurden mit zwei weiteren Passagen derselben Zelllinie durchgeführt.

3.5. FACS-Analysen

3.5.1. FACS-Theorie

FACS bedeutet „Fluorescence activated cell sorting“ und wird häufig synonym zum Begriff Durchflusszytometrie verwendet. Sie stellt eine Methode dar,

Einzelzellen in Suspension statistisch aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften zu analysieren. Beispielsweise dient das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) als Maß für die Zellgröße, der SSC (Side Scatter) ist hingegen ein Maß für die Granularität der Zellen.

Die in Lösung befindlichen Zellen werden von einer Kapillare angesaugt und passieren dann im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Aus der Emission von Streulicht/von Fluoreszenzimpulsen kann man verschiedene Eigenschaften der Zellen ableiten.

3.5.2. EGF-Rezeptor-Oberflächenexpression

Um die EGFR-Expression auf den Oberflächen der in den Experimenten verwendeten Zellsysteme vorab zu prüfen, wurde diese mittels C225 als Primär-Antikörper (Cetuximab, Erbitux[®] von Merck) und RPE-konjugiertem Zweit-Antikörper (anti human RPE, Dianova, Hamburg) bestimmt. Vorab wurden folgende Ansätze festgelegt:

- Unmarkierte Kontrolle
- Unspezifische IgG-Kontrolle (humanes IgG) mit 2. Antikörper (AK)
- 1. + 2. AK

Die Zellen wurden min. 36 h kultiviert, pro Versuchsansatz wurde eine Zellzahl von 500.000 Zellen angestrebt.

Die Zellen wurden mit CDS (Cell Dissociation Solution, Sigma) abgelöst, welche nicht-enzymatisch wirkt und so vor Schädigung der Rezeptoren schützt. Die Lösungen wurden im Anschluss mit Medium abgestoppt.

Die Zellen wurden dann in Medium resuspendiert, damit auch tote Zellen mit erfasst werden konnten. Durch die Resuspension sollte zudem verhindert werden, dass sich zu große Zellklumpen bilden. Die Suspensionen wurden dann in 50 ml Röhren gesammelt.

Nach Zentrifugieren der Röhren für 4 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm wurde der Überstand verworfen und eine gewisse Menge Medium hinzugeben.

Etwa 500.000 Zellen wurden auf je ein Eppendorf-Cup verteilt, diese wurden bei Raumtemperatur, 1200 rpm und für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 100 µl 5 %FCS/PBS und dem darin gelösten Primär-Antikörper resuspendiert. Aus Erfahrungswerten wählten wir eine Verdünnung von 1:200, um eine Arbeitskonzentration von 10 µg/ml zu erreichen.

Als nächstes wurden die Zellen gewaschen: Bei dreimaligem Abzentrifugieren wurde der Überstand jedes Mal abgesaugt, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und zuletzt der Zweit-Antikörper 1:100 in 5 %FCS/PBS verdünnt. Zum Waschen der Zellen wurde das Pellet in 300 µl dieser Lösung resuspendiert, die Zellen wurden erneut mit 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und in 500 µl FACS-Flow aufgenommen. Danach erfolgte unmittelbar die Messung.

3.6. Western-Blotting

3.6.1. Lysate

Um intrazelluläre Proteine untersuchen zu können, mussten die Zellen zuerst lysiert werden.

Die Zellen wurden abtrypsiniert und zu den Überständen (Medium, PBS) gegeben, dann 4 min bei 1200 rpm zentrifugiert; nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt, woraus ein Teil zur Zellzahlbestimmung entnommen wurde. Danach wurde das Cup 3 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1x CST-Puffer resuspendiert (hierbei wurden etwa 100 µl Puffer pro 10⁶ Zellen verwendet). Für weitere 10 min wurde die Probe in den Heizblock gestellt (99 °C) und danach bei -20 °C eingefroren.

3.6.2. Befüllung der Kammer

Die Kammer (siehe **Abbildung 7**) wurde unten und oben mit Laufpuffer befüllt (1x SDS-Laufpuffer), das Gel eingesetzt und die Taschen mit Laufpuffer freigespritzt.

3.6.3. Gel beladen

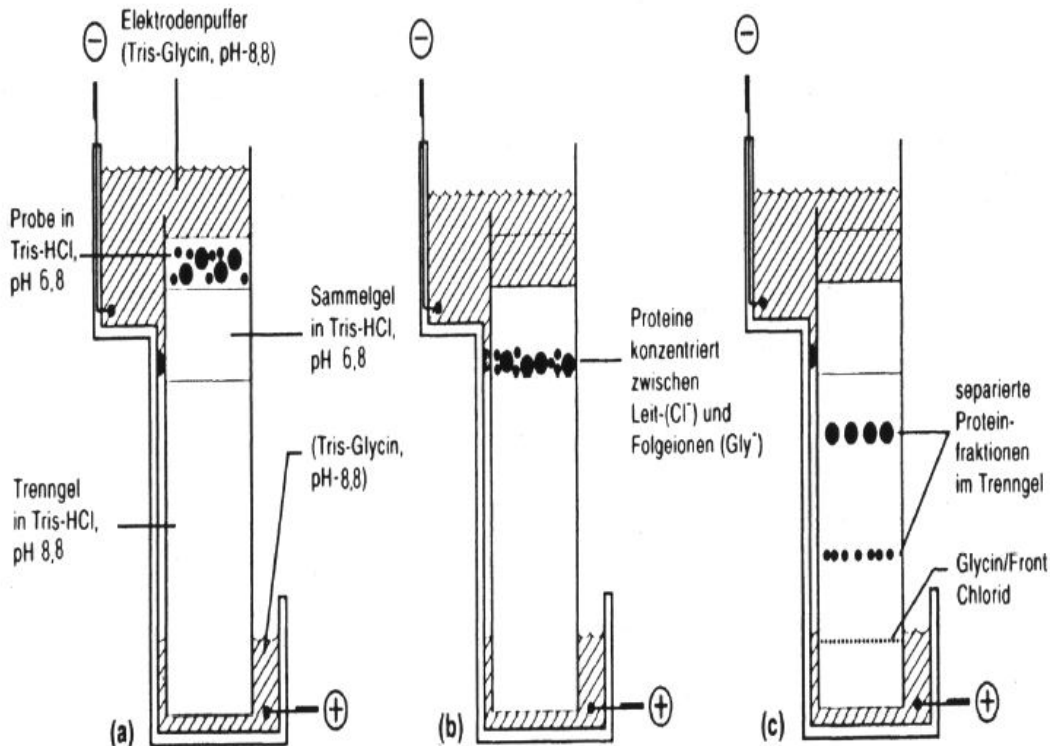


Abbildung 7: Western-Blotting-Apparatur von der Seite. Gezeigt wird das Prinzip der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Quelle: (76).

Erste und letzte Tasche wurden mit 5 µl 3x CST-Puffer beladen, dann wurden Marker und Proben (jeweils ca. 10 µl) in die verbliebenen Taschen pipettiert.

Für das Sammelgel wurden als Einstellung 60 V/80 V, 23 mA für ca. 45 min gewählt, je nachdem, ob sich der Marker in dieser Zeit bereits demarkiert hatte; im Trenngel wurde dann für 2h eine Spannung von 160 V gewählt.

3.6.4. Blotting

Das Gel wurde aus den Glasplatten entfernt, in Transferpuffer ohne MetOH gelegt, dann wurde die Lochplatte befüllt und verschlossen wie in **Abbildung 8** gezeigt.

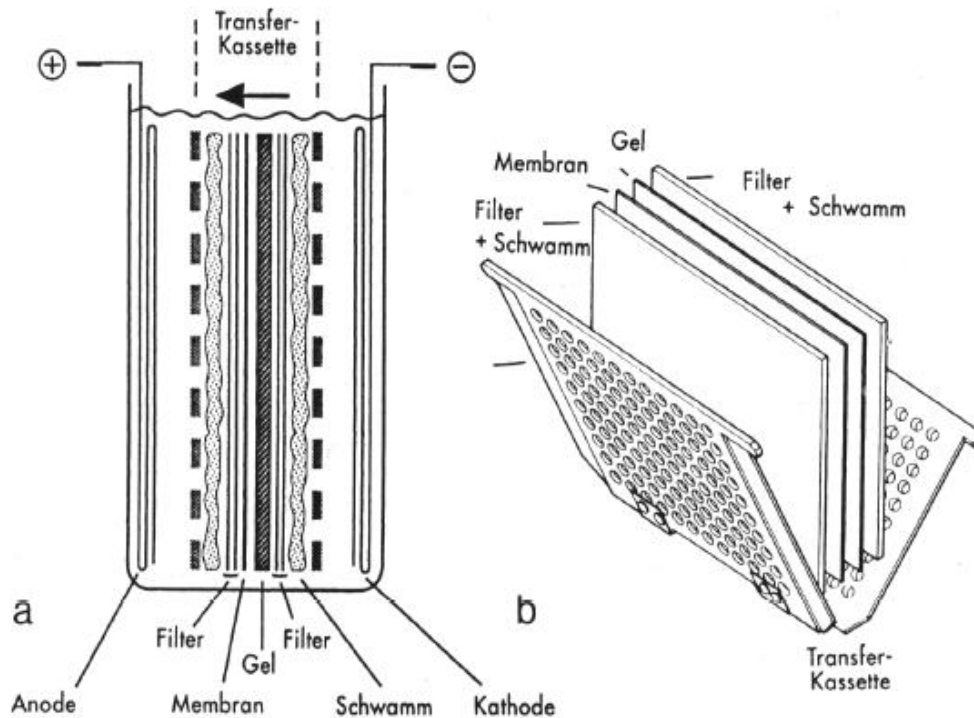


Abbildung 8: a Blotaufbau eines Tankblots. b Schichtung von Schwämmen, Filtern und der Membran innerhalb der Lochplatte. Quelle: (76).

Im Kühlhaus wurde der Transferpuffer in die Tankblot-Apparatur eingefüllt und danach die Lochplatte samt Gel in die Blotkammer eingebaut.

Für ein 12 %-Gel waren 80 V für ca. 60 min ausreichend für den Transfer (0,5-0,8 mA).

3.6.5. Blocken

Nach dem Transfer wurde die Membran aus der Kammer genommen, kurz in TBS-T geschwenkt und je nach spezifischer AK-Vorschrift geblockt. Meistens wurde 1 h mit 30 ml 5 % Milch in TBS-T gewählt.

3.6.6. Inkubation mit dem Primär-Antikörper

Für eine Membran wurden 3 – 4 ml Lösung verwendet (5 % Milch oder 5 % BSA, je nach AK), der AK wurde in passender Verdünnung (meist 1:1000) in Lösung gegeben. Die Membran wurde dann Luftblasen-frei mit der AK-Lösung in Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht im Kühlraum auf einem Schüttler gelagert (4 °C).

3.6.7. Inkubation mit dem Zweit-Antikörper

Die Behandlung erfolgte analog zu der des Primär-Antikörpers, nur wurde meist eine Verdünnung von 1:2000 gewählt. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, dann mehrfach in TBS-T gewaschen (3 x 5 min, 2 x 10 min).

3.6.8. Detektion mit ECL-Kit

Die ECL-Lösungen wurden bei Raumtemperatur kurz angewärmt, das Mischungsverhältnis der beiden Lösungen betrug 1:1. Für eine Membran wurden etwa 2 ml ECL-Lösung verwendet, diese wurde 1 min inkubiert und anschließend zwischen Overheadfolien in eine Filmkammer gelegt. Die Entwicklungsdauer für die Filme betrug meistens 1/5/10/30/60 min oder erfolgte über Nacht.

3.7. Koloniebildung

In Abwandlung zum herkömmlichen Koloniebildungs-Assay (kurz KoBi) wurde das Verfahren des „Delayed Plating“ verwendet. Dieses wird aus zwei Hauptgründen eingesetzt:

- Erfahrung: Kommen Substanzen zum Einsatz, die eine lange biologische Halbwertszeit besitzen, können sich nach dem herkömmlichen Verfahren keine Kolonien bilden, da nach Behandlung

kein Mediumwechsel mehr vorgenommen wird und die Substanz nach mehreren Tagen Inkubationszeit alle klonogenen Zellen wirksam abtöten kann.

- Um die verwendete Substanz zu sparen (z. B. TRAIL)

3.7.1. Ausgangszellzahl und Plating efficiency (PE)

In Abhängigkeit von der Wachstumskinetik wurden in jeweils einer 75 cm² Zellkulturflasche z. B. 3 Mio., 1 Mio. und 300.000 Zellen ausgesät (angestrebtes Ziel war in allen Fällen: 5 Mio. Zellen, 1,3 Mio. Zellen, 500.000 Zellen nach 36 h). Es wurden 10 ml Medium mit FCS und P/S supplementiert, nach 36 h fand ein Mediumwechsel statt. Für die höchste Zellzahl wurden 10 ml Medium verwendet, für die anderen Zellzahlen 5 ml.

Danach wurden die Zellen behandelt mit Dreifach-Kombinationstherapien oder mit der Antikörper-Kombination; als Bestrahlungsdosen wurden 2, 4, 6 und 8 Gy verwendet. Nach weiteren 48 h erfolgt die Ablösung mit CDS (Cell Dissociation Solution).

Anschließend wurde noch 2 x mit je 10 ml PBS gewaschen (Abzentrifugieren und Wiederaufnahme in PBS) und das Pellet danach in 10 ml frischem Medium aufgenommen.

3.7.2. Verdünnung

Da beim „Delayed Plating“-Verfahren auf die Ausgangszellzahl normiert wird, war es wichtig, feste Verdünnungsschritte vorzugeben.

Die Aussaat erfolgte schließlich in 6-Well-Platten. Die Ansätze wurden im Brutschrank gelagert, nach 7 Tagen erstmals beurteilt und nach durchschnittlich 10 – 12 Tagen abgestoppt. Die Kolonien wurden mittels 3,7 % Formaldehyd-Lösung und 70 % Ethanol fixiert; die fixierten Zellen wurden mit 0,05 % „Coomassie Blau“ gefärbt.

3.7.3. KoBi-Zählprogramm

Um die Auszählung der Platten zu erleichtern, entstand im Rahmen dieser Arbeit eine Auswertungs-Software, welche in der Programmiersprache Java[®] geschrieben wurde (62).

Das Programm verwendet eingescannte Bilder und erkennt anhand von Größe und Form die tatsächlichen Kolonien.

Dazu ist es notwendig, über drei verschiedene Parameter (Größe, Grauwert und Umgebungsform) eine Eichung vorzunehmen, sodass die mikroskopische Evaluation mit der automatisierten übereinstimmt.

Zur optischen Kontrolle kann man ablesen, welche Kolonien tatsächlich berücksichtigt wurden und welche nicht mehr; dies ist in **Abbildung 9** zu sehen, in der die Arbeitsfläche des Programms dargestellt ist. Der Vergleich zwischen mikroskopischer Zählung (Goldstandard) und PC-Auswertung ergab Abweichungen von < 5 %.

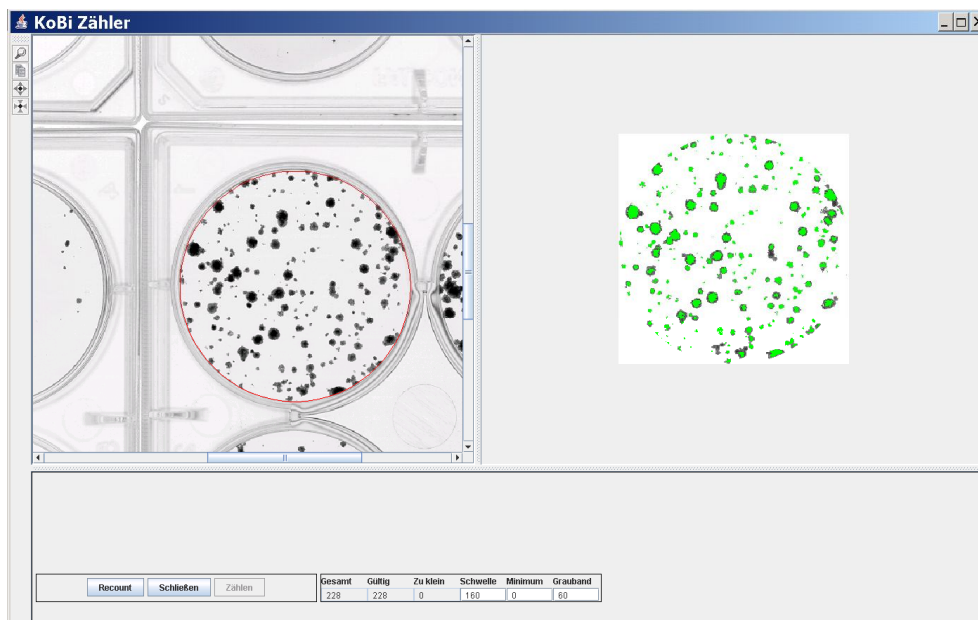


Abbildung 9: Darstellung der Arbeitsfläche des Kobi-Zählprogramms. Im linken Feld kann der zu untersuchende Bereich ausgewählt werden; zur Auszählung stehen mehrere Parameter zur Verfügung („Schwelle“, „Minimum“ und „Grauband“), die so adjustiert werden können, dass die Ergebnisse mit der manuellen Zählung übereinstimmen.

3.8. Allgemeine Statistik

Zellkultur-Experimente wurden triplikativ durchgeführt, d. h. min. drei Mal und unabhängig voneinander.

Für statistische Auswertungen wurden u. a. gepaarte/ungepaarte t-Tests verwendet, sofern die Annahme einer Normalverteilung gerechtfertigt war und es sich um den Vergleich zweier verschiedener Therapie-Konzepte handelte.

Für die klonogenen Assays wurde eine multivariate Analyse durchgeführt, jedoch war vor der Testung eine logarithmische Transformation der Daten notwendig.

4. Ergebnisse

4.1. Bestimmung der EGFR-Dichte

Um im Vorfeld beurteilen zu können, ob die Krebszellen überhaupt suszeptibel für C225 sein würden, wurde mittels FACS-Analyse die EGF-Rezeptordichte auf den vier verwendeten Krebszelllinien bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 10** dargestellt. Der RPE-konjugierte Farbstoff wurde im Fluoreszenzkanal FL2 gemessen; FaDu zeigt die ausgeprägteste Rechtsverschiebung von allen betrachteten Zelllinien und damit die höchste Rezeptorexpression. Die Bestimmung der TRAIL-Rezeptordichte wurde bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (54).

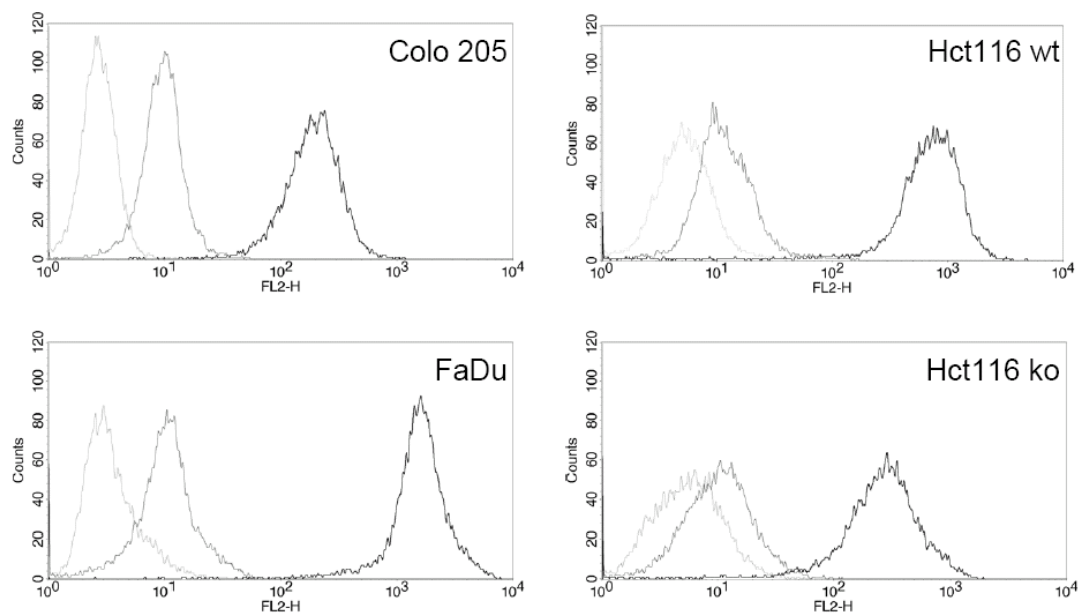


Abbildung 10: EGF-Rezeptordichten für Colo 205, FaDu, HCT116 (Bax) wt und HCT116 Bax^{-/-}. Jeweils v. l. n. r. (hellgraue/grau/dunkelgraue Linie): Nur mit 2. Antikörper markierte Kontrolle, unspezifische IgG-Kontrolle + 2. Antikörper und Probe mit 1. + 2. Antikörper.

Wie in **Abbildung 10** gezeigt, wird das fragliche Therapietarget auf allen Zellsystemen exprimiert.

4.2. Einzelwirkungen der Agenzien

Zu Beginn der Versuche wurden für die Zelllinien Colo 205, FaDu, HCT116 Bax wt Dosis- und Konzentrationsfindungsstudien unter dem Gesichtspunkt der Apoptose-Induktion durchgeführt.

Für die Bestrahlung griffen wir auf Erfahrungswerte zurück; dabei hatten sich insbesondere 2, 5 und 10 Gy bewährt. Für HGS-ETR1/Mapatumumab (für diese Begriffe werden auch die Kurzformen ETR1/mapa verwendet) reichten die Konzentrationen logarithmisch von 1 µg/ml bis 0,001 µg/ml, für HGS-ETR2/Lexatumumab (Kurzformen: ETR2/lexa) von 10 µg/ml bis 0,001 µg/ml.

Um eine Zeitkinetik zu erhalten, wurden jeweils nach 12 h, 24 h, 36 h und 48 h mit Hoechst 33342 fluoreszenzmikroskopisch die Apoptoseraten bestimmt.

Für Erbitux[®] (C225) wählten wir die molaren Konzentrationen 100 nM, 10 nM, 1nM. Dabei war zu beachten, dass C225 nach Herstellerangaben weiße Fäden enthalten kann (herstellungsbedingt), die durch einen 0,20 µm Filter von der Infusionslösung abgetrennt werden mussten.

Tabelle 2: Die Wirkung der einzelnen Agenzien (Apoptose-Induktion) auf die verschiedenen Zelllinien qualitativ ausgedrückt und nur relativ für jede einzelne Zelllinie zu betrachten.

Wirkung auf	Colo 205	FaDu	HCT116 wt
C225	+	+++	+
Mapatumumab	+++	++	++++
Lexatumumab	++++	++++	++
RT	++	+++	+

Die folgende Übersicht gibt diejenigen Konzentrations- bzw. Dosisbereiche wieder, die auch für die Dreifachkombinationen getestet wurden.

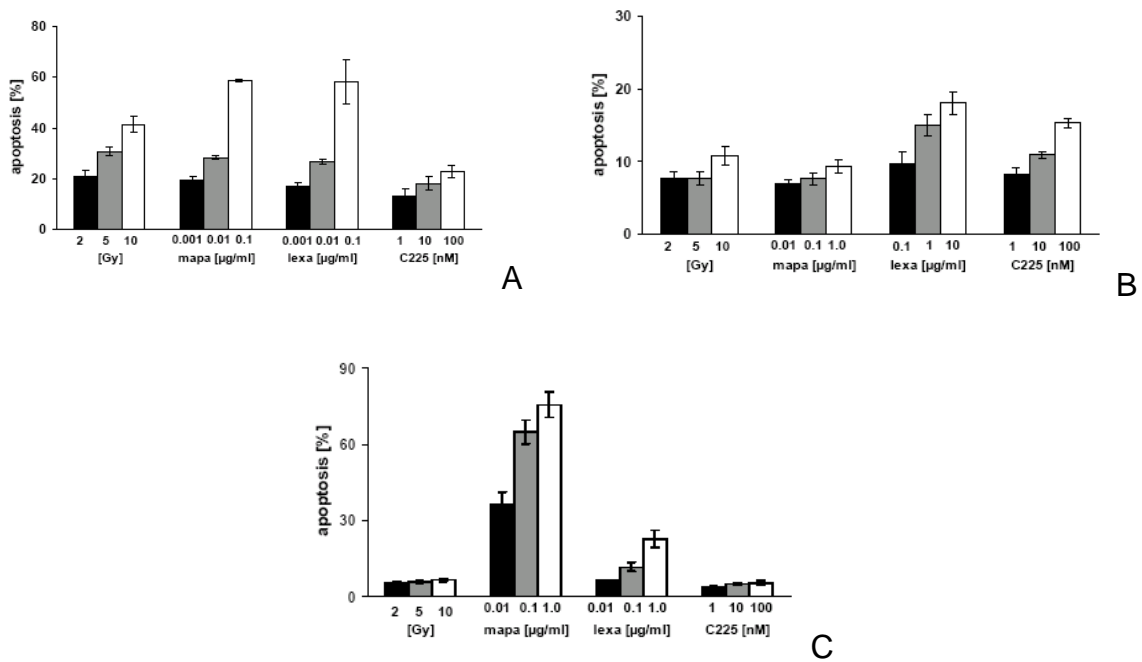


Abbildung 11: Wirkung der einzelnen Modalitäten (XRT, Mapatumumab, Lexatumumab, C225) auf die verschiedenen Zellsysteme unter Verwendung von jeweils drei verschiedenen Dosen/Konzentrationen. A Colo 205 Zellen. B FaDu Zellen, C HCT116 Bax wt Zellen.

Da die maximalen Apoptoseraten 36 h nach Behandlung erreicht wurden, wurden die nachfolgenden Experimente hauptsächlich auf diesen Zeitpunkt beschränkt.

Die betrachteten Zellsysteme zeigten unterschiedlich ausgeprägte Sensitivität auf die verwendeten Stimuli. Beispielsweise war im Falle von HCT116 Bax wt Zellen das Ansprechen auf Mapatumumab deutlich ausgeprägter als für Lexatumumab (**Abbildung 11**).

4.3. Zweifachkombinationen

Ausgehend von den Versuchen zur Einzelwirkung wurden Zweifachkombinationen getestet, um weiteren Aufschluss über die kombinierte Wirkung zu erhalten und für Kombinationstherapien sinnvolle Bestrahlungsdosen zu wählen. In zweiter Linie war dies notwendig, um einen Vergleich zwischen Zweifach- und Dreifachtherapie durchführen zu können.

Exemplarisch sei im Folgenden eine solche Zeitkinetik für die FaDu-Zelllinie dargestellt. Die Versuche wurden für alle Zelllinien triplikat zu den Zeitpunkten 12 h, 24 h, 36 h und 48 h durchgeführt.

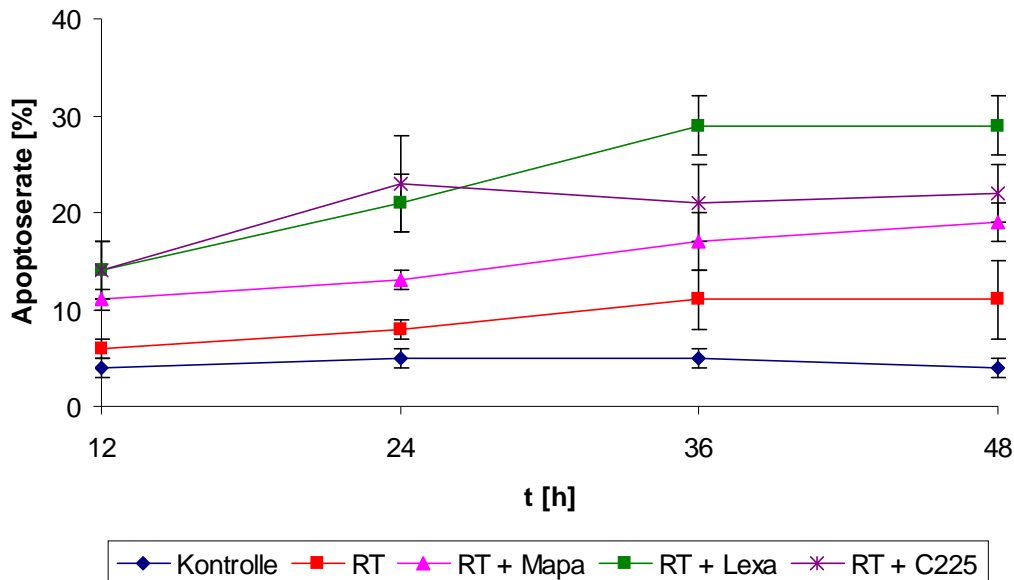


Abbildung 12: Zeitliche Kinetik der Zweifachkombinationen im Vergleich zur Kontrolle und alleiniger Radiotherapie für FaDu Zellen (12 h, 24 h, 36 h, 48 h); nach 36 h ist bereits ein Plateau erreicht. Verwendete Dosen/Konzentrationen: 10 Gy, 1 µg/ml Mapatumumab, 10 µg/ml Lexatumumab, 100 nM C225.

In **Abbildung 12** sind exemplarisch für FaDu bestimmte Zweifachkombinationen (ausgewählte Konzentrationen der Agenzien und bestimmte Strahlendosen) im zeitlichen Verlauf aufgetragen. In Kombination mit den Daten über die Einzelwirkungen konnten mittels dieser Profile die optimalen Zeitpunkte festgelegt werden.

4.4. Dreifachkombinationen

Nachdem mehrere Konzentrationsbereiche getestet und die Wirkung der einzelnen Agenzien in Kombination mit Bestrahlung untersucht wurden, wurden ausgewählte Dreifachkombinationen getestet, die als sinnvolles Sultanschema appliziert werden konnten, wobei ein Auswahlkriterium die suboptimale Wirkung der jeweiligen Einzeltherapie war.

In Colo 205 Zellen wurden nach kombinierter Behandlung mit 5 Gy, 1 nM C225 and 0,001 µg/ml Mapatumumab oder Lexatumumab Apoptoseraten bis zu 62% gemessen, wobei die Einzel-Behandlungen jeweils nacheinander nur 28 %, 13 % und etwa 20 % erreichten.

In FaDu Zellen wurden Apoptoseraten bis zu 26 % nach kombinierter Behandlung mit 5 Gy, 1 nM C225 und 0,01 µg/ml Mapatumumab gemessen, wobei die Einzelbehandlungen nur 8 %, 11 % oder 10 % erreichten. Bei HCT116 Bax wt Zellen war die Variationsbreite in der Zelltodinduktion größer: Während C225 (1 – 100 nM) und Bestrahlung (2 – 10 Gy) Apoptoseraten unter 10 % induzierten, erreichte Mapatumumab Raten von 36 % (0,01 µg/ml) bis zu 75 % (1 µg/ml), Lexatumumab jedoch nur bis zu 23 % mit der höchsten verwendeten Konzentration (1 µg/ml). Jedoch erreichte die Dreifachkombination 5 Gy, 10 nM C225 mit einer geringen Konzentration von Mapatumumab (0,01 µg/ml) eine sehr hohe Apoptoserate von 79 %. 1 µg/ml Lexatumumab kombiniert mit 5 Gy und 1 nM C225 induzierte immerhin 71 % Apoptose.

Um auch nachzuweisen, dass eine Dreifachkombination besser ist als eine Zweifachkombination entsprechender Modalitäten, wurde dies für die genannten Kombinationen in **Abbildung 13** verglichen.

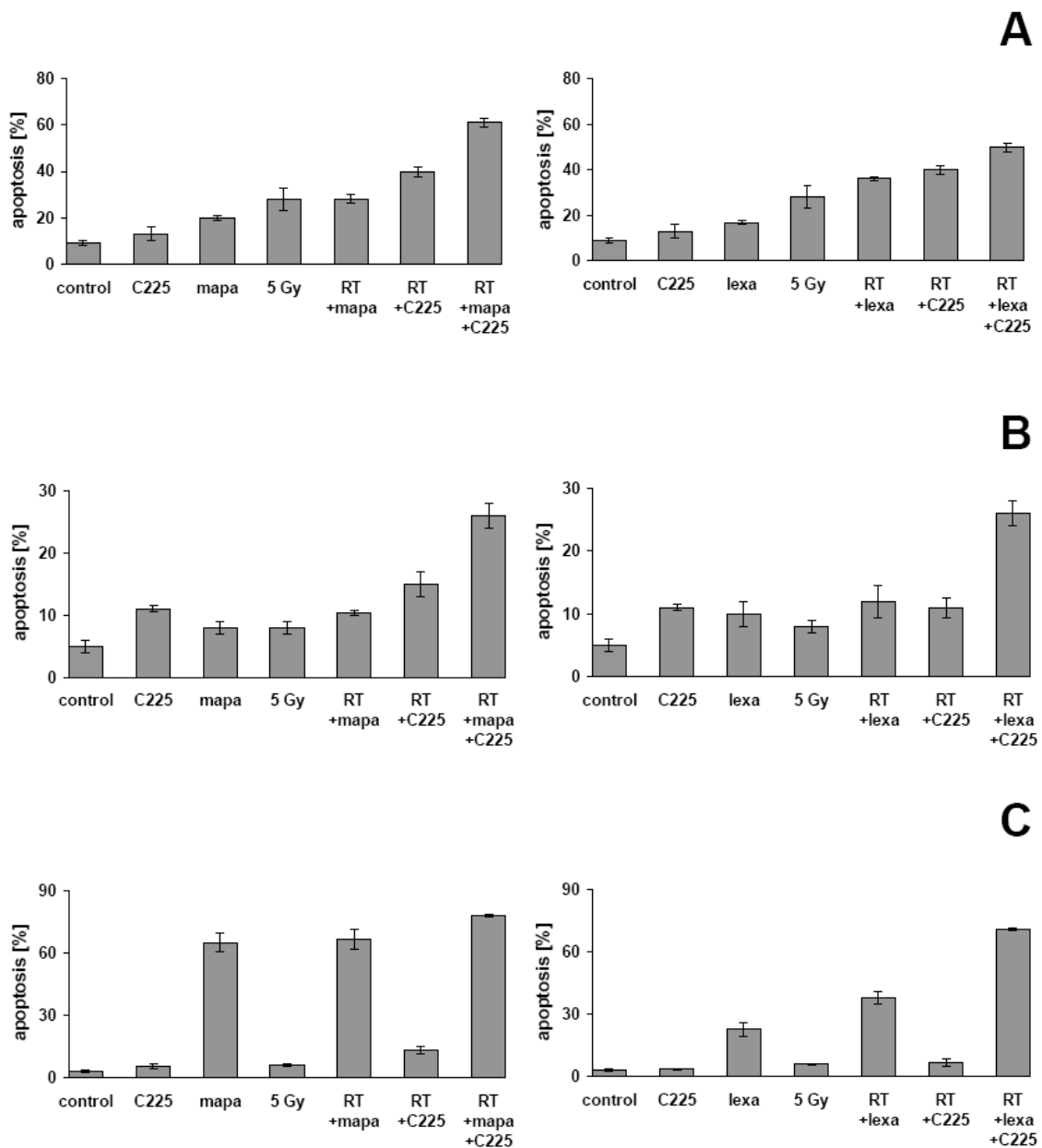


Abbildung 13: Apoptoseraten der Zellen, die mit Zweifach- oder Dreifachkombinationen aus Bestrahlung, Mapatumumab (mapa) und/oder C225 behandelt wurden (linke Spalte), analog in der rechten Spalte die entsprechenden Kombinationen mit Lexatumumab anstelle von Mapatumumab. A Colo 205 Zellen wurden mit 5 Gy, 0,001 µg/ml Mapatumumab oder Lexatumumab und 1 nM C225 behandelt. B FaDu Zellen wurden mit 5 Gy, 0,01 µg/ml Mapatumumab oder 0,1 µg/ml Lexatumumab und 1 nM C225 behandelt. C HCT116 Bax wt Zellen wurden mit 5 Gy, 0,1 µg/ml Mapatumumab und 100 nM C225 bzw. 0,01 µg/ml Lexatumumab und 10 nM C225 behandelt.

4.5. Isobologramm-Analyse

4.5.1. Einführung

In der Vergangenheit wurden verschiedene mathematische Ansätze entwickelt, um den Interaktionsgrad zwischen verschiedenen therapeutischen Modalitäten zu untersuchen. In dieser Hinsicht hatten sich vor etwa 30 Jahren bereits die Isobogramme durchgesetzt und sich als nützliches und beliebtes Mittel erwiesen, da sie neben einer präzisen Analyse eine graphische Darstellung erlaubten (9, 81).

Um zu entscheiden, ob die Kombination von Bestrahlung mit anderen Modalitäten einen wirklichen therapeutischen Vorteil erbringt, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Verfahren entwickelt, welches die Beantwortung dieser Frage für eine Dreifachkombination erlaubt (61).

4.5.2. Theoretischer Hintergrund

Die semantische Definition legt nahe, einen Synergismus als ein Zusammenspiel aus mehreren Einzeleffekten zu sehen, die in der Summe einen größeren Effekt besitzen, als wenn man die reine Summe der Einzeleffekte betrachten würde.

Man behilft sich also damit, einen synergistischen Effekt als supra-additiv zu definieren, wodurch man nur noch gezwungen ist, ein Kriterium für Additivität festzulegen.

Die klassischen Definitionen der Additivität gehen auf Loewe (50) und Bliss (11) zurück. Bliss hat dabei das Modell der „response additivity“ begründet.

Diese beiden Definitionen beruhen nicht nur auf formalen Überlegungen, sondern haben praktische Implikationen (81), welche insbesondere im Bereich der Radioonkologie relevant sind.

„Response-additivity“ setzt statistische Unabhängigkeit der Effekte voraus, was zu einer reinen Addition der Effekte führt.

Die beiden genannten Konzepte sollen durch ein Beispiel verdeutlicht werden (siehe hierzu **Abbildung 14**).

Wenn man für eines der Agenzien eine quadratische Dosis-Wirkungs-Beziehung annimmt (Therapie 1) und eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung für ein „weniger effektives“ Medikament (Therapie 2) und wenn man weiterhin eine Konzentrationseinheit von Therapie 1 benötigt, um 10% des maximalen Effekts zu erhalten und vier Einheiten von Therapie 2 für denselben Effekt, würde folglich eine Kombination (im response-additiven Fall) 20 % ergeben. Im Falle der Loewe-Additivität würde das hingegen zu folgender Überlegung führen: Da Therapie 2 das gleiche Ergebnis wie eine Einheit von Therapie 1 ergibt, wäre der Effekt im additiven Fall genauso groß wie für zwei Einheiten von Therapie 1, nämlich 40 %.

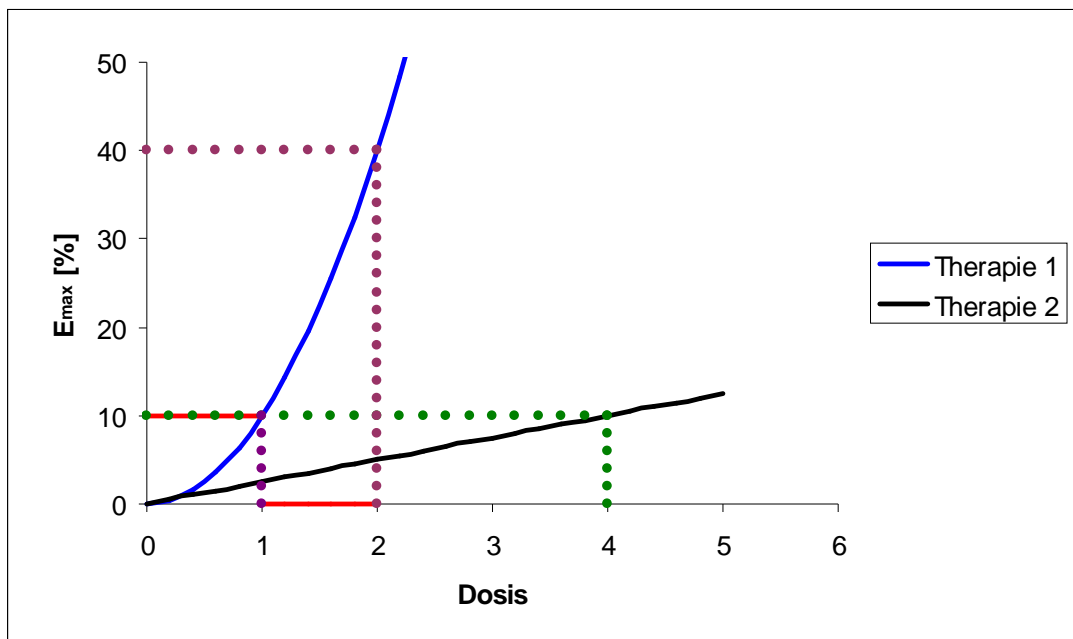


Abbildung 14: In diesem Diagramm werden zwei Dosis-Wirkungs-Beziehungen gezeigt, wobei E_{max} den Bruchteil des maximal möglichen Effekts bezeichnet. Therapie 1 verhält sich quadratisch ($y = 10x^2$) und Therapie 2 linear ($y = 2,5x$). Man braucht eine Dosis-Einheit von Therapie 1, um 10% des maximalen Effekts zu erreichen und vier Einheiten von Therapie 2 für den gleichen Effekt; damit würde im Falle der strikten „response additivity“ der additive Kombinationseffekt 20% betragen. Hingegen im Falle der Loewe Additivität würde beispielsweise Therapie 2 mit vier Einheiten das Gleiche bewirken wie Therapie 1 mit einer Einheit, der additive Effekt wäre plötzlich der gleiche wie für zwei Einheiten von Therapie 1, nämlich 40%.

4.5.3. Formale Definitionen

Im Folgenden wird der Effekt der einzelnen Agenzien betrachtet.

Um die Dosis-Wirkungs-Beziehung mathematisch zu beschreiben, wird die folgende Notation eingeführt:

$$y_j = f_j(x_j), j \in \{1, 2, 3\},$$

wobei y den Effekt bezeichnet und x die Dosis/Konzentration der Bestrahlung/des Agens (der Begriff Dosis werde im Folgenden synonym mit Konzentration verwendet).

Die Funktionen f_j sollten stetig und invertierbar (d. h. bijektiv) sein, die dazu inversen Funktionen seien im Folgenden mit f_j^{-1} bezeichnet.

Sei d_j die Dosis der j ten Modalität in der Dreifach-Therapie. Für Tripel werde die Notation $(d_1|d_2|d_3)$ eingeführt, wobei d_1 die Konzentration eines hypothetischen Agens A, d_2 die Konzentration eines hypothetischen Agens B und d_3 die Strahlendosis bezeichnet. Diese Nomenklatur wird verwendet, um den allgemeinen Fall abzudecken; die im Folgenden verwendeten Daten entstammen aus tatsächlich durchgeführten Experimenten, sodass z. T. die verwendeten Einheiten belassen wurden. Wie später noch ersichtlich wird, steht A für HGS-ETR1/HGS-ETR2 und B für C225.

4.5.4. Konzept

Als erstes wird die Fläche der reinen „response additivity“ eingeführt. Diese kann als diejenige Fläche angesehen werden, welche alle Therapiekombinationen enthält, bei denen die Summe der Einzeleffekte genau dem tatsächlichen Effekt der Tripel-Kombination entspricht (dieser Effekt werde mit „ i “ bezeichnet). Der beschriebene Ansatz führt zu folgender Gleichung, welche einer Fläche im Raum entspricht:

$$\sum_{j=1}^3 f_j(x_j) = i \quad [1]$$

Die bereits dargestellten semantischen Definitionen führen zu den folgenden sieben Gleichungen, wobei die meisten von ihnen eine gemischte Definition von „Additivität“ verwenden:

$$f^{-1}_3(f_1(x_1)) + f^{-1}_3(f_2(x_2)) + x_3 = f^{-1}_3(i) \quad [2]$$

$$f^{-1}_3(f_2(f^{-1}_2(f_1(x_1)) + x_2)) + x_3 = f^{-1}_3(i) \quad [3]$$

$$f^{-1}_3(f_1(f^{-1}_1(f_2(x_2)) + x_1)) + x_3 = f^{-1}_3(i) \quad [4]$$

$$f_2(f^{-1}_2(f_1(x_1)) + x_2) + f_3(x_3) = i \quad [5]$$

$$f_1((f^{-1}_1(f_2(x_2)) + x_1)) + f_3(x_3) = i \quad [6]$$

$$f_3^{-1}(f_1(x_1) + f_2(x_2)) + x_3 = f^{-1}_3(i) \quad [7]$$

$$f_3(f^{-1}_3(f_1(x_1)) + f^{-1}_3(f_2(x_2))) + f_3(x_3) = i \quad [8]$$

Die zyklische Permutation (d. h. die Vertauschung der Indizes in der Reihenfolge $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$) führt zu weiteren 14 Gleichungen.

Für den praktischen Gebrauch ist es nützlich, äußerste und innerste Fläche darzustellen und die Lage des Therapiepunktes relativ zu dem eingeschlossenen Volumen zu bestimmen.

4.5.5. Beispiel

Nachdem wir das generelle Ziel der isobolographischen Analyse erörtert haben, werden folgende Ansätze für die Dosis-Wirkungs-Beziehungen verwendet:

$$f_j(x_j) = a_j \ln x_j + b_j, \quad j \in \{1, 2\}, \quad f_3(x_3) = a_3 x_3 + b_3 \quad [9]$$

In dieser Notation bezeichnet f_3 den Effekt der Bestrahlung, a_j und b_j sind Parameter, welche aus den experimentellen Daten bestimmt werden müssen. Als Effekt kann man beispielsweise „Zelltod“ oder „Apoptose-Induktion“ wählen. In den folgenden zwei Tabellen werden die Daten aufgeführt, die für die folgenden graphischen Beispiele von Bedeutung sind:

Tabelle 3: Koeffizienten der parametrischen Repräsentationen der Dosis-Wirkungs-Beziehungen.

a_1	a_2	a_3	b_1	b_2	b_3
8,5	2,0	3,1	65,6	4,3	3,1

Tabelle 4: Dosis des Tripels RT + A + B und das Isoeffekt-Level.

i [%]	d_1 [$\mu\text{g/ml}$]	d_2 [nM]	d_3 [Gy]
52	0,001	1	5

Es hängt vom experimentellen Design ab, wie zweckmäßig der Ansatz [9] ist. Beispielsweise für klonogene Assays oder in vivo Wachstumsverzögerungs-Assays sind linear-quadratische Ansätze sinnvoller und bereits etabliert.

Nun muss man die Gleichungen auswerten, was in 22 implizit gegebenen Flächen mündet, die man in einem kartesischen Koordinatensystem auftragen kann. Bei Verwendung des Ansatzes [9] führt dies aufgrund der Linearität von f_3 zwangsläufig dazu, dass einige der Gleichungen ein identisches Ergebnis liefern.

Neben dieser 3D-Darstellung ist es sinnvoll, die zweidimensionalen Schnitte durch den „Therapie-Punkt“ ($d_1|d_2|d_3$) darzustellen, da in diesen meist noch eindeutiger zu erkennen ist, ob dieser Punkt unterhalb der Flächen liegt oder nicht. Dies kann man einfach erreichen, indem man $x_i = d_i$, $i \in \{1, 2, 3\}$ setzt.

Hier sind einige der Lösungen (die Nummer der Formel mit einem „*“ entspricht der oben genannten Gleichung ohne „*“):

$$x_3 = \frac{1}{a_3}(-b_1 - b_2 - b_3 + i - a_1 \ln x_1 - a_2 \ln x_2) \quad [1^*]$$

$$x_3 = \frac{1}{a_3}(-b_1 - b_2 + b_3 + i - a_1 \ln x_1 - a_2 \ln x_2) \quad [2^*]$$

$$x_3 = \frac{1}{a_3} \left(i - b_2 - a_2 \ln \left(e^{\frac{1}{a_2}(a_1 \ln x_1 + b_1 - b_2)} + x_2 \right) \right) \quad [3^*]$$

$$x_3 = \frac{1}{a_3} \left(i - b_1 - a_1 \ln \left(e^{\frac{1}{a_1}(a_2 \ln x_2 + b_2 - b_1)} + x_1 \right) \right) \quad [4^*]$$

$$x_3 = \frac{1}{a_3} \left(i - b_2 - b_3 - a_2 \ln \left(e^{\frac{1}{a_2}(a_1 \ln x_1 + b_1 - b_2)} + x_2 \right) \right) \quad [5^*]$$

$$x_3 = \frac{1}{a_3} \left(i - b_1 - b_3 - a_1 \ln \left(e^{\frac{1}{a_1}(a_2 \ln x_2 + b_2 - b_1)} + x_1 \right) \right) \quad [6^*]$$

$$x_3 = \frac{1}{a_3} (i - b_1 - b_2 - a_1 \ln x_1 - a_2 \ln x_2) \quad [7^*]$$

[7] und [8] besitzen in diesem Fall eine identische Lösung, so dass insgesamt sechs Gleichungen redundant sind; daher bleiben 17 verschiedene Flächen übrig. Die Lösung von [1] ist in **Abbildung 15** dargestellt, die Fläche wird aus drei verschiedenen Perspektiven gezeigt.

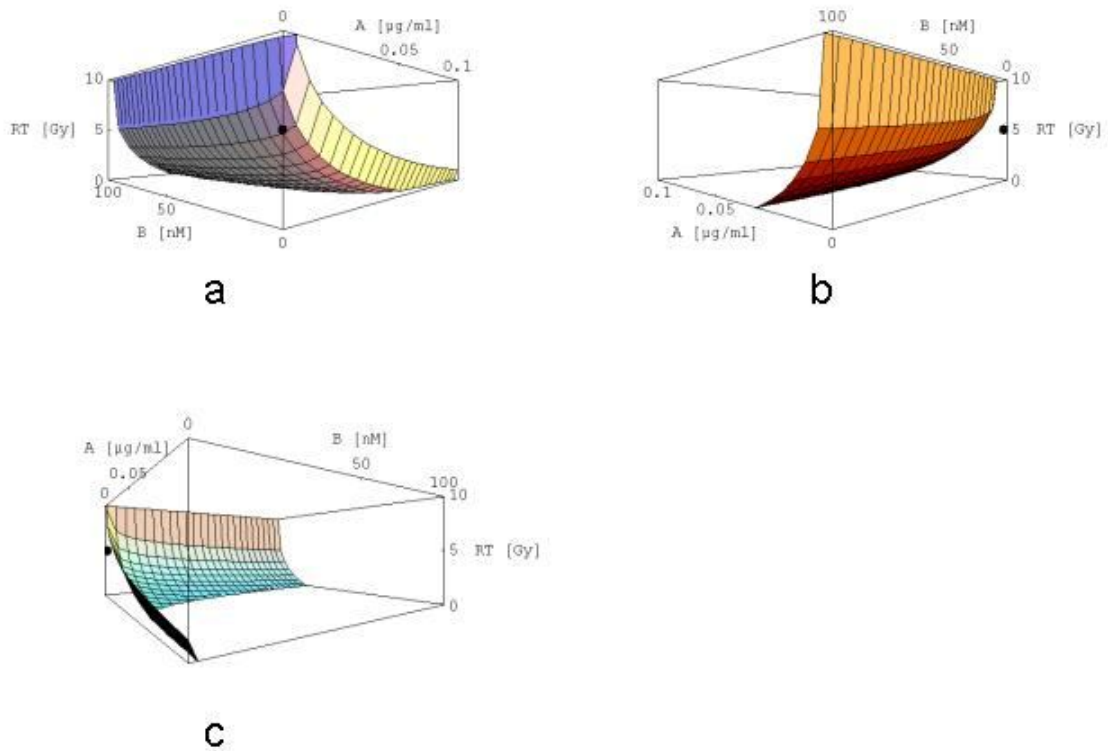


Abbildung 15: Gezeigt wird die Fläche der reinen „response additivity“ für die Dreifachkombination 5 [Gy] + 0,001 [µg/ml] A + 1 [nM] B aus drei verschiedenen Perspektiven. Die Achsen des rechtshändigen kartesischen Koordinatensystems sind mit den Dosen/Konzentrationen der einzelnen Substanzen beschriftet (x_1 : A, x_2 : B, x_3 : XRT). Das Diagramm beschreibt die Intervalle [0, 10] für XRT, [0, 0,1] für A und [0, 100] für B. Der schwarze Punkt markiert den „Therapiepunkt“, in diesem Fall (0,001|1|5); $x_1 = 0,001$ und $x_2 = 1$ bedeuten, dass der Punkt nahe an der x_3 -Achse liegt. Der Therapiepunkt liegt in der Mitte des Intervalls [0, 10].

In einer Gesamtübersicht in **Abbildung 16** sind alle 22 (de facto nur 17) berechneten Flächen aufgeführt.

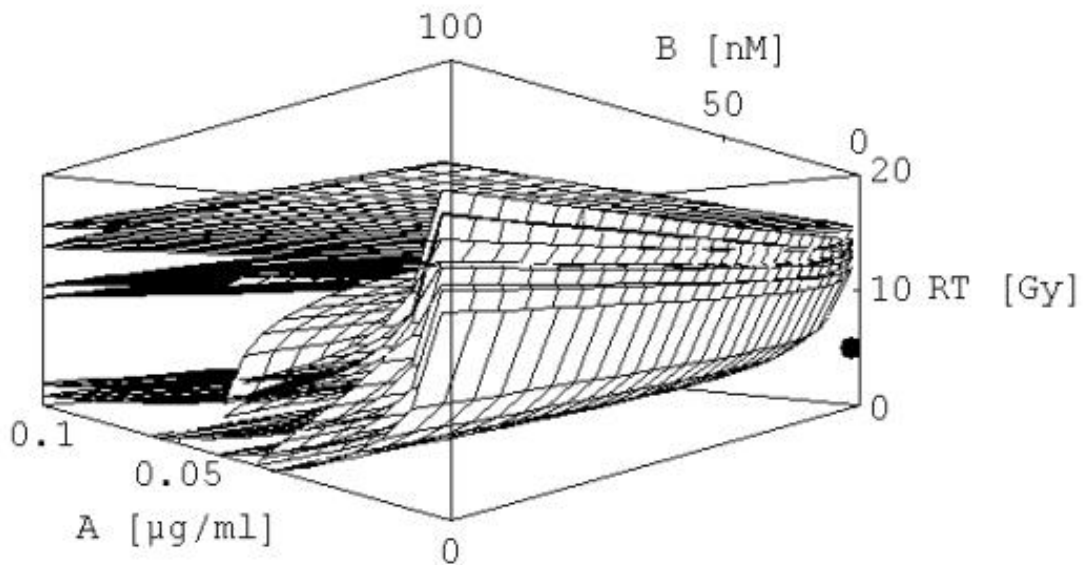


Abbildung 16: In diesem Diagramm wurden alle 17 Flächen aufgetragen für die Therapie (0.001|1|5), der Therapiepunkt wurde auch mit eingezeichnet. Die x_3 -Achse wurde erweitert (XRT), um alle Flächen darstellen zu können. Der Synergismus ist durch die Lage des Therapiepunktes unterhalb der innersten Fläche gegeben.

Da es eine Frage der Perspektive ist, ob man erkennt, dass der Punkt unterhalb der innersten Fläche liegt, kann man wie bereits erwähnt 2D-Schnitte darstellen, was in **Abbildung 17** gezeigt wird.

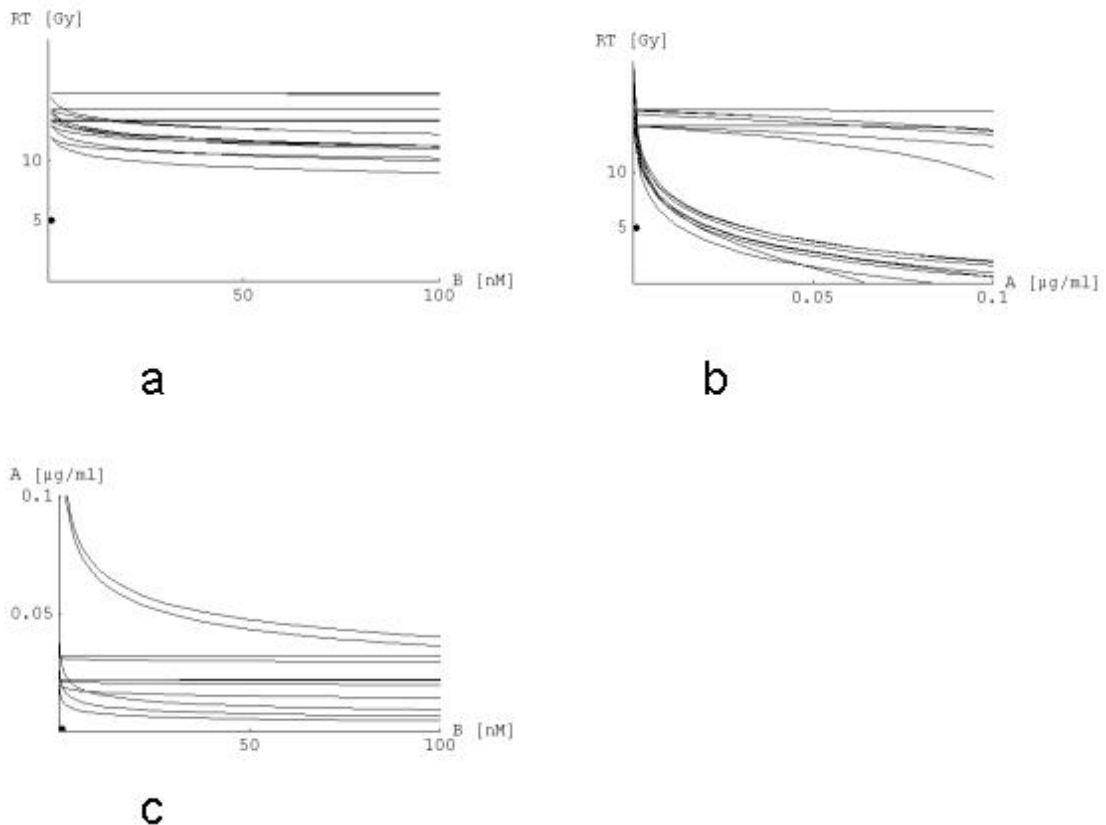


Abbildung 17: Hierin werden zweidimensionale Schnitte dargestellt durch den dreidimensionalen Plot aus **Abbildung 16**; gezeigt werden die Ebenen, welche den Therapiepunkt (0.001|1|5) enthalten. Dabei werden nacheinander gezeigt: a: $x_2 - x_3$ -Ebene ($x_1=d_1$ wird festgehalten), b: $x_1 - x_3$ -Ebene, c: $x_2 - x_1$ -Ebene.

Isobologramme für linear-quadratische Ansätze sind in **Abbildung 18** dargestellt. Dabei wurden jeweils die äußerste und die innerste Fläche der Einfachheit halber dargestellt.

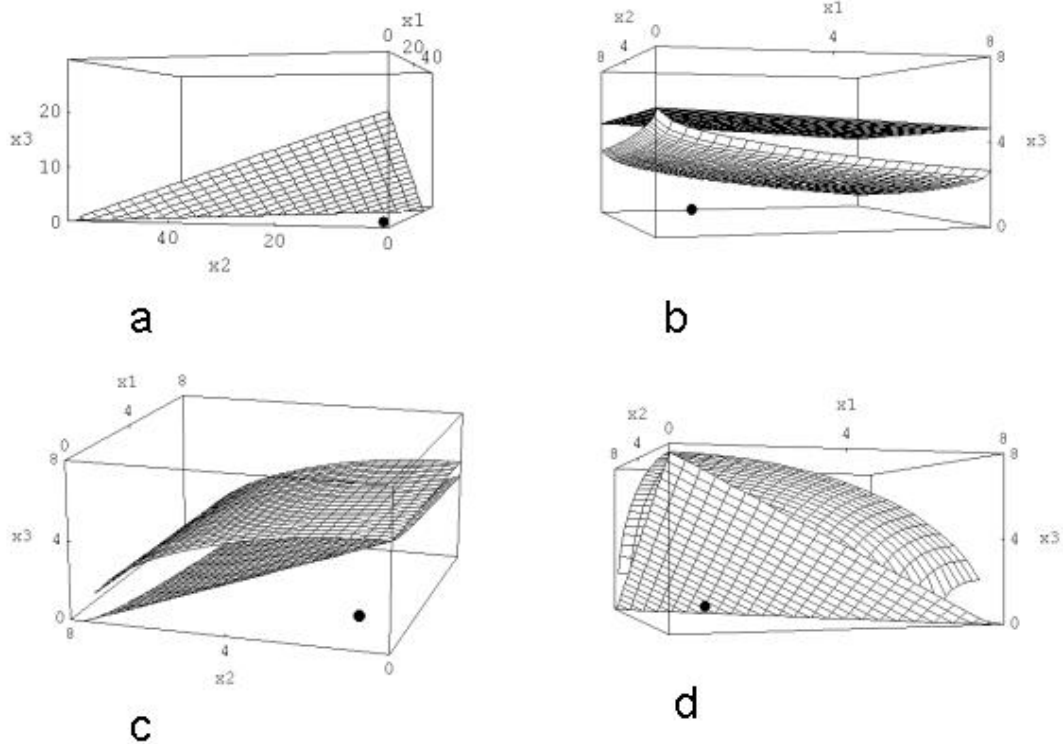


Abbildung 18: Gezeigt werden die Additivitätsvolumina für vier verschiedene Fälle. Dargestellt sind lediglich innerste und äußerste Fläche des Volumens, der Therapiepunkt wurde in den Diagrammen ebenfalls berücksichtigt. A zeigt den Fall für drei lineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen; wie erwartet erhält man eine einzelne Ebene, was der geraden Linie im zweidimensionalen Fall entspricht. B wurde unter Verwendung einer linearen und zweier linear-quadratischer Ansätze berechnet, c verwendet zwei lineare und einen linear-quadratischen Ansatz und d drei linear-quadratische Ansätze.

Wir erstellten außerdem ein entsprechendes Programm, um auch anderen Arbeitsgruppen die Auswertung ihrer Experimente mit der vorgestellten Methode zu ermöglichen (61).

4.5.6. Ergebnisse der isobographischen Auswertung

Die Ergebnisse wurden in drei-dimensionalen Isobogrammen analysiert. Um im Folgenden die Notation abzukürzen, wird beispielsweise $(0,001|1|5)_1$ für eine Dreifachkombination $0,001 \mu\text{g/ml}$ Mapatumumab/HGS-ETR1 + 1 nM C225 + 5 Gy geschrieben (der Index bezieht sich auf den Rezeptor-Subtyp).

Untenstehend die zu **Abbildung 13** passenden Isobogramme, die synergistische Effekte zeigen. Synergie liegt vor, wenn der Therapiepunkt

zwischen der eingezeichneten Fläche und den Koordinatenebenen des ersten Oktanten liegt (dieser bezeichnet den Raumbereich in einem kartesischen Koordinatensystem, in dem alle Koordinaten positive Werte besitzen).

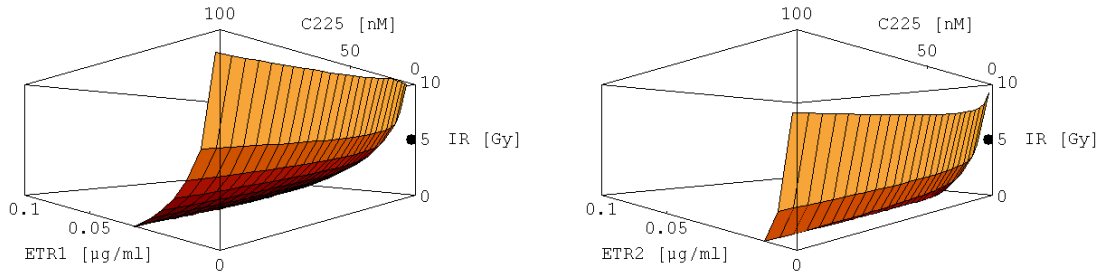


Abbildung 19: Isobolographische Analyse für Kombinationen aus RT + ETR1/-2 + C225 für Colo 205. Die Experimente wurden mit den Kombinationen $(0,001|1|5)_1$ (linke Seite) und $(0,001|1|5)_2$ (rechte Seite) durchgeführt.

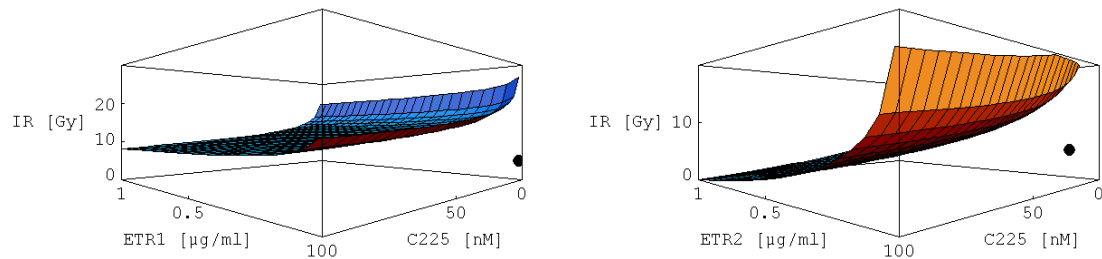


Abbildung 20: Isobolographische Analyse für Kombinationen aus RT + ETR1/-2 + C225 für FaDu. Die Experimente wurden mit den Kombinationen $(0,01|1|5)_1$ (linke Seite) und $(0,1|1|5)_2$ (rechte Seite) durchgeführt.

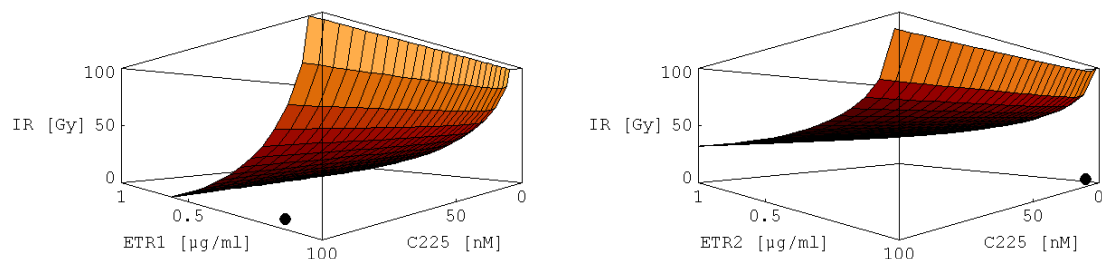


Abbildung 21: Isobolographische Analyse für Kombinationen aus RT + ETR1/-2 + C225 für HCT116. Die Experimente wurden mit den Kombinationen $(0,1|100|5)_1$ (linke Seite) und $(0,01|10|5)_2$ (rechte Seite) durchgeführt.

Somit konnten in den untersuchten Zelllinien signifikant synergistische Effekte beobachtet werden; es zeigte sich, dass diese eher im Niedrig-Dosisbereich angesiedelt waren. Um eine Komplett-Übersicht über alle untersuchten Kombinationen zu geben, sei auf **Tabelle 5**, **Tabelle 6** und **Tabelle 7** verwiesen.

Tabelle 5: Die getesteten Dreifachkombinationen für Colo 205 Zellen; es wurden drei Konzentrationsbereiche für HGS-ETR1 gewählt (0,001; 0,01; 0,1 µg/ml), drei für HGS-ETR2 (0,001; 0,01; 0,1 µg/ml) und drei für C225 (1, 10, 100 nM). Angegeben ist der Interaktionsgrad der Dreifachkombination (* bezeichnet Signifikanz).

RT [Gy]	ETR1 [µg/ml]	ETR2 [µg/ml]	C225 [nM]	Qualität
5	0,001	-	100	additiv
5	0,001	-	1	synergistisch*
5	0,1	-	10	additiv
5	0,1	-	1	additiv
5	0,01	-	10	additiv
5	-	0,001	100	synergistisch*
5	-	0,001	1	synergistisch*
5	-	0,1	10	additiv
5	-	0,1	1	additiv
5	-	0,01	10	additiv

Tabelle 6: Die getesteten Dreifachkombinationen für FaDu Zellen; es wurden drei Konzentrationsbereiche für HGS-ETR1 gewählt (0,01; 0,1; 1 µg/ml), drei für HGS-ETR2 (0,1; 1; 10 µg/ml) und drei für C225 (1, 10, 100 nM). Angegeben ist der Interaktionsgrad der Dreifachkombination (* bezeichnet Signifikanz).

RT [Gy]	ETR1 [µg/ml]	ETR2 [µg/ml]	C225 [nM]	Qualität
5	0,01	-	100	synergistisch
5	0,01	-	1	synergistisch*
5	1	-	100	synergistisch
5	1	-	1	synergistisch*
5	0,1	-	10	synergistisch*
5	-	10	100	additiv
5	-	10	1	synergistisch*
5	-	0,1	100	synergistisch
5	-	0,1	1	synergistisch*
5	-	1	10	synergistisch

Tabelle 7: Die getesteten Dreifachkombinationen für HCT116 Bax wt Zellen; es wurden drei Konzentrationsbereiche für HGS-ETR1 gewählt (0,01; 0,1; 1 µg/ml), drei für HGS-ETR2 (0,01; 0,1; 1 µg/ml) und drei für C225 (1, 10, 100 nM). Angegeben ist der Interaktionsgrad der Dreifachkombination (* bezeichnet Signifikanz).

RT [Gy]	ETR1 [µg/ml]	ETR2 [µg/ml]	C225 [nM]	Qualität
5	0,1	-	100	synergistisch*
5	0,01	-	100	synergistisch
5	0,01	-	10	synergistisch*
5	0,1	-	10	synergistisch
5	1	-	10	synergistisch
5	-	1	100	synergistisch*
5	-	0,1	100	synergistisch*
5	-	0,01	100	synergistisch*
5	-	1	1	synergistisch*
5	-	0,01	10	synergistisch*

4.6. Bax-Abhängigkeit des kombinierten Effekts

Um die Abhängigkeiten der synergistischen Effekte auf molekularer Ebene weiter aufklären zu können, wurde untersucht, inwiefern das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bax am kombinierten Effekt beteiligt ist.

Zu diesem Zweck wurde eine Bax-defiziente Zelllinie verwendet (HCT116 Bax^{-/-}), deren Ansprechen auf die Kombinationsbehandlung mit dem Wildtyp HCT116 Bax^{+/+} (wt) mit intakter Bax-Expression verglichen wurde (93).

Da die Bcl-2 homologen Proteine Bax und Bak in verschiedenen Zelllinien eine ähnliche/redundante Wirkung besitzen können (23, 89), untersuchten wir zuerst die Bax- und Bak-Expression in beiden HCT116 Zelllinien mittels Western-Blot (**Abbildung 22**). Wie erwartet war Bax in HCT116 Bax^{-/-} Zellen nicht, Bak jedoch in beiden Zellsystemen in ausreichendem Maße exprimiert.

Die Apoptose-Induktion lag in beiden Zelllinien mit bis zu 10 Gy und bis zu 100 nM C225 jeweils unter 10 %, was für eine Resistenz gegenüber Bestrahlung und EGFR-Blockade sprach. Im Gegensatz zu HCT116 Bax wt Zellen konnten Mapatumumab und Lexatumumab beim Bax-defizienten Partner nur Apoptoseraten unter 10 % induzieren, was für eine Bax-Abhängigkeit und

4.7. PI3K-Abhängigkeit

In den folgenden Experimenten wurde versucht, weitere potentiell an der Signaltransduktion beteiligte Pfade zu definieren. Da die PI3-Kinase ein Schlüssel-Target downstream des EGF-Rezeptors ist, testeten wir, inwiefern der PI3-Kinase Inhibitor LY294002 die Effekte von C225 nachahmen konnte. Wie erwartet, fielen in allen getesteten Zelllinien (Colo 205, FaDu, HCT116 Bax wt) nach Wegnahme von C225 aus der Dreifachkombination die Apoptose-Level ab, welche nach Zugabe von LY294002 wieder erreicht wurden; dies ist exemplarisch für FaDu Zellen in **Abbildung 23** dargestellt.

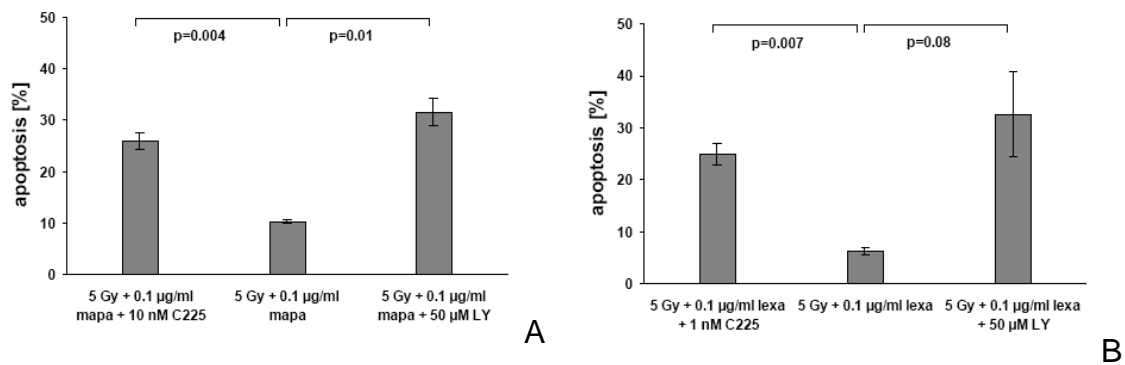


Abbildung 23: Einfluss des PI3K/Akt Signalweges auf die Effektivität der Dreifachtherapie bestehend aus C225, TRAIL-R-Stimulation und Bestrahlung bei FaDu Zellen. A: Kombinationen mit Mapatumumab, B: Kombinationen mit Lexatumumab. Die Abkürzung LY steht für den PI3-Kinase Inhibitor LY294002. Ein ungepaarter t-Test wurde zur statistischen Testung verwendet, $p < 0,05$ bezeichnet einen signifikanten Unterschied.

Zusätzlich wurde neben dieser indirekten Methode in FaDu Zellen der Phosphorylierungsstatus für Akt/PKB bestimmt, welches ein Haupt-Target der PI3-Kinase darstellt und für die Vermittlung der nachgeschalteten Effekte verantwortlich ist. Die Kombination von C225 mit Bestrahlung und Mapa-/Lexatumumab beeinflusste die Akt/PKB-Expression nicht generell, aber verminderte die Phosphorylierung an der Position „Serin473“, die vergleichbar waren mit Leveln nach analoger Dreifachbehandlung unter Verwendung von LY294002 (**Abbildung 24**). Dies unterstützt die Hypothese, dass die

verwendete Dreifachkombination einen inhibitorischen Einfluss auf den Signalweg der PI3-Kinase besitzt.

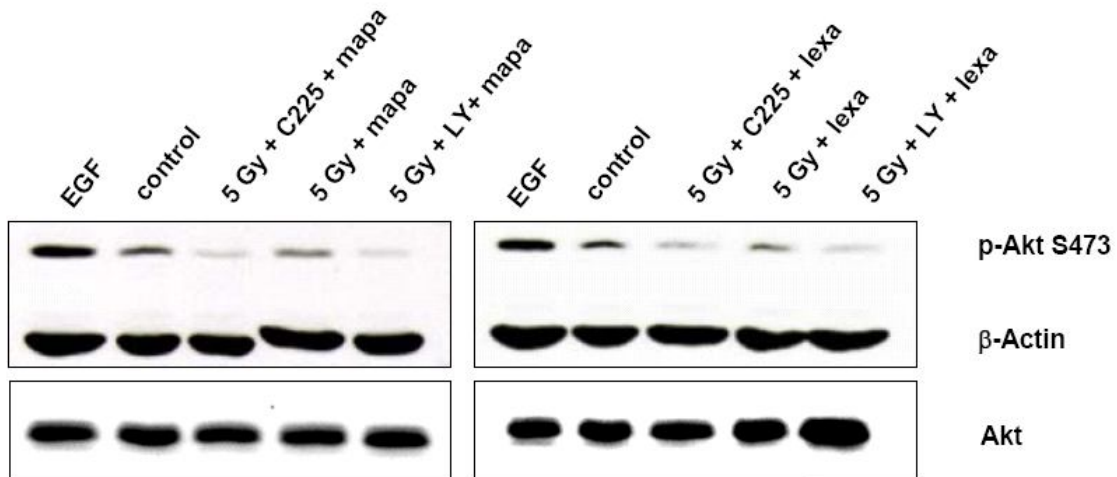


Abbildung 24: Western-Blot nach PI3K Inhibition. Linke Seite: Experimente wurden mit Mapatumumab durchgeführt, rechts mit Lexatumumab; erste Zeile (die Lysate in allen Zeilen von links nach rechts): Zellen nach EGF-Stimulation, unbehandelte Kontrolle, Dreifachkombination (5 Gy, 0,1 µg/ml Mapatumumab, 10 nM C225), Zweifachkombination (5 Gy + 0,1 µg/ml Mapatumumab), Dreifachkombination bestehend aus 5 Gy, 0,1 µg/ml Mapatumumab und 50 µM LY294002 (LY). Zweite Zeile: Ladekontrolle mit β-Actin. Dritte Zeile: Dieselben Lysate mit Akt-Antikörper gefärbt. Rechte Seite: Analoge Darstellung mit Lexatumumab (1 µg/ml) anstelle von Mapatumumab.

4.8. Klonogenes Überleben

Um kombinierte Effekte von TRAIL-R Antikörpern, Bestrahlung und EGFR-Blockade zu untersuchen, zogen wir einen klinisch relevanten Endpunkt in Erwägung und führten Langzeit-Koloniebildungs-Assays durch.

Passende Dreifachkombinationen wurden basierend auf den Isobologramm-Analysen aus den Apoptose-Messungen gewählt. Dabei konnten jedoch nur drei der vier untersuchten Zelllinien getestet werden, da Colo 205 Zellen keine stabilen und zusammenhängenden Kolonien bilden.

Die Ergebnisse der Experimente sind in **Abbildung 25** gezeigt. Die Überlebenskurven wurden mittels einer Multivarianzanalyse verglichen, um zu bestimmen, inwiefern eine Interaktion (Synergie) zwischen Bestrahlung und den beiden Antikörpern stattfand (die dazugehörigen p-Werte finden sich in **Tabelle 8**). Ein positives Ergebnis besagt, dass die arithmetische Addition der beobachteten Effekte (Bestrahlung oder Antikörperkombination jeweils alleine) weniger stark ausgeprägt ist verglichen mit dem gemessenen Effekt der Dreifachkombination.

Bei FaDu Zellen ergab sich beispielsweise kein Hinweis auf eine Interaktion ($p=0.5715$) für die kombinierte Behandlung mit Bestrahlung, 0,01 µg/ml Mapatumumab und 1 nM C225. Jedoch war die Abhängigkeit von Behandlungsart (den zwei Antikörpern) und der Bestrahlungsdosis hoch signifikant. Post-Tests wurden durchgeführt, um die Ergebnisse für verschiedene Bestrahlungsdosen zu vergleichen. Dies ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Dreifachkombination, die 8 Gy beinhaltete, und 8 Gy, wenn diese Dosis alleine verwendet wurde ($p < 0.05$).

Zum anderen ergab sich bei FaDu Zellen auch für die kombinierte Behandlung Bestrahlung, 0,1 µg/ml Lexatumumab und 1 nM C225 kein Hinweis für eine Interaktion. Jedoch war auch in diesem Fall die Abhängigkeit von Behandlungsmodalität oder Bestrahlungsdosis hoch signifikant, die Post-Tests lieferten wieder einen signifikanten Unterschied bei 8 Gy. Man kann also schließen, dass der Effekt der Dreifachkombination in beiden Fällen additiv war (**Abbildung 25**, FaDu).

Im Gegensatz dazu wurde eine statistisch signifikante Interaktion für HCT116 Bax wt Zellen beobachtet (Bestrahlung, 0,01 µg/ml Mapatumumab und 10 nM C225 oder 0,01 µg/ml Lexatumumab und 10 nM C225), was sich sogar für HCT116 Bax^{-/-} Zellen bestätigte (Bestrahlung, 0,1 µg/ml Lexatumumab und 10 nM C225). Andererseits gab es in der gleichen Zelllinie keinen Hinweis auf eine Interaktion für die kombinierte Behandlung mit Mapatumumab (Bestrahlung, 0,1 µg/ml Mapatumumab und 10 nM C225)

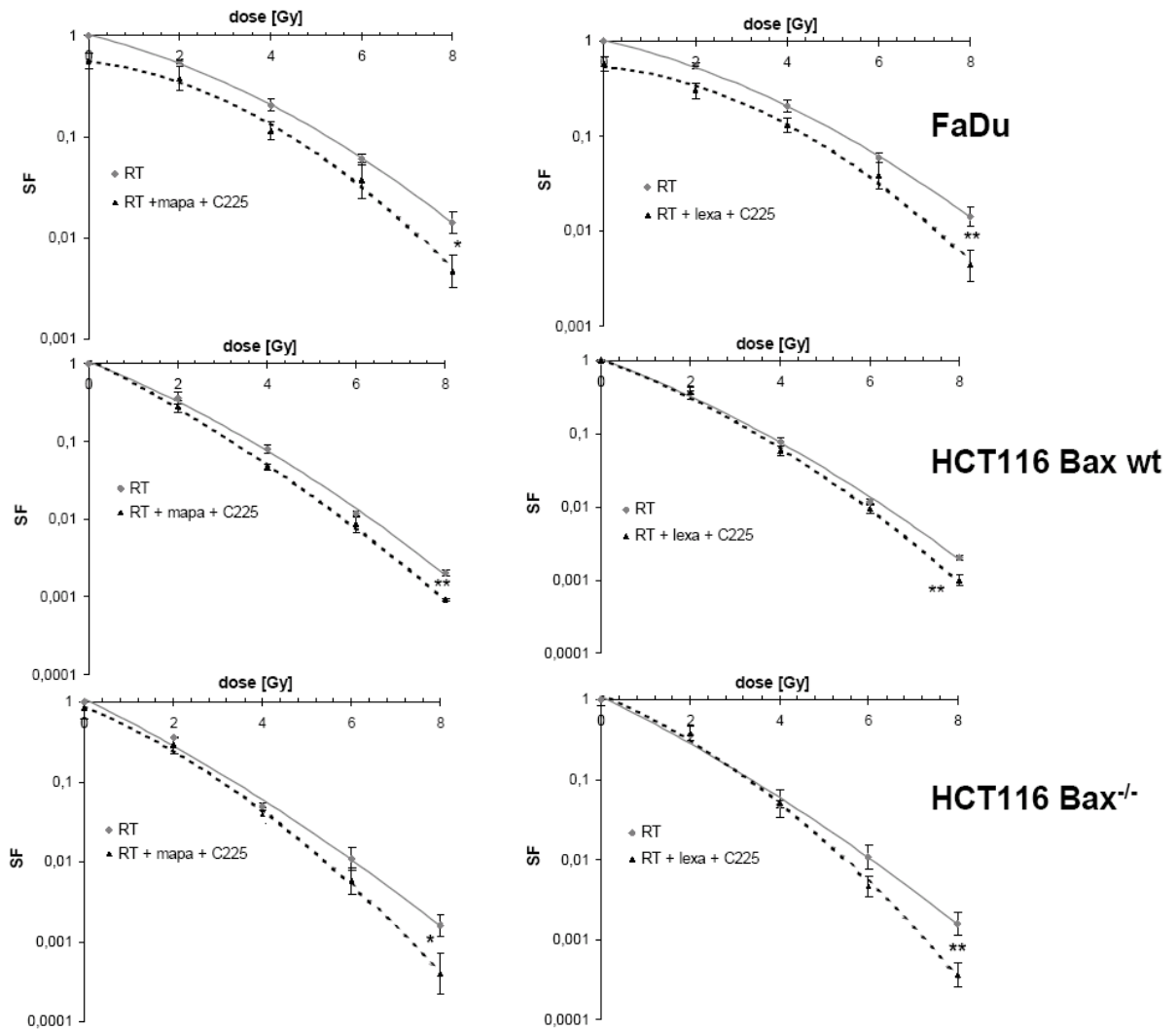


Abbildung 25: Klonogenes Überleben nach Bestrahlung alleine im Vergleich zur Dreifachkombination. Nacheinander sind die Resultate für FaDu, HCT116 Bax wt und HCT116 Bax^{-/-} Zellen gezeigt. Diese wurden entweder mit 2, 4, 6 oder 8 Gy bestrahlt oder mit einer Dreifachkombination behandelt, die außerdem Mapa-/Lexatumumab und C225 enthielt, wie unten angegeben. Die Daten stammen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Zwei Sternchen (**) wurden für ein „sehr signifikantes“ Ergebnis verwendet ($p < 0,01$) und ein Sternchen für ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$). FaDu Zellen, linke Seite: Bestrahlung, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Mapatumumab, 1 nM C225, rechte Seite: Bestrahlung, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Lexatumumab und 1 nM C225, HCT116 Bax wt Zellen, linke Seite: Bestrahlung, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Mapatumumab und 10 nM C225, rechte Seite: Bestrahlung, 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Lexatumumab und 10 nM C225, HCT116 Bax^{-/-}, linke Seite: Bestrahlung, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Mapatumumab und 10 nM C225, rechte Seite: Bestrahlung, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Lexatumumab und 10 nM C225.

Um die Signifikanzniveaus besser vergleichen zu können, sind in **Tabelle 8** die verschiedenen p-Werte eingetragen.

Tabelle 8: Dargestellt ist der Vergleich der klonogenen Assays für alle drei Zelllinien als Zwei-Weg-Varianzanalyse (verglichen wurden Dreifachkombinationstherapien vs. Bestrahlung alleine). „ns“ bezeichnet einen nicht-signifikanten Effekt mit $p > 0,05$. (X+C225) steht für die Antikörper-Kombination und der entsprechende p-Wert gibt an, ob die zusätzliche Verwendung dieser Antikörper die Abtötung klonogener Zellen signifikant verbessert. RT*(X+C225) bezeichnet die Interaktion zwischen Radiotherapie und der Antikörper-Kombination, wobei ein signifikantes Ergebnis eine Voraussetzung für einen synergistischen Effekt ist. Der Quotient $SF_{\text{Tripel}}/SF_{\text{RT}}$ bei 8 Gy gibt die Richtung und Stärke der Dreifachtherapie im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung an.

RT vs Tripel	FaDu		HCT116 Bax wt		HCT116 Bax ^{-/-}	
RT+X+C225	X=mapa	X=lexa	X=mapa	X=lexa	X=mapa	X=lexa
RT*(X+C225)	ns (p=0,5715)	ns (p=0,4123)	p=0,0449	p=0,0291	ns (p=0,2694)	p=0,0240
(X+C225)	p=0,0004	p=0,0001	p=0,0009	p=0,0027	p=0,0107	p=0,0153
RT Dosis	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
8 Gy vs Tripel	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,01
$SF_{\text{Tripel}}/SF_{\text{RT}}$ (8 Gy)	0,33	0,31	0,45	0,49	0,25	0,23

4.9. Kombinationsversuche mit Cisplatin

Aufgrund der großen Bedeutung des klassischen Zytostatikums Cisplatin bei der Therapie kolorektaler Karzinome und anderer Tumorentitäten und den Erfolgen der neuartigen TRAIL-Antikörpern in Kombination mit Bestrahlung stellte sich die Frage, ob eine solche Dreifachkombination ebenfalls einen relevanten Therapieansatz darstellen würde. Insbesondere im Hinblick auf klinische Studien, in denen auch Platinderivate eine Rolle spielen werden, ist dieses präklinische Wissen von großer Bedeutung.

Zuerst wurden Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Cisplatin abgeleitet, welche in **Abbildung 26** beispielhaft für FaDu Zellen dargestellt ist (getestete Konzentrationen: 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 μM)

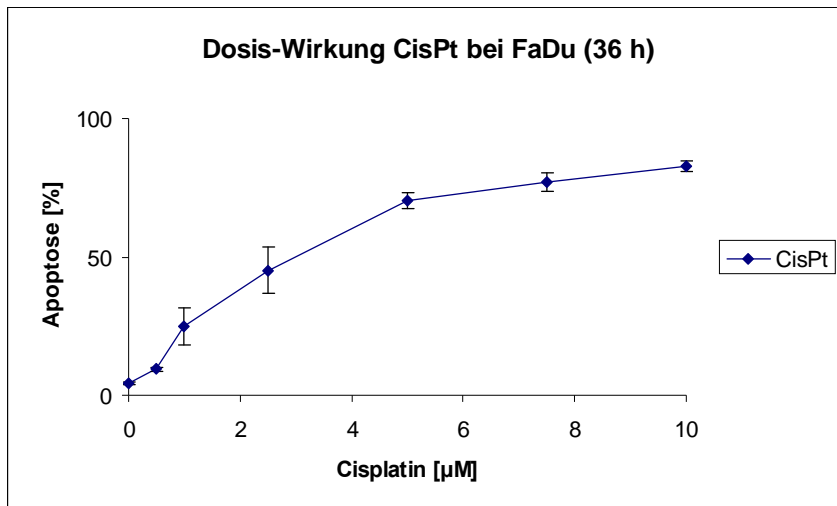


Abbildung 26: Dosis-Wirkungs-Beziehung für FaDu Zellen nach Cisplatin-Gabe.

In Übereinstimmung mit früheren Studien wird durch TRAIL schneller Apoptose induziert als durch Cisplatin, weshalb in den Versuchen Cisplatin 12 h vor Bestrahlung und simultaner TRAIL-Gabe verabreicht wurde. Dabei konnte auf Vorerfahrungen aus Versuchen mit Bestrahlung und TRAIL-Antikörpern zurückgegriffen werden.

In FaDu Zellen wurden maximale Apoptoseraten von 83 % erreicht (10 μM Cisplatin), Colo 205 Zellen waren weniger sensitiv mit 38 %.

Nun wurden erneut Zwei- und Dreifachkombinationen miteinander verglichen.

In FaDu Zellen wurden Apoptoseraten bis zu 87 % gemessen nach kombinierter Behandlung mit 5 Gy, 5 μM Cisplatin und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Mapatumumab, wobei die Einzelbehandlungen nacheinander nur jeweils 8 %, 70 % oder 8 % lieferten. Durch den Austausch von Mapa- gegen Lexatumumab stieg die Apoptoserate sogar auf 92 % an, die Apoptoseraten der Einzelbehandlungen lagen bei 10 %, 70 % oder 8 % (**Abbildung 27**, FaDu).

In Colo 205 konnte ebenfalls eine deutliche Steigerung der Apoptoseraten nach Dreifachkombinationstherapie erreicht werden (**Abbildung 27**, Colo 205).

4.9.1. Bax-Abhängigkeit

Die Apoptose-Induktion nach Gabe von 10 μ M Cisplatin war in beiden HCT116 Zelllinien unter 20 %, sodass entweder von einer Bax-Unabhängigkeit des Cisplatin-induzierten Zelltods oder einer intrinsischen Cisplatin-Resistenz ausgegangen werden musste.

Die Auswertung der Dreifach-Experimente mit HCT116 Zellen ergab eine Abnahme der Apoptoserate von 59 % (Wildtyp) auf 11 % in HCT116 Bax^{-/-} Zellen (Mapatumumab-basiert) oder von 78 % auf 11 % (Lexatumumab-basiert), siehe dazu **Abbildung 27**.

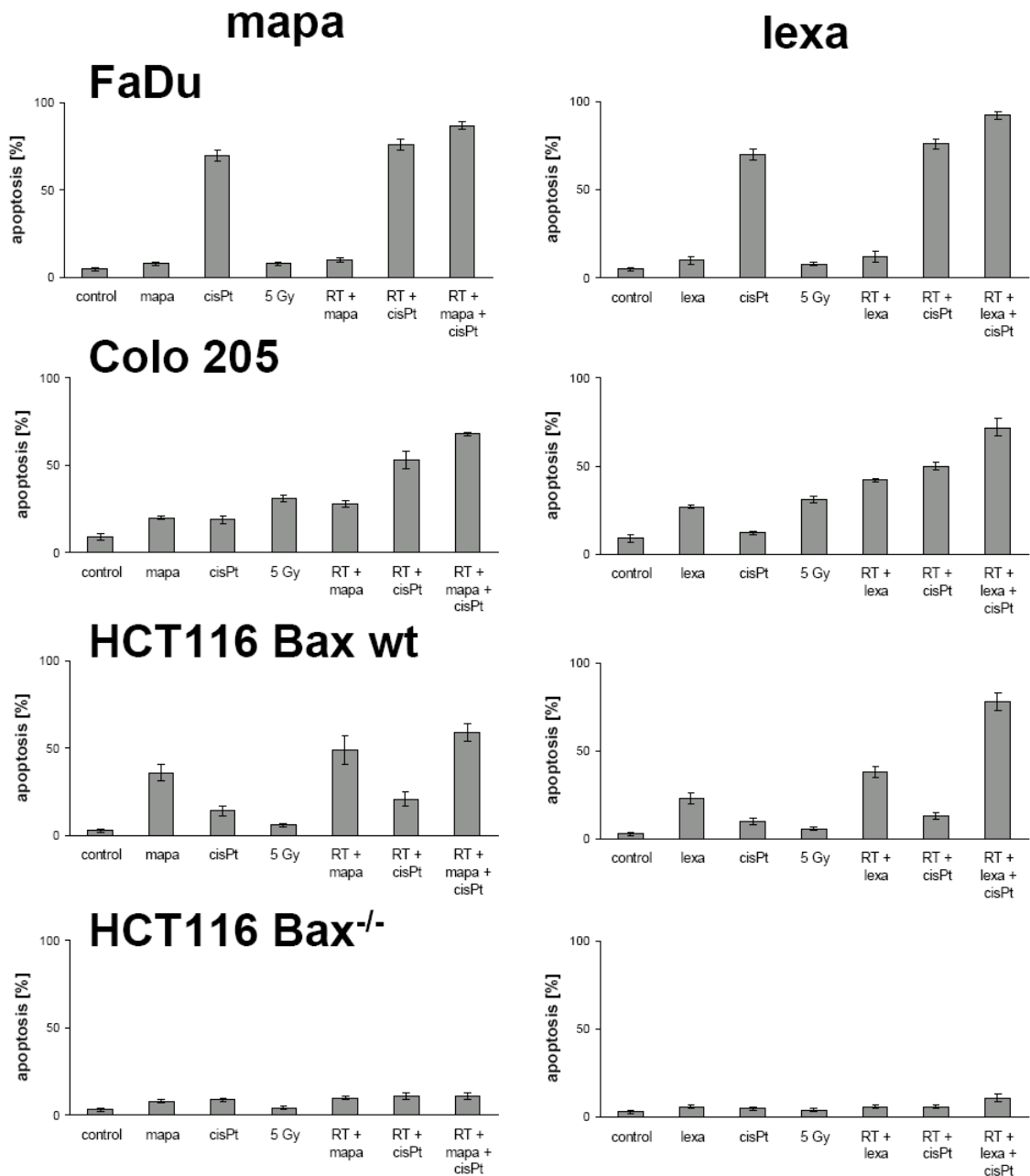


Abbildung 27: Apoptose-Induktion nach Einzelbehandlung, Zweifach- oder Dreifachkombination. Linke Seite: Apoptoseraten in verschiedenen Zellsystemen, die mit Bestrahlung, Mapatumumab (mapa) und/oder Cisplatin (cisPt) behandelt wurden. FaDu Zellen wurden mit 5 Gy, 0,1 µg/ml Mapatumumab und 5 µM Cisplatin behandelt, Colo 205 Zellen mit 5 Gy, 0,001 µg/ml Mapatumumab und 2,5 µM Cisplatin. HCT116 Bax wt Zellen wurden mit 5 Gy, 0,01 µg/ml Mapatumumab und 7,5 µM Cisplatin behandelt und HCT116 Bax^{-/-} Zellen mit 5 Gy, 1 µg/ml Mapatumumab und 7,5 µM Cisplatin. Rechte Seite: Apoptoseraten in Zellen, die mit Lexatumumab-basierten Zwei- oder Dreifachkombinationen behandelt wurden (lexa): FaDu Zellen wurden mit 5 Gy, 0,1 µg/ml Lexatumumab und 5 µM Cisplatin behandelt, Colo 205 Zellen mit 5 Gy, 0,01 µg/ml Lexatumumab und 1 µM Cisplatin. HCT116 Bax wt Zellen wurden mit 5 Gy, 1 µg/ml Lexatumumab und 2,5 µM Cisplatin behandelt und verglichen mit HCT116 Bax^{-/-} Zellen (auch 5 Gy, 1 µg/ml Lexatumumab und 2,5 µM Cisplatin).

4.9.2. 3D-Isobologramm-Analyse

In **Abbildung 28** sind synergistische Effekte in drei Zelllinien dargestellt (Konzentrationen und Dosen beziehen sich auf **Abbildung 27**). Die besten Resultate wurden in FaDu und Colo 205 Zellen erzielt, da für beide Zelllinien signifikant synergistische Effekte für beide Antikörper gefunden wurden (**Abbildung 28**, FaDu & Colo 205).

Für die beiden HCT116 Zelllinien zeichnete sich ein komplizierteres Antwort-Muster ab. Bei Verwendung von Mapatumumab führte die Dreifachkombination zu stark additiven Effekten, das Additivitätslevel war für HCT116 Bax^{-/-} Zellen jedoch wesentlich niedriger. Im Gegensatz dazu war eine Dreifachkombination mit Lexatumumab signifikant synergistisch für HCT116 Bax wt Zellen, aber dieser Synergismus ging in der Bax-defizienten Zelllinie verloren (**Abbildung 28**, HCT116 Bax wt & Bax^{-/-}).

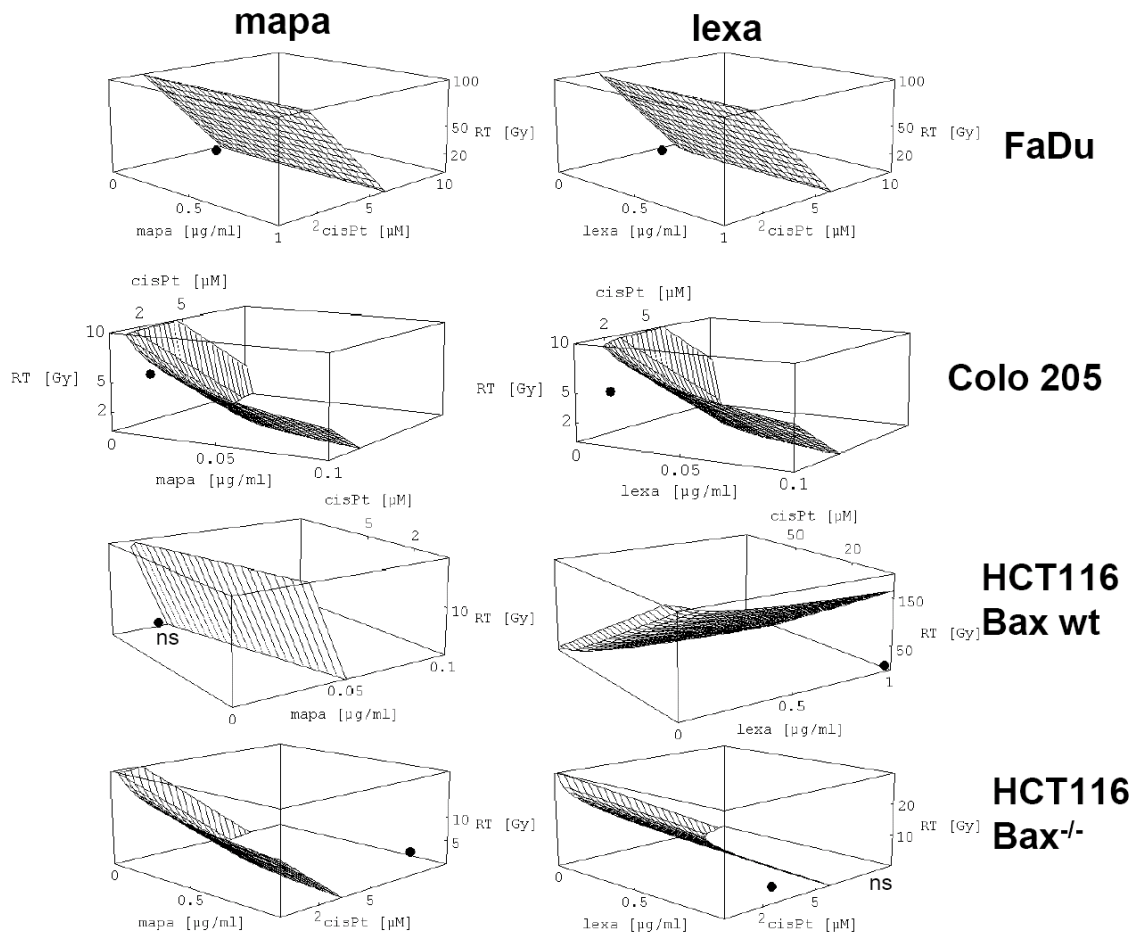


Abbildung 28: 3D-Isobologramm-Analyse der Apoptose-Induktion nach Dreifachtherapie. Ein synergistischer Effekt liegt vor, wenn der Punkt zwischen der eingezeichneten Fläche und den Koordinatenebenen des ersten Oktanten liegt. Die verwendeten Kombinationen sind die gleichen wie in **Abbildung 27**. Linke Seite (Kombinationen, die Mapatumumab enthalten): signifikant synergistische Effekte in FaDu und Colo 205 Zellen, aber kein signifikanter Synergismus in HCT116 Bax wt Zellen, kein synergistischer Effekt in HCT116 Bax^{-/-} Zellen; rechte Seite (Lexatumumab): wieder signifikant synergistische Effekte in FaDu und Colo 205 Zellen, dieses Mal auch in HCT116 Bax wt Zellen, kein signifikanter Synergismus für HCT116 Bax^{-/-}.

In **Tabelle 9** finden sich die restlichen untersuchten Dreifachkombinationen.

Tabelle 9: Übersicht über die getesteten Dreifachkombinationen für die vier betrachteten Zelllinien; es wurde die bereits bekannte Klammerschreibweise verwendet, in der der erste Wert für die TRAIL-Antikörper-Konzentration steht, der zweite Wert für die Cisplatin-Konzentration und der dritte Wert die Bestrahlungsdosis wiedergibt. Angegeben ist zudem der Interaktionsgrad der Dreifachkombination.

Zelllinie	Therapie	Qualität
FaDu	(1 1 5)	syn.*
Mapa	(0,1 2,5 5)	syn.*
	(0,1 5 5)	syn.*
Lexa	(1 1 5)	syn.*
	(0,1 2,5 5)	syn.*
	(0,1 5 5)	syn.*

Zelllinie	Therapie	Qualität
Colo 205	(0,01 1 5)	syn.
Mapa	(0,001 2,5 5)	syn.*
	(0,001 5 5)	syn.
Lexa	(0,01 1 5)	syn.*
	(0,001 2,5 5)	syn.*
	(0,001 5 5)	syn.*

Zelllinie	Therapie	Qualität
HCT wt	(0,1 2,5 5)	syn.
Mapa	(0,01 5 5)	add.
	(0,01 7,5 5)	syn.
Lexa	(1 2,5 5)	syn.*
	(1 5 5)	syn.*
	(1 7,5 5)	syn.*

Zelllinie	Therapie	Qualität
HCT k.o.	(1 2,5 5)	add.
Mapa	(1 5 5)	syn.
	(1 7,5 5)	add.
Lexa	(1 2,5 5)	syn.
	(1 5 5)	syn.
	(1 7,5 5)	syn.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, inwiefern trimodale Therapien bestehend aus entweder Bestrahlung, TRAIL-Rezeptorstimulation und EGFR-Blockade oder Bestrahlung, TRAIL und Cisplatin einen erfolgreichen Therapieansatz für solide Tumoren darstellen würden.

5.1. Effektivität der Dreifachtherapie

5.1.1. Endpunkt Apoptose

Unsere Ergebnisse zeigen erstmals, dass die molekular doppelt zielgerichtete Therapieform mit TRAIL-Stimulation und EGFR-Blockade in Verbindung mit Bestrahlung sowie die einfach zielgerichtete Therapie (TRAIL) kombiniert mit einer klassischen Cisplatin-basierten Radiochemotherapie hoch-effektiv Zelltod in mehreren Tumorzelllinien auslösen konnte.

Dabei zeigte sich, dass die Dreifachtherapien absolut gesehen effektiver waren als die entsprechenden Zweifachkombinationen in Bezug auf die Apoptose-Induktion. Jedoch war der absolute Grad der Apoptose-Induktion je nach betrachteter Zelllinie sehr unterschiedlich.

Signifikant synergistische Effekte konnten in den betrachteten Zellsystemen für fast alle Dreifachtherapien bei unterschiedlichen Konzentrationen beobachtet werden.

5.1.2. Endpunkt klonogener Zelltod

Die Rolle von Apoptose und Apoptose-Resistenz im Hinblick auf die Eradikation klonogener Tumorzellen ist weiterhin ein Problem der präklinischen Analyse (6, 14). Jedoch haben frühere Studien gezeigt, dass Konzentrationen/Dosen, die in Kurzzeit-Assays effektiv Apoptose induzieren konnten, vergleichbar waren mit jenen, die klonogene Tumorzellen effektiv eradizierten (71).

Zusätzlich zu den Kurzzeitassays testeten wir daher die Wirkung der molekular doppelt zielgerichteten Dreifachtherapie auf das klonogene Überleben, wobei

die entsprechenden Konzentrationsbereiche denjenigen angepasst wurden, die in den Kurzzeitassays zu synergistischen Effekten geführt hatten.

Als Resultat erhielten wir mindestens additive Effekte im Sinne einer zweidimensionalen multivariaten Analyse, wobei eine signifikante Verbesserung vor allem bei höheren Dosen beobachtet werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass die verwendeten molekular zielgerichteten Agenzien auch einen radiosensitivierenden Effekt besitzen.

Insgesamt kann man also schlussfolgern, dass sogar bei dem klinisch noch aussagekräftigeren Endpunkt „klonogenes Überleben“ ein Erfolg für die vorgestellten Dreifachtherapien erzielt werden konnte, sogar bei negativen Prädiktionsfaktoren wie Bax-Defizienz erwies sich die Kombinationstherapie als vielversprechend.

5.1.3. Vorarbeiten zu Kombinationstherapien

Die Ergebnisse zu den Dreifachtherapien fügen sich nahtlos ein in die Vorarbeiten zu den entsprechenden Zweifachkombinationen.

Ausgangspunkt der Überlegung für eine Kombination von TRAIL mit Bestrahlung waren die distinkten Signalwege, über die Apoptose induziert werden kann. Erste positive Ergebnisse bezüglich Tumor-Eradikation und Apoptose-Induktion wurden mittels nichtinvasiver diffusionsgewichteter MR Bildgebung erhalten (19).

Die ersten Versuche unserer Arbeitsgruppe wurden wenig später an Jurkat-Lymphom-Zellen durchgeführt, wobei sich stark synergistische Effekte in Bcl-2 überexprimierenden Zellen zeigten (7). Es zeigte sich weiterhin, dass eine Apoptose-Resistenz gegenüber Bestrahlung im Allgemeinen nicht einherging mit einer Apoptose-Resistenz gegenüber TRAIL (5). Die synergistische Wirkung von TRAIL, simultan zur Bestrahlung verabreicht, wurde in einer ganzen Reihe von Zellsystemen nachgewiesen (43, 53).

Andererseits führte der Umstand, dass viele humane epitheliale Krebsentitäten den EGF-Rezeptor exprimieren (2), zur Kombination der Strahlentherapie mit

EGFR-Inhibitoren; in erster Linie erhoffte man sich damit einen verstärkten Effekt durch eine Hemmung der Repopulierung (46) bzw. eine Radiosensitivierung (47).

Erste präklinische Arbeiten zur Kombination von C225 mit fraktionierter Strahlentherapie konnten eine Erklärung der verbesserten lokalen Kontrolle durch reduzierte Repopulierung und verbesserte Reoxygenierung von FaDu-Karzinomen liefern (44). In einer aktuellen Veröffentlichung wurde der Nutzen von C225 in Kombination mit Strahlentherapie in einer klinischen Phase III Studie belegt bei Karzinomen des Kopf- und Hals-Bereichs (12); diese Krebsentität zeigt sehr häufig eine hohe EGFR-Expression, was mit einer schlechten Prognose verbunden ist (13).

5.1.4. Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich um vielversprechende maßgeschneiderte Therapieansätze handelt, deren weiterer Validierung es Versuche im Xenograft-Modell bedarf.

5.2. 3D-Isobologramm-Analyse als neues Analyse-Werkzeug

Die exklusiv für Dreifachkombinationen entwickelte dreidimensionale Isobologramm-Analyse (61) ist in besonderem Maße geeignet, präklinisch zu validieren, inwiefern bestimmte Dreifachkombinationen für die klinische Testung von Nutzen sein können.

Ein Problem bleibt aber bestehen: Die dargestellte Theorie kann nicht ausschließen, dass auch Zweifachkombinationen sehr effektiv sind, und nicht entscheiden, welche der beteiligten Modalitäten die treibende Kraft des Synergismus ist.

5.3. Beteiligte Moleküle

Nachdem die Effektivität der Kombinationen gezeigt wurde, haben wir in weiteren Schritten die auf molekularer Ebene beteiligten Komponenten näher untersucht. Die Anwesenheit von Bax sowie die effektive Hemmung der Akt-Phosphorylierung wurden als kritische Parameter für die Erklärung des beobachteten synergistischen Effekts identifiziert.

5.3.1. Bax

Wir beobachteten eine Bax-Abhängigkeit der Dreifachtherapie.

Zum einen war dies daran ersichtlich, dass in Bax-defizienten Zellen absolut gesehen sehr viel niedrigere Apoptoseraten erzielt wurden, zum anderen waren sehr viel höhere TRAIL-Konzentrationen notwendig, um vergleichbare klonogene Zelltodraten zu erreichen.

Daraus lässt sich folgern, dass die Anwesenheit von Bax als „*Conditio sine qua non*“ für die Wirksamkeit der Dreifachtherapie angesehen werden muss.

Dies kann man insbesondere in Zusammenhang mit den Vorarbeiten von Huang und Mitarbeitern sehen, die sogar einen Anstieg in der Bax-Expression nach Behandlung mit Bestrahlung und C225 beobachteten (38). Auch Wendt et al. beschrieben eine starke Rolle von Bax bei Kombinationstherapien bestehend aus Bestrahlung und TRAIL (90).

5.3.2. PI3K

Da Akt und seine übergeordneten Regulatoren bei einer Vielzahl solider Tumore und maligner hämatologischer Erkrankungen dereguliert sind, wird Akt als eine wichtige Determinante von Malignität angesehen sowie als potentielles Ziel für neue Krebstherapien (57).

Zusätzlich führte die Dreifachkombination zu einer merklichen Inhibition der PI3K-abhängigen Akt-/PKB-Phosphorylierung, was das molekulare Substrat für die quantitativen Ergebnisse zu bilden scheint.

Die Inhibition des anti-apoptotischen Akt/PKB-Signalweges sollte daher als weiterer Mechanismus für die synergistische Apoptose-Induktion angesehen werden, wodurch der PI3K die Rolle eines „response marker“ zukommt.

Des Weiteren wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass EGFR-Inhibition für TRAIL-induzierte Apoptose über den Akt/PKB-Signalweg zu sensibilisieren scheint (31, 65, 84).

Daher scheint es insbesondere geboten, EGFR-Inhibition in Zelllinien einzusetzen, die TRAIL-resistent sind, beispielsweise durch konstitutive Hochregulierung von Akt (65).

5.4. Ausblick und Rationale für die präklinische Validierung

Abseits von metastatischen Erkrankungen wurden auch für primäre Konzepte bei Kopf-Hals-Tumoren (12, 67) durch Kombinationen molekular zielgerichteter Medikamente mit klassischer Radiochemotherapie Erfolge erzielt, obwohl bisher gute Studiendesigns fehlen, die diese neue Art der Therapie mit der klassischen Radiochemotherapie vergleichen.

Neuerdings wird auch C225 auch in einer multimodalen neoadjuvanten Therapie des Rektum-Karzinoms eingesetzt. Dabei werden u. a. Capecitabin/5-FU, Irinotecan und C225 mit pelviner Radiotherapie bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen verwendet (37).

Mittlerweile scheint somit die klinische Praxis die präklinische Forschung zu überholen, da zu vielen derzeit in Phase II/III Studien getesteten Kombinationen keine vollständigen präklinischen Daten vorliegen, was beispielsweise an der Dreifachtherapie Cisplatin, C225 und Bestrahlung deutlich wird (67).

Daher scheint es dringend geboten, diese Daten im Vorfeld bereitzustellen, um das korrekte Fundament für weitere klinische Anwendungen zu liefern und die zugrundeliegenden Mechanismen zu eruieren.

6. Zusammenfassung

Die Wirkung einer Kombination von singulären molekular zielgerichteten Substanzen mit ionisierender Strahlung kann durch Behandlungsresistenzen limitiert sein. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob eine molekular zielgerichtete Dreifachkombination, bestehend aus einem agonistischen Antikörper gegen entweder TRAIL-R1 (Mapatumumab) oder TRAIL-R2 (Lexatumumab) sowie einem Antikörper (Cetuximab) gegen den „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR) zur optimierten Tumorzellabtötung in vitro beitragen kann. Da Behandlungsstrategien bestehend aus Bestrahlung und Cisplatin bereits etabliert sind, testeten wir ebenfalls Dreifachtherapien aus Bestrahlung, Cisplatin und TRAIL-R Antikörpern.

Die Apoptose-Induktion nach Dreifachtherapie wurde in den Zelllinien Colo 205, HCT116 und FaDu durch Hoechst 33342-Färbung bestimmt. Der Interaktionsgrad wurde mittels Isobologramm-Analyse ermittelt. Eine Knockout-Variante der Zelllinie HCT116 wurde verwendet, um die Bax-Abhängigkeit der Dreifachtherapie zu untersuchen. Die Rolle des Akt/PKB-Signalweges wurde mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 analysiert. Klonogene Assays wurden durchgeführt, um den Effekt auf das klonogene Überleben der Tumorzellen zu untersuchen.

Ein synergistischer Effekt von Bestrahlung, Cetuximab und agonistischen TRAIL-R Antikörpern ließ sich in Adeno- und Plattenepithelkarzinomzellsystemen nachweisen. Die Effektivität dieses multimodalen Ansatzes war abhängig von Bax und der Inhibierung von Akt/PKB. Parallel mit einer erhöhten Apoptoserate fand sich eine optimierte Eradikation klonogener Tumorzellen. Des Weiteren war es möglich, mittels der Dreifachtherapie aus Bestrahlung, Cisplatin und TRAIL-R-Antikörpern eine verstärkte Zelltod-Induktion zu erreichen.

Unsere Daten deuten darauf hin, dass molekular zielgerichtete multimodale Therapieansätze neue Perspektiven in der Radioonkologie eröffnen könnten.

Die Ergebnisse legen außerdem die Grundlage für eine weitere tierexperimentelle Überprüfung.

7. Literaturverzeichnis

1. Abdollahi T. Potential for TRAIL as a therapeutic agent in ovarian cancer. *Vitam Horm* 67: 347-64, 2004.
2. Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist* 7 Suppl 4: 31-9, 2002.
3. Attard G, Plummer R, de Bono JS, Bale C, Pacey S, Barrett M, Fox NL, Howard T, Ullrich S, Calvert H. Phase I and Pharmacokinetic Study of HGS-ETR2, a Fully Human Agonistic Monoclonal Antibody to TRAIL-R2, in Patients with Advanced Solid Malignancies. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Philadelphia, PA, USA, 2005.
4. Baierlein SA, Distel L, Sieber R, Weiss C, Rodel C, Sauer R, Rodel F. Combined effect of tumor necrosis factor-alpha and ionizing radiation on the induction of apoptosis in 5637 bladder carcinoma cells. *Strahlenther Onkol* 182 (8): 467-72, 2006.
5. Belka C, Betsch A, Marini P, Jendrossek V, Bamberg M, Budach W. [Death inducing ligands in combination with ionizing radiation: objective and current knowledge]. *Strahlenther Onkol* 179 (3): 141-51, 2003.
6. Belka C, Budach W. Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol* 78 (8): 643-58., 2002.
7. Belka C, Schmid B, Marini P, Durand E, Rudner J, Faltin H, Bamberg M, Schulze-Osthoff K, Budach W. Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* 20 (17): 2190-6, 2001.
8. Belkacemi Y, Berger C, Poortmans P, Piel G, Zouhair A, Meric JB, Nguyen TD, Krengli M, Behrensmeier F, Allal A, De Looze D, Bernier J, Scandolaro L, Mirimanoff RO. Management of primary anal canal adenocarcinoma: a large retrospective study from the Rare Cancer Network. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56 (5): 1274-83, 2003.
9. Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis* 137 (2): 122-30, 1978.
10. Bianco C, Tortora G, Bianco R, Caputo R, Veneziani BM, Damiano V, Troiani T, Fontanini G, Raben D, Pepe S, Bianco AR, Ciardiello F. Enhancement of antitumor activity of ionizing radiation by combined treatment with the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Clin Cancer Res* 8 (10): 3250-8., 2002.
11. Bliss CI. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol.* 26: 585-615, 1939.
12. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus

- cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 354 (6): 567-78, 2006.*
13. Bonner JA, Raisch KP, Trummell HQ, Robert F, Meredith RF, Spencer SA, Buchsbaum DJ, Saleh MN, Stackhouse MA, LoBuglio AF, Peters GE, Carroll WR, Waksal HW. Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J Clin Oncol 18 (21 Suppl): 47S-53S., 2000.*
 14. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res 59 (7): 1391-9, 1999.*
 15. Carcaterra M, Osti MF, De Sanctis V, Caruso C, Berardi F, Enrici RM. Adjuvant radiotherapy and radiochemotherapy in the management of esophageal cancer: a review of the literature. *Rays 30 (4): 319-22, 2005.*
 16. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem 56: 881-914, 1987.*
 17. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem 265 (14): 7709-12, 1990.*
 18. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science 275 (5303): 1122-6., 1997.*
 19. Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, Ross BD, Rehemtulla A. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A 97 (4): 1754-9., 2000.*
 20. Contessa JN, Hampton J, Lammering G, Mikkelsen RB, Dent P, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene 21 (25): 4032-41., 2002.*
 21. Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol 168 (3): 1356-61., 2002.*
 22. Daniel PT. Habilitationsschrift: Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren. 2002.
 23. Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D. Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem 39: 73-88, 2003.*
 24. DeVita Jr VT, Oliverio VT, Muggia FM, Wiernik PH, Ziegler J, Goldin A, Rubin D, Henney J, Schepartz S. The drug development and clinical trials programs of the Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute. *Cancer Clinical Trials 2: 195-216, 1979.*
 25. Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, Chen DJ, Kehlbach R, Rodemann HP. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem 280 (35): 31182-9, 2005.*

26. *El-Rayes BF, LoRusso PM. Targeting the epidermal growth factor receptor. Br J Cancer 91 (3): 418-24, 2004.*
27. *Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 391 (6662): 43-50, 1998.*
28. *Ferrigno R, Nakamura RA, Dos Santos Novaes PE, Pellizzon AC, Maia MA, Fogarolli RC, Salvajoli JV, Filho WJ, Lopes A. Radiochemotherapy in the conservative treatment of anal canal carcinoma: retrospective analysis of results and radiation dose effectiveness. Int J Radiat Oncol Biol Phys 61 (4): 1136-42, 2005.*
29. *Forrester HB, Vidair CA, Albright N, Ling CC, Dewey WC. Using computerized video time lapse for quantifying cell death of X-irradiated rat embryo cells transfected with c-myc or c-Ha-ras. Cancer Res 59 (4): 931-9, 1999.*
30. *Gazitt Y. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. Leukemia 13 (11): 1817-24., 1999.*
31. *Gibson EM, Henson ES, Haney N, Villanueva J, Gibson SB. Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release. Cancer Res 62 (2): 488-96, 2002.*
32. *Gores GJ, Kaufmann SH. Is TRAIL hepatotoxic? Hepatology 34 (1): 3-6., 2001.*
33. *Griffith TS, Fialkov JM, Scott DL, Azuhata T, Williams RD, Wall NR, Altieri DC, Sandler AD. Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma. Cancer Res 62 (11): 3093-9, 2002.*
34. *Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, Machtay M, Rosenthal DI, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Weber RS, Muschel RJ. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. Clin Cancer Res 8 (3): 885-92., 2002.*
35. *Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocr Relat Cancer 11 (4): 689-708, 2004.*
36. *Held J, Schulze-Osthoff K. Potential and caveats of TRAIL in cancer therapy. Drug Resist Updat 4 (4): 243-52., 2001.*
37. *Hofheinz RD, Horisberger K, Woernle C, Wenz F, Kraus-Tiefenbacher U, Kahler G, Dinter D, Grobholz R, Heeger S, Post S, Hochhaus A, Willeke F. Phase I trial of cetuximab in combination with capecitabine, weekly irinotecan, and radiotherapy as neoadjuvant therapy for rectal cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 15: 15, 2006.*
38. *Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and*

- radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res 59 (8): 1935-40, 1999.*
39. Janmaat ML, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res 9 (6): 2316-26, 2003.*
 40. Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med 6 (5): 564-7., 2000.*
 41. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A 95 (9): 4997-5002, 1998.*
 42. Kanzler S, Trarbach T, Heinemann V, C.H. K, Sneller V, Bieber F, Kumm E, Galle P, Seeber S. Results of a Phase 2 Trial of HGS-ETR1 (Agonistic Human Monoclonal Antibody to TRAIL Receptor 1) in Subjects with Relapsed or Refractory Colorectal Cancer (CRC). ECCO 13 — the European Cancer Conference, . Paris, France, 2005.
 43. Kim MR, Lee JY, Park MT, Chun YJ, Jang YJ, Kang CM, Kim HS, Cho CK, Lee YS, Jeong HY, Lee SJ. Ionizing radiation can overcome resistance to TRAIL in TRAIL-resistant cancer cells. *FEBS Lett 505 (1): 179-84., 2001.*
 44. Krause M, Ostermann G, Petersen C, Yaromina A, Hessel F, Harstrick A, van der Kogel AJ, Thames HD, Baumann M. Decreased repopulation as well as increased reoxygenation contribute to the improvement in local control after targeting of the EGFR by C225 during fractionated irradiation. *Radiother Oncol 76 (2): 162-7, 2005.*
 45. Krause M, Schutze C, Petersen C, Pimentel N, Hessel F, Harstrick A, Baumann M. Different classes of EGFR inhibitors may have different potential to improve local tumour control after fractionated irradiation: a study on C225 in FaDu hSCC. *Radiother Oncol 74 (2): 109-15, 2005.*
 46. Lammering G. Anti-epidermal growth factor receptor strategies to enhance radiation action. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents 3 (5): 327-33., 2003.*
 47. Lammering G, Hewit TH, Hawkins WT, Contessa JN, Reardon DB, Lin PS, Valerie K, Dent P, Mikkelsen RB, Schmidt-Ullrich RK. Epidermal growth factor receptor as a genetic therapy target for carcinoma cell radiosensitization. *J Natl Cancer Inst 93 (12): 921-9, 2001.*
 48. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med 7 (4): 383-5., 2001.*

49. Leist M, Jaattela M. *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.* *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (8): 589-98, 2001.
50. Loewe S, Muischnek H. *Effect of combinations: mathematical basis of the problem.* *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 114: 313-326, 1926.
51. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib.* *N Engl J Med* 350 (21): 2129-39, 2004.
52. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. *Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling.* *J Biol Chem* 278 (11): 9100-6, 2003.
53. Marini P, Belka C. *Death receptor ligands: new strategies for combined treatment with ionizing radiation.* *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 3 (5): 334-42., 2003.
54. Marini P, Denzinger S, Schiller D, Kauder S, Welz S, Humphreys R, Daniel PT, Jendrossek V, Budach W, Belka C. *Combined treatment of colorectal tumours with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR1 and HGS-ETR2 and radiotherapy: enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo.* *Oncogene* 25 (37): 5145-54, 2006.
55. Marini P, Schmid A, Jendrossek V, Faltin H, Daniel PT, Budach W, Belka C. *Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis.* *BMC Cancer* 5 (5): 5, 2005.
56. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. *A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain.* *Curr Biol* 7 (12): 1003-6, 1997.
57. Mitsiades CS, Mitsiades N, Koutsilieris M. *The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development.* *Curr Cancer Drug Targets* 4 (3): 235-56, 2004.
58. Mitsiades N, Poulaki V, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Stamenkovic I. *Thyroid carcinoma cells are resistant to FAS-mediated apoptosis but sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand.* *Cancer Res* 60 (15): 4122-9, 2000.
59. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. *EGFR and cancer prognosis.* *Eur J Cancer* 37 Suppl 4 (4): S9-15, 2001.
60. Nitsch R, Bechmann I, Deisz RA, Haas D, Lehmann TN, Wendling U, Zipp F. *Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).* *Lancet* 356 (9232): 827-8., 2000.
61. Niyazi M, Belka C. *Isobologram analysis of triple therapies.* *Radiat Oncol* 1 (1): 39, 2006.

62. Niyazi M, Niyazi I, Belka C. Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software. *Radiat Oncol* 2 (4): 4, 2007.
63. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304 (5676): 1497-500, 2004.
64. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277 (5327): 815-8, 1997.
65. Park SY, Seol DW. Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 295 (2): 515-8, 2002.
66. Pathak MA, Matrisian LM, Magun BE, Salmon SE. Effect of epidermal growth factor on clonogenic growth of primary human tumor cells. *Int J Cancer* 30 (6): 745-50, 1982.
67. Pfister DG, Su YB, Kraus DH, Wolden SL, Lis E, Aliff TB, Zahalsky AJ, Lake S, Needle MN, Shaha AR, Shah JP, Zelefsky MJ. Concurrent cetuximab, cisplatin, and concomitant boost radiotherapy for locoregionally advanced, squamous cell head and neck cancer: a pilot phase II study of a new combined-modality paradigm. *J Clin Oncol* 24 (7): 1072-8, 2006.
68. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. Lancet* 355 (9208): 949-55, 2000.
69. Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R, Alderson R, Bloom M, Sung C, Riccobene T, Johnson R, Fiscella M, Mahoney A, Carrell J, Boyd E, Yao XT, Zhang L, Zhong L, von Kerczek A, Shepard L, Vaughan T, Edwards B, Dobson C, Salcedo T, Albert V. HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types *in vitro* and *in vivo*. *Br J Cancer* 92 (8): 1430-41, 2005.
70. Rodel C, Sauer R. Radiotherapy and concurrent radiochemotherapy for rectal cancer. *Surg Oncol* 13 (2-3): 93-101, 2004.
71. Rubel A, Handrick R, Lindner LH, Steiger M, Eibl H, Budach W, Belka C, Jendrossek V. The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines *in vitro*. *Radiat Oncol* 1 (6): 6, 2006.
72. Sainsbury JR, Malcolm AJ, Appleton DR, Farndon JR, Harris AL. Presence of epidermal growth factor receptor as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *J Clin Pathol* 38 (11): 1225-8, 1985.

73. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391 (6662): 96-9, 1998.
74. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91 (4): 443-6, 1997.
75. Scherer E, Sack H. *Strahlentherapie: Radiologische Onkologie*. Vol. 4: Springer, 1996.
76. Schmid B. Diss. Kombinationswirkung von TRAIL und ionisierender Strahlung in Jurkat-Zellen. 2001.
77. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7 (6): 831-6., 1997.
78. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254 (3): 439-59., 1998.
79. Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300 (5616): 135-9, 2003.
80. Steel GG. Introduction: The significance of radiobiology for radiotherapy. In: Steel GG, ed. *Basic Clinical Radiobiology*: Edward Arnold Publishers, 1993.
81. Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5 (1): 85-91, 1979.
82. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103 (4): 645-54, 2000.
83. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H, Okumura K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 7 (1): 94-100., 2001.
84. Teraishi F, Kagawa S, Watanabe T, Tango Y, Kawashima T, Umeoka T, Nisizaki M, Tanaka N, Fujiwara T. ZD1839 (Gefitinib, 'Iressa'), an epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, enhances the anti-cancer effects of TRAIL in human esophageal squamous cell carcinoma. *FEBS Lett* 579 (19): 4069-75, 2005.
85. Thompson DM, Gill GN. The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy. *Cancer Surv* 4 (4): 767-88, 1985.
86. Trott KR. Relation between division delay and damage expressed in later generations. *Curr Topics Radiat Res* 7: 336-337, 1972.
87. Van Valen F, Fulda S, Truckenbrod B, Eckervogt V, Sonnemann J, Hillmann A, Rodl R, Hoffmann C, Winkelmann W, Schafer L, Dockhorn-Dworniczak B, Wessel T, Boos J, Debatin KM, Jurgens H. Apoptotic

- responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Int J Cancer 88 (2): 252-9., 2000.*
88. Vokes EE, Crawford J, Bogart J, Socinski MA, Clamon G, Green MR. Concurrent chemoradiotherapy for unresectable stage III non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res 11 (13 Pt 2): 5045s-5050s, 2005.*
89. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science 292 (5517): 727-30, 2001.*
90. Wendt J, von Haefen C, Hemmati P, Belka C, Dorken B, Daniel PT. TRAIL sensitizes for ionizing irradiation-induced apoptosis through an entirely Bax-dependent mitochondrial cell death pathway. *Oncogene 24 (25): 4052-64, 2005.*
91. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity 3 (6): 673-82., 1995.*
92. Yu R, Mandlekar S, Ruben S, Ni J, Kong AN. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Res 60 (9): 2384-9., 2000.*
93. Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science 290 (5493): 989-92, 2000.*

8. Abkürzungen

8.1. Einheiten

°C	Grad Celsius
g	Gramm
Gy	Gray
kD	Kilodalton
min	Minuten
MV	Megavolt
U	Einheiten (Units)
V	Volt

8.2. Weitere Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AK	Antikörper
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-x _L /Bcl-2-associated Death Promoter
Bak	Bcl-2 Antagonist/Killer

Bax	Bcl-2-associated X Protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma Gene 2
Bcl-x _L	Lange Splicevariante des Bcl-x-Gens
Bcl-x _S	Kurze Splicevariante des Bcl-x-Gens
BH1-4	Bcl-2 Homology Domäne 1-4
Bid	BH-3 Interacting Domäne Death Agonist
BisAA	Bisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
CAD	Caspase Activated DNase
CARD	Caspase Recruitment Domäne
CD95L, bzw. FasL	CD95 Ligand, bzw. Fas Ligand
ced	Caenorhabditis elegans death gene
dATP	Deoxy-Adenosintriphosphat
DcR1 bzw. DcR2	Decoy Receptor 1 bzw. 2
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DR	Death Receptor (z.B. DR3, DR4, DR5, DR6)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGL-1	Egg-laying Defective Gene 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-associated Protein with Death Domain
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FSC	Forward Scatter
FLICE	FADD like ICE
FLIP	FLICE-inhibitory Protein (auch I-FLICE oder FLAME-1 genannt)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor of CAD (auch DFF45 genannt)
ICE	Interleukin-1 β -converting Enzyme
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat Buffered Saline
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PT-Pore	Permeability Transition Pore
Puma	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Natriumdodecylsulfat/Laurylsulfat
SF	Surviving Fraction (Überlebensfraktion)
SSC	Sideward Scatter

TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF Receptor-associated Protein with Death Domain
TRAIL	TNF α -related Apoptosis Inducing Ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

9. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Bamberg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, außerdem für sein stetiges Interesse am Fortgang meiner wissenschaftlichen Arbeit und seine stets aufmunternden Worte.

Besonderen Dank schulde ich meinem Doktorvater Claus Belka für die Überlassung des Themas sowie die kontinuierliche und kompetente Beratung, außerdem für die Möglichkeit der Präsentation meiner wissenschaftlichen Daten auf nationalen wie internationalen Kongressen sowie die Zusammenarbeit bei der Erstellung von gemeinsamen Publikationen.

Dies gilt ebenso für meine Betreuerin Patrizia Marini, die mir trotz des zeitintensiven Klinikaltages immer hilfreich zur Seite stand und meine Arbeit durchweg aufmerksam begleitete.

Für die kontinuierliche Revision meiner Arbeiten sowie sehr hilfreiche Kommentare und Verbesserungsvorschläge möchte ich mich ebenfalls bei Verena Jendrossek bedanken.

Für die Überlassung von Zelllinien und hilfreiche Hinweise möchte ich mich bei Peter T. Daniel, HU Berlin bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Stig Linder, Karolinska Institut, Schweden für Angaben zur Kinetik und Dosierung von Cisplatin.

Außerdem möchte ich mich (dabei besteht keine Korrelation zwischen Reihenfolge und Größe des Danks) bei meinen Laborkollegen Therese Eldh, René Handrick, Guido Henke, Arndt-Christian Müller, Ilka Müller und Amelie Rübel bedanken, die alle für ein gutes Laborklima standen.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Heidi Faltin bedanken, durch die immer eine sehr heitere Stimmung im Labor herrschte, mit der ich manches Mal lustige Stunden an der Sterilbank verbrachte und die auch am Wochenende erreichbar war, wenn ich wieder irgendetwas im Labor angestellt hatte.

Für die großzügige finanzielle Unterstützung bedanke ich mich beim Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir dies alles erst ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Name: Karim-Maximilian Niyazi

Geburtsdatum: 14.02.1985

Geburtsort: Stuttgart

Nationalität: deutsch

Schulzeit

Grundschule Stuttgart-Plieningen (1991 –1995)
Paracelsus-Gymnasium-Hohenheim (1995 - 2002), dabei
zwei Klassen übersprungen (8. und 11. Klasse)

Abitur: 1,0

Preise während der Schulzeit

Ferry Porsche Preis

Landeswettbewerb Mathematik Baden-Württemberg:
mehrere erste Preise

Bundeswettbewerb Mathematik: mehrere erste Preise,
Teilnahme an der Deutschen Mathematik-Olympiade
(DeMO)

Mehrere Auszeichnungen für hervorragende schulische
Leistungen

Extrakurrikuläre Aktivitäten

Teilnahme an mehreren Arbeitsgemeinschaften

Mathematik-Studium für drei Semester an der
„Fernuniversität Hagen“

Programm-Entwicklungen für HP (Hewlett Packard)

Fremdsprachen

Englisch, Französisch, Arabisch, Latein

Studienverlauf	<p>„Physikum“ 2004 („gut“)</p> <p>Vordiplom in Physik 2005 („sehr gut“)</p> <p>Ärztliche Prüfung 14.5.2009 („gut“)</p> <p>Dissertation in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Radioonkologie“ von Prof. C. Belka, Klinik für Radioonkologie Tübingen</p> <p>Diplomarbeit Physik in der Sektion „Biomedizinische Physik“ von Dr. M. Alber</p>
Stipendien	<p>Stipendiat der Konrad-Adenauer-Stiftung (seit 2002), Mitglied des IZKF Tübingen (Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung, 2006)</p>
Wissenschaftliche Interessen	<p>Radioonkologie, Medizinische Physik, Molekularbiologie</p>
Preise	<p>Reisestipendium für den Kongress „Experimentelle Strahlentherapie und klinische Radiobiologie“ in Dresden (2006)</p> <p>Reisestipendium der GlaxoSmithKline-Stiftung für die ESTRO 2006 in Leipzig</p>
Mitgliedschaften	<p>Mitglied der EACR (European Association for Cancer Research) und der ESTRO (European Society of Therapeutic Radiology and Oncology)</p>
Ehrenamtliche Aktivitäten	<p>Mitglied der „Fachschaft Medizin“ (Vertretung der Medizinstudierenden in Tübingen),</p> <p>Mitglied in mehreren Gremien, u. a. in Berufungskommissionen, Forschungskommission, Strukturkommission und im Habilitationsausschuss</p> <p>Mitglied in einem Verein, der sich um Flüchtlinge im Libanon kümmert</p>
Famulaturen	<p>Kardiologie und Herzchirurgie in Stuttgart (2005), Radioonkologie in Tübingen (2006), Innere Medizin in Bahrain (2007)</p>
PJ	<p>Chirurgie und Innere Medizin am UKT, Radioonkologie in Bern (Inselspital) und Tübingen</p>
Sport	<p>Rock 'n' Roll, Tennis</p>

11. Schriftenverzeichnis

11.1. Abstracts

„Wirksamkeit einer Dreifach-Kombinationstherapie aus ionisierender Strahlung sowie TRAIL-Rezeptor-Stimulation und EGF-Rezeptor-Blockade in soliden Tumoren“

K.-M. Niyazi, P. Marini, V. Jendrossek, C. Belka

Abstract + Vortrag auf dem Kongress „Experimentelle Strahlentherapie und klinische Radiobiologie“ in Dresden (2006)

„Wirkungssteigerung der Zweifachkombination aus TRAIL-Rezeptorantikörpern und ionisierender Strahlung durch Kombination mit einer EGFR-Blockade“

K.-M. Niyazi, P. Marini, V. Jendrossek, C. Belka

Abstract + Poster für das Langendorf Meeting in Freiburg (präsentiert durch C. Belka, 2006)

„Tripel-Therapien unter Verwendung der TRAIL-Antikörper HGS-ETR1/-2 in Kombination mit ionisierender Strahlung und EGFR-Blockade an Zelllinien solider Tumoren“

P. Marini, K.-M. Niyazi, V. Jendrossek, C. Belka

Abstract + Vortrag für die DEGRO 2006 in Dresden (Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie, der Vortrag wurde von Dr. Dr. P. Marini gehalten)

“Triple therapies including radiotherapy, agonistic TRAIL-receptor-antibodies and EGFR-inhibition in solid tumour cell lines”

K.-M. Niyazi, P. Marini, V. Jendrossek, C. Belka

Abstract + Vortrag für die ESTRO 2006 in Leipzig

“High efficacy of triple therapies consisting of radiotherapy, agonistic TRAIL-receptor-antibodies and EGFR-inhibition”

M. Niyazi, P. Marini, V. Jendrossek, C. Belka

Abstract + Poster für den AEK Kongress 2007 in Frankfurt

„Hohe Wirksamkeit von Dreifachkombinationen aus Bestrahlung, agonistischen TRAIL-Antikörpern und Cisplatin in vitro“

M. Niyazi, P. Marini, V. Jendrossek, C. Belka

Poster für die DEGRO 2007 in Hannover (Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie)

“Monte Carlo simulation of a multi-wire ionisation chamber for real-time verification of dynamic IMRT delivery”

M. Niyazi, O. Dohm, Z. A. Tung, M. Sikora, M. Alber

Abstract + Vortrag für die ESTRO 2008 in Göteborg

11.2. Publikationen

Niyazi M, Belka C. Isobologram analysis of triple therapies. *Radiat Oncol* 1 (39): 39, 2006

Niyazi M, Niyazi I, Belka C. Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software. *Radiat Oncol* 2 (4): 4, 2007

Welz S, Niyazi M, Belka C and Ganswindt U. Surgery vs. radiotherapy in localized prostate cancer. Which is best? *Radiat Oncol* 3 (23): 23, 2008

Niyazi M*, Marini P*, Daniel PT, Humphreys R, Jendrossek V, Belka C. Efficacy of a Triple Treatment with Irradiation, Agonistic TRAIL Receptor Antibodies and EGFR Blockade. *Strahlenther Onkol* 185 (1): 8-18, 2009

Niyazi M, Marini P, Daniel PT, Humphreys R, Jendrossek V, Belka C. Efficacy of triple therapies including ionising radiation, agonistic TRAIL antibodies and cisplatin. *Oncol Rep* 21 (6): 1455-60, 2009

Marini P, Budach W, Niyazi M, Junginger D, Stickl S, Jendrossek V, Belka C. Combination of the pro-apoptotic TRAIL-receptor antibody mapatumumab with ionizing radiation strongly increases long-term tumor control under ambient and hypoxic conditions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* (in press): 1-5, 2009