Der Einfluss des Stammzellmarkers ALDH und des EGFR-PI3 Kinase-Akt Signalwegs auf die Strahlenresistenz humaner Tumorzelllinien

Dissertation zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fakultät Naturwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Zoologie, Universität Hohenheim

Sektion für Strahlenbiologie & Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen

> vorgelegt von Julia Mihatsch

> > aus

Schorndorf

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. rer. nat. H. Peter Rodemann
2. berichtende Person:	Prof. Dr. rer. nat. Martin Blum
Eingereicht am:	28. Februar 2014
Mündliche Prüfung am:	14. Juli 2014

Die vorliegende Arbeit wurde am 5. Mai 2014 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften" angenommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Krebserkrankungen sind weltweit die zweithäufigste Todesursache in Industrienationen. Neben der chirurgischen Entfernung und chemotherapeutischen Behandlung des Tumors ist Bestrahlung die wichtigste Therapieform, die heutzutage ca. 60% der Patienten erhalten. Diese sprechen allerdings unterschiedlich auf die Strahlentherapie an. Auf der einen Seite gibt es gut heilbare Patienten mit relativ strahlensensiblen Tumoren. Andererseits jedoch kann Patienten mit sehr strahlenresistenten Tumoren mittels Bestrahlung meist nicht geholfen werden. Der strahlenresistente Phänotyp bestimmter Zellen eines Tumors ist schuld an der Erfolglosigkeit der Therapie bzw. das Nicht-Ansprechen darauf. Man nimmt an, dass das Ergebnis der Therapie hauptsächlich davon abhängt, wie hoch das Potential der Strahlung ist, Wachstum, Proliferation und Überleben ganz bestimmter Krebszellen zu kontrollieren. Diese Zellen werden Tumorstammzellen (TSZ) oder Tumor-initiierende Zellen genannt. Basierend auf experimentellen Studien geht man davon aus, dass der Anteil von TSZ am Tumorvolumen in unterschiedlichen Tumorentitäten variiert, und im Allgemeinen relativ gering ist. Laut der Tumorstammzell-Hypothese hängt die individuelle Strahlenantwort von Tumoren von TSZ ab, da diese anscheinend langsam replizierenden Zellen die Fähigkeit besitzen, Tumore (also auch Rezidive) zu initiieren, sowie - wie normale Stammzellen - die Fähigkeit, sich selbst zu erneueren und die heterogenen Abstammungslinien eines Tumors zu generieren.

In der Strahlentherapie spielt neben der Existenz von TSZ auch die strahleninduzierte Aktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und seinen downstream Signalkaskaden, wie z.B. dem Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K)/Akt Signalweg, dem *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg und dem JAK/STAT Signalweg eine wichtige Rolle. Hierbei ist der PI3K/Akt Signalweg zentral für das Überleben von Tumorzellen nach Bestrahlung. Die Aktivierung von Akt führt zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs). Dieses Enzym ist maßgeblich an der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen durch das Nicht-homologe *end joining* (NHEJ) beteiligt.

Ш

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von TSZ für die Strahlenresistenz radioselektierter Klone von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen (NSCLC) und Brustkrebszellen zu untersuchen. Des Weiteren sollte die Beteiligung des EGFRabhängigen PI3K/Akt/DNA-PKcs Signalings an möglicherweise TSZ-vermittelter Strahlenresistenz beleuchtet werden. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Es konnten strahlenresistente Tumorzellpopulationen der Linien A549 (NSCLC) und SK-BR-3 (Brustkrebs) mittels eines Radioselektionsprozesses *in vitro* isoliert werden.
- Radioselektierte Zellen zeigten eine verlängerte Verdopplungszeit sowie eine verringerte Koloniebildungseffizienz, was wahrscheinlich der Biologie von TSZ entspricht.
- 3) Von den untersuchten potentiellen TSZ-Markern CD133, Oct-4, Sox2 und Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) war einzig die Expression des embryonalen Stammzellmarkers Oct-4 in den radioselektierten Brustkrebszellen SK-BR-3 erhöht. Für A549 Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität der ALDH, nicht aber eine veränderte Proteinexpression, in Zusammenhang mit Strahlenresistenz steht.
- 4) Weiterhin konnte in Bezug auf diese Strahlenresistenz ein Zusammenhang zwischen ALDH-Aktivität und PI3K-Signalweg hergestellt werden.
- 5) Mittels siRNA konnte eine gegensätzliche Wirkung von ALDH1 und ALDH2 auf das Überleben von Tumorzellen nach Bestrahlung gezeigt werden. Während die ALDH1-Expression einen Vorteil für die untersuchten Zellen darstellte, bedeutete die ALDH2-Expression hier einen Nachteil.
- Die Strahlenresistenz der radioselektierten A549 Zellen wurde teilweise durch eine EGFR/PI3K/DNA-PKcs-abhängige DNA-Doppelstrangbruchreparatur vermittelt.

Aufgrund der in dieser Studie erzielten Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass das gezielte Targeting des PI3K/Akt Signalwegs und der ALDH1 wichtige Vorgehensweisen in der Überwindung TSZ-vermittelter Resistenz von Tumoren während der Strahlentherapie darstellen könnten.

Summary

Cancer is the second leading cause of death in industriated nations. Besides surgury and chemotherapy, radiotherapy (RT) is an important approch by which about 60% of patients are treated. The response of these patients to RT is very heterogenous. On the one hand, there are patients with tumors which are radiosensitive and can be cured, but on the other hand patients bear tumors which are quite resistant to radiotherapy. A Radioresistant phenotype of tumor cells causes treatment failure consequently leading to a limited response to radiotherapy. It is proposed, that radiotherapy outcome mainly depends on the potential of radiation on controlling growth, proliferation and survival of a specific population of tumor cells called cancer stem cells (CSCs) or tumor-initiating cells. Based on experimental studies so far reported it is assumed that the population of CSC varies in tumors from different entities and is relatively low compared to the tumor bulk cells in general. According to the CSC hypothesis, it might be concluded that the differential response of tumors to radiotherapy depends on CSC populations, since these supposedly slow replicating cells are able to initiate a tumor, to self renew indefinitely and to generate the differentiated progeny of a tumor.

Besides the role of cancer stem cells in radiotherapy response, ionizing radiation (IR) activates the epidermal growth factor receptor (EGFR) and its downstream signaling pathways such as phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) pathways. Among these pathwas, PI3K/Akt is one of the most important pathways involved in post-irradiation survival: Activation of Akt results in activation of DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit (DNA-PKcs). DNA-PKcs is a core enzyme involved in repair of IR-induced DNA-double strand breaks (DNA-DSB) through non-homologous end joining (NHEJ).

The aim of the present study was to investigate the role of CSCs in resistance of radioselected subclones of non-small cell lung cancer (NSCLC) and breast cancer cells to irradiation. Additionally, the role of EGFR dependent PI3K/Akt/DNA-PKcs

VI

signaling in the context of CSC-mediated radiotherapy resistance was investigated. The following major results were obtained:

- Radioresistant tumor cells from NSCLC-A549 cells as well as SK-BR-3 breast cancer cells could be isolated *in vitro* by a radioselection process.
- In line with the proposed CSC biological behaviors radioselected cells presented extended population doubling time and decreased plating efficiency.
- 3) Among identified potential CSC markers such as CD133, Oct-4, Sox2 or aldehyde dehydrogenase (ALDH) expression, solely expression of the embryonic stem cell marker Oct-4 was increased in the radioselected SK-BR-3 cells. However, increased ALDH activity but not enhanced ALDH protein expression was associated with radioresistance of A549 cells.
- 4) Respectively, ALDH activity was found to be involved in radioresistance partially through PI3K pathway.
- 5) Using an siRNA approach, a differential effect of ALDH1 vs ALDH2 in terms of post-irradiation survival of tumor cells was demonstrated. In this context and in contrast to the role of ALDH2 a prosurvival effect of ALDH1 could be observed.
- Radioresistance of IR-selected tumor cells was partially mediated through EGFR/PI3K/DNA-PKcs-dependent accelerated repair of DNA-DSBs.

Thus, based on the described major findings in this study it is proposed that targeting of PI3K/Akt pathway and ALDH1 might be effective approaches towards overcoming CSC-mediated radiotherapy resistance.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	III
ABKÜRZUNGEN	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Krebs, Strahlentherapie und Therapieresistenz	
1.2 Der EGFR-PI3K-Akt Signalweg und die DNA-Reparatur	
1.2.1 Der EGF-Rezeptor	3
1.2.2 PI3K und Proteinkinase B/Akt	5
1.2.3 Die Non Homologous End-Joining DNA-DSB Reparatur	6
1.2.4 Die Rolle des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs für die DNA-DSB Reparatur	7
1.3 Die Bedeutung von Tumorstammzellen in der Strahlentherapie	
1.3.1 Die Tumorstammzelltheorie	10
1.3.2 Tumorstammzellmarker	11
1.3.3 Mögliche Ziele in TSZ für , Targeted Molecular Therapies'	16
1.4 Zielsetzung	
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Material	
2.1.1 Zelllinien	20
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Geräte und Software	21
2.1.4 Lösungen und Puffer	21
2.1.5 Inhibitoren und small interfering RNA (siRNA)	23
2.1.6 Antikörper	23
2.1.7 Kits	23
2.2 Methoden	
2.2.1 Zellkultur	24
2.2.2 Verdopplungszeit	24
2.2.3 Bestrahlung	24
2.2.4 Radioselektion	24

Inhaltsverzeichnis

2.2.6 Seneszenz-assoziierte ß-Galaktosidase-Färbung	.26
2.2.7 γH2AX Focus Assay	.26
2.2.8 Western Blot Analyse	.27
2.2.9 Behandlung mit Inhibitoren	.28
2.2.10 Transfektion mit spezifischer siRNA	.29
2.2.11 Isolation von Tumorstammzellen	.29
2.2.12 Densitometrische Auswertung und Statistik	.30
3. ERGEBNISSE	31
3.1 Strahlenbiologische Charakterisierung von radioselektierten humanen Tumorzellen	31
3.1.1 Klonogenes Überleben und Strahlenresistenz radioselektierter Tumorzellen	.31
3.1.2 Verdopplungszeit radioselektierter Tumorzellen	.33
3.1.3 Die Transienz des strahlenresistenten Phänotyps	.34
3.1.4 Seneszenz-assoziierte ß-Galaktosidase-Aktivität	.35
3.2 Die Rolle des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs und der DNA-Reparatur für die	
Strahlenresistenz radioselektierter Tumorzellen	37
3.2.1 Einfluss einer EGFR-Hemmung auf klonogenes Überleben und Strahlenresistenz	.37
3.2.2 Einfluss einer PI3K-Hemmung auf klonogenes Überleben und Strahlenresistenz	.38
3.2.3 Die Rolle der DNA-Reparatur für die Strahlenresistenz	.40
3.3 Können durch Radioselektion humaner Tumorzelllinien TSZ-Marker exprimierende	
Subpopulationen angereichert werden?	43
3.3.1 CD133, Oct-4 und Sox2 Expression	.43
3.3.2 Aldehyd-Dehydrogenasen	.45
3.4 Die Strahlenresistenz von ALDH ^{br} und ALDH ^{low} Populationen humaner Tumorzelllinien	
und die Rolle des PI3K-Akt Signalwegs	49
3.4.1 Koloniebildungseffizienz und klonogenes Überleben nach ionisierender Strahlung von ALDH ^{br} und	
ALDH ^{low} Zellen	.50
3.4.2 Die Rolle des PI3K-Akt Signalwegs für die Strahlenresistenz von ALDH ^{br} Tumorzellen	.51
3.5 Die Rolle von Aldehyd-Dehydrogenasen für die Strahlenresistenz humaner	
Tumorzelllinien	53
3.5.1 Auswirkungen einer Hemmung von ALDH durch Diethylaminobenzaldehyd	.53
3.5.2 Proteinexpressionsmuster verschiedener ALDH Isoformen in vier humanen Tumorzelllinien	.58

Inhaltsverzeichnis

3.5.3 Transfektion mit ALDH1A1 oder ALDH2 siRNA und klonogenes Überleben nach ionisierender	
Bestrahlung	.60
4. DISKUSSION	64
4.1 Durch mehrfache Bestrahlung können strahlenresistente Klone aus Tumorzelllinien in	
vitro selektiert werden	64
4.2 Die Strahlenresistenz der radioselektierten Tumorzellen ist abhängig von der EGFR-	
PI3K-Akt-vermittelten DNA-Reparatur	66
4.3 Die Bedeutung von Tumorstammzellen in radioselektierten Tumorzellpopulationen	69
4.3.1 Expression von Tumorstammzellmarkern	.69
4.3.2 Die Aktivität von Aldehyd-Dehydrogenasen	.72
4.4 Die Rolle von Aldehyd-Dehydrogenasen für die Strahlenresistenz von Tumorzellen	73
4.5 Abschließende Besprechung/ Schlussfolgerungen	78
5. LITERATURVERZEICHNIS	80
CURRICULUM VITAE	93
DANKSAGUNGEN	96
Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der	
Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat	97

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c, con	Kontrolle
CD	Cluster of differentiation
ĊSC	Cancer stem cell (Tumorstammzelle)
DAPI	4' 6-Diamidino-2-Phenylindol
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd
DMEM	Dulbecco's Modified Fagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
	Desoxyribonukleinsäure
	DNA-Doppelstrangbruch
	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
	Doppoletranghruch
	Doubling time (Vordenplungszeit)
	Doubling time (verdopplungszeit)
	Enhanced Chamilumineseenee
ECL	
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumstaktor-Rezeptor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fotales Kalberserum
ggt.	gegebenenfalls
Gy	Gray
H2O _{dest}	Destilliertes Wasser
HRP	Horseradish peroxidase
IP	Immunprazipitation
IR	Ionisierende Strahlung
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
Lsg.	Lösung
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper
ml	Milliliter
NHEJ	Nicht-homologes end joining
nM	Nanomolar
Oct-4	Octamer binding transcription factor 4
р-	phospho-
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Plating efficiency (Koloniebildungseffizienz)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PS	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SA-ß-Gal	Seneszenz-assoziierte Beta-Galaktosidase
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SF	Survival fraction (Überlebensrate)
siRNA	Small interfering RNA
Sox2	SRY (sex determining region Y) -box 2
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSZ	Tumorstammzelle
WB	Western Blot
μM	Mikromolar
•	

1. EINLEITUNG

1.1 Krebs, Strahlentherapie und Therapieresistenz

Jedes Jahr werden in Deutschland etwa eine halbe Million Krebsneuerkrankungen diagnostiziert, und aufgrund des zunehmenden Lebensalters wird diese Zahl weiter ansteigen (Robert Koch Institut). Für den größten Anteil krebsbedingter Todesfälle ist bei Frauen nach wie vor Brustkrebs, bei Männern Lungenkrebs verantwortlich. Doch die altersstandardisierte Krebssterblichkeit geht im Allgemeinen seit Jahrzehnten zurück, und mehr als die Hälfte aller Patienten in Deutschland kann momentan mit dauerhafter Heilung rechnen (Deutsches Krebsforschungszentrum).

Dies ist nicht zuletzt auf die stetig verbesserte Behandlung der Patienten mit moderner Strahlentherapie zurückzuführen, die neben der chirurgischen Entfernung des Tumors und der Chemotherapie die wichtigste Therapieform bei Krebserkrankungen darstellt. Eingesetzt wird heutzutage hauptsächlich hochenergetische Röntgenstrahlung aus linearen Teilchenbeschleunigern (*linear accelerator*, Linac). Ungefähr jeder zweite Krebspatient erhält eine oder mehrere Strahlentherapien, die entweder kurativ oder palliativ, sowie eventuell adjuvant (nach einer Operation) oder neoadjuvant (vor einer Operation) angewendet werden. Auch die Kombination Radiochemotherapie kommt häufig zum Einsatz, jedoch ist hierbei der therapeutische Zugewinn eher gering [Tannock, 1996]. Da die maximal verabreichbare Strahlendosis durch Normalgewebsreaktionen limitiert ist, wird die nötige Gesamtdosis standardmäßig in Fraktionen von 1,8 bis 2,0 Gray (Gy) aufgeteilt, was dem umliegenden Normalgewebe Zeit gibt, sich zu erholen, und gleichzeitig die Tumorzellen so stark wie möglich schädigt [Joiner & Van der Kogel, 2009; Withers, 1975].

Die Wirkung der Strahlentherapie beruht auf der indirekten oder direkten irreparablen Schädigung der Erbsubstanz (*deoxyribonucleic acid*, DNA) durch ionisierende Strahlung (IR), in deren Folge die Tumorzelle ihre Teilungsfähigkeit verliert oder direkt zugrunde geht; insbesondere DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs) spielen hierbei eine Rolle. In einer durchschnittlichen Säugerzelle induziert eine Strahlendosis von 1 Gy etwa 30 bis 40 DNA-DSBs, die im Normalfall größtenteils vom DNA-Reparatursystem der Zelle repariert werden können [Joiner & Van der Kogel,

1. Einleitung

2009]. Weitere zu beobachtende DNA-Schäden nach IR sind DNA-Einzelstrangbrüche, Basenschäden, DNA-Protein-Verbindungen und sogenannte *bulky lesions*, d.h. Anhäufungen verschiedener Schadensarten dicht nebeneinander. Das Verständnis der Regulation von DNA-Reparaturprozessen in bestrahlten Tumorzellen kann helfen, um gezielt im Sinne einer ,*Targeted Molecular Therapy'* das Ergebnis der Strahlentherapie zu verbessern [Golding *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2012].

Der Grund für immer noch häufig auftretende Rezidive bzw. das Hauptproblem, mit dem insbesondere die Chemo- und Strahlentherapie zu kämpfen hat, sind Resistenzmechanismen der Tumorzellen, die es zu überwinden gilt - wie zum Beispiel die oben erwähnten DNA-Reparatursysteme. Es konnte beobachtet werden, dass strahlenresistente Cervixkarzinomzellen eine erhöhte Expression der Reparaturenzyme *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* (DNA-PKcs), Ku70 und Ku86 aufweisen [Beskow *et al.*, 2009]. Auch andere Mechanismen und Gegebenheiten wie Repopulation während Bestrahlungspausen [Baumann *et al.*, 2003], hypoxische Tumorareale [Overgaard, 2007], Entgiftung freier Radikale [Guo *et al.*, 2012] oder Veränderungen in Apoptose-Signalwegen [Cho *et al.*, 2006; Friesen *et al.*, 1997], im Metabolismus [Soga, 2012] oder in der Zellzyklusregulation [Anastasov *et al.*, 2012] tragen zur intrinsischen Resistenz von Tumorzellen bzw. Tumoren gegenüber Bestrahlung und/oder Chemotherapeutika bei. Zudem entwickeln sich während der Therapie nicht selten sekundäre Resistenzen.

Seit einiger Zeit werden Tumorsubpopulationen mit intrinsischer Therapieresistenz (und anderen bestimmten Eigenschaften) gerne unter dem Begriff "Tumorstammzellen" (TSZ) oder auch "Tumor-initiierende Zellen" zusammengefasst. Die Theorie dieser besonders chemo- und strahlenresistenten Zellen [Alison *et al.*, 2012; Brunner *et al.*, 2012] soll in Abschnitt 1.3 eingeführt werden. Ob man nun von Tumorstammzellen reden möchte oder nicht, das Verständnis von spezifischen, resistenzvermittelnden Signalwegen strahlenresistenter Tumorsubpopulationen ist von zentraler Bedeutung, um diese Zellen mittels molekularem Targeting in Kombination mit Bestrahlung abzutöten, um so das Wiederauftreten der Krebserkrankung zu verhindern. In diesem Zusammenhang spielen der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) und EGFR-

vermittelte Signalkaskaden, die im nächsten Abschnitt eingehend beschrieben werden sollen, eine wichtige Rolle [Zips *et al.*, 2008].

1.2 Der EGFR-PI3K-Akt Signalweg und die DNA-Reparatur

1.2.1 Der EGF-Rezeptor

Der EGFR (ErbB1/Her1) gehört zur ErbB-Familie der (Klasse I) Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), die eine Schlüsselrolle in der Regulation von Zellwachstum, Zellüberleben, Proliferation und Differentiation spielen, indem sie diesbezügliche Signale von ausserhalb der Zelle an eine Vielzahl von intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden weiterleiten. Neben ErbB1 gehören ErbB2/Her2/*neu*, ErbB3/ Her3 und ErbB4/Her4 zur Familie der ErbB-Rezeptoren, alle vier sind durch eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne - bei EGFR, ErbB2 und ErbB4 mit Tyrosinkinaseaktivität charakterisiert [Ullrich & Schlessinger, 1990; Yarden, 2001]. Liganden des EGFR sind zum Beispiel der Epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF), TGF- α (*transforming growth factor alpha*) oder Amphiregulin; an ErbB3 und ErbB4 binden verschiedene Neureguline [Yarden, 2001], während aktuell keine Liganden des ErbB2-Rezeptors bekannt sind.

Nach der Bindung eines Liganden kommt es zur Dimerisierung gleicher (Homo-) oder unterschiedlicher ErbB-Rezeptoren (Heterodimerisierung) [Yarden, 2001]. Dieser Vorgang aktiviert die Tyrosinkinase der intrazellulären Domäne der beteiligten Rezeptoren, was zu Autophosphorylierung sowie Phosphorylierung anderer Proteine führt [Ullrich & Schlessinger, 1990]. EGFR-abhängige Signalkaskaden, die an der Regulation unzähliger verschiedener zellulärer Mechanismen beteiligt sind, sind zum Beispiel der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)-Akt-, der Januskinase (JAK)-*signal transducer and activator of transcription* (STAT)-, der *rat sarcoma* (Ras)-*mitogen-activated protein kinase* (MAPK)- oder der Phospholipase C gamma (PLCγ)-Signalweg [Berclaz *et al.*, 2001; Chattopadhyay *et al.*, 1999; Waters *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 2002] (Abb. 1.1). Von besonderem Interesse für die Krebsforschung sind diese Signalkaskaden in Zusammenhang mit der Regulation von Metastasierung, Proliferation, Überleben/Apoptose, Zellzyklus und Zellmotilität [Rodemann *et al.*, 2007]. Nicht nur Ligandenbindung, sondern auch ionisierende

1. Einleitung

Strahlung wie Röntgen- oder Gammastrahlung können die Aktivierung des EGFR und EGFR-vermittelten Signalwegen induzieren [Dent *et al.*, 2003]. Es verwundert nicht, dass die oben genannten Signalwege eine wichtige Rolle für die Strahlenresistenz von Tumorzellen spielen [Zips *et al.*, 2008]. Insbesondere für den PI3K-Akt Signalweg konnte dies in verschiedenen Studien gezeigt werden [Brognard *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2002; McKenna *et al.*, 2003; Toulany *et al.*, 2007].



Abb. 1.1: Schematische Darstellung der EGFR (ErbB1)-abhängigen Signalkaskaden PI3K-Akt, JAK-STAT, PLC γ -PKC und Ras-Raf-MAPK. Die Dimerisierung und dadurch bedingte Aktivierung des EGFR wird durch Liganden wie EGF oder ionisierende Strahlung (Röntgen- oder Gammastrahlung) induziert. Das EGFR-Netzwerk reguliert vielfältige Mechanismen wie Zellüberleben, Apoptose, DNA-Reparatur, Proliferation, Differentiation oder Transformation, was letztendlich zum Teil die erhöhte Strahlenresistenz von Tumorzellen bedingt (Rodemann *et al.*, 2007).

In zahlreichen Tumoren ist der EGFR, wie auch ErbB2, überexprimiert oder mutiert [Holbro & Hynes, 2004]. Solche Veränderungen können zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors und nachgeschalteter Signalkaskaden wie z.B. des PI3K-Akt Signalwegs führen, was übermäßige Proliferation, verminderte Apoptose und erhöhte Resistenz gegenüber Strahlentherapie nach sich zieht [Akimoto *et al.*, 1999; Giralt *et al.*, 2005; Lammering *et al.*, 2003]. Der EGFR ist daher Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte, in denen es darum geht, therapeutisch einsetzbare Inhibitoren zu finden. Bereits zugelassene Medikamente sind zum Beispiel die Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) Gefitinib (*Iressa*©) und Erlotinib (*Tarceva*©), sowie die monoklonalen Antikörper Cetuximab (*Erbitux*©) und Panitumumab (*Vectibix*©).

1.2.2 PI3K und Proteinkinase B/Akt

Die ubiquitäre Superfamilie der PI3-Kinasen wird in die vier funktionell und strukturell unterschiedlichen Klassen I (A, B), II und III, sowie die assoziierte Klasse IV eingeteilt, zu der die Serin/Threoninkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*), mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und DNA-PKcs gehören. Im diesem Abschnitt soll nur auf die heterodimeren Klasse IA PI3Ks eingegangen werden, die aus einer regulatorischen (p85, 85kDa) und einer katalytischen (p110, 110kDa) Untereinheit bestehen und durch RTKs wie ErbB1 aktiviert werden. Dies geschieht zum Beispiel durch die Bindung der phosphorylierten RTK an die *Src homology-2* (SH2)-Domäne der regulatorischen Untereinheit p85 [Songyang *et al.*, 1993], die anschließend die katalytische Untereinheit p110 aktiviert [Carpenter *et al.*, 1993], oder über das RTK-regulierte G-Protein Ras, welches p110 direkt aktiviert [Rodriguez-Viciana *et al.*, 1994; Sjolander *et al.*, 1991].

Die aktivierte PI3K katalysiert die Phosphorylierung des in der Zellmembran verankerten Substrates Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphat (PIP₂) [Cantley, 2002]. Das Produkt, der *second messenger* Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP₃) rekrutiert die Proteinkinase B (PKB)/Akt zur Zellmembran [Andjelkovic *et al.*, 1997]. Hier erfolgt die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an Thr308 durch die Proteinkinase PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*), die ebenso durch PIP₃ zur Zellmembran rekrutiert wurde [Alessi *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1998]. Seine vollständige Aktivität erlangt Akt jedoch erst durch die Phosphorylierung an Ser473, wobei noch nicht ganz geklärt ist, welche Kinase(n) dafür verantwortlich ist/sind. Sehr wahrscheinlich erfolgt die Phosphorylierung an Ser473 durch Autophosphorylierung [Toker & Newton, 2000] und/oder eine hypothetische Kinase namens "PDK2" (*phosphoinositide-dependent kinase-2*), für die verschiedene Kandidaten, unter anderem auch die DNA-PKcs, vorgeschlagen wurden [Dong & Liu, 2005; Feng *et al.*, 2004].

Die von der PI3K über PDK1/PDK2 aktivierte Serin/Threoninkinase PKB/Akt phosphoryliert eine große Zahl an unterschiedlichen Substraten und reguliert so eine Reihe von wichtigen zellulären Funktionen wie Zellüberleben/Apoptose [Nicholson & Anderson, 2002], Angiogenese [Kumar *et al.*, 2005], Proliferation/Zellzyklus [Chang *et al.*, 2003; Lawlor & Alessi, 2001], Glukosemetabolismus [Wieman *et al.*, 2007] oder Zellmigration [Park *et al.*, 2006]. Einige der Substrate von PKB/Akt sind in die transkriptionelle Regulation des Zellüberlebens involviert [Song *et al.*, 2005]. Es gibt drei PKB/Akt Isoformen: PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 und PKB γ /Akt3, wobei Akt1 und Akt2 am besten untersucht sind.

In vielen Tumoren sind Amplifikationen oder Mutationen der Gene, die für PI3K und Akt kodieren, zu beobachten [Liu *et al.*, 2009]. Bedeutend sind zudem *loss-of-function* Genmutationen oder Deletionen der Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) [Ali *et al.*, 1999], ein Gegenspieler der PI3K und daher Tumorsuppressor. Diese genetischen Veränderungen können, wie auch die schon erwähnten Mutationen und Amplifikationen des EGFR oder ErbB2, zu einer Überaktivierung des PI3K-Akt Signalwegs und in Konsequenz zu Malignität führen.

1.2.3 Die Non Homologous End-Joining DNA-DSB Reparatur

In Säugerzellen werden DNA-DSBs haupsächlich durch das sehr komplexe *Non Homologous End-Joining* (NHEJ) repariert. Im Gegensatz zum alternativen Mechanismus, der homologen Rekombination (HR), wird für das NHEJ keine Matritze in Form einer homologen DNA-Sequenz benötigt [Critchlow & Jackson, 1998]. Die DNA-Enden der beschädigten Stränge können direkt mit Hilfe von Reparaturenzymen zusammengefügt werden. Wie die Zelle entscheidet, ob reparable DNA-DSBs über den Mechanismus des NHEJ oder über den der HR repariert werden, ist nicht gänzlich aufgeklärt, ist aber grundsätzlich vom Zellzyklus abhängig. Die HR kann nur während der späten S-Phase und der G2-Phase des Zellzyklus stattfinden, da hierfür die Schwesterchromatide als Templat herangezogen werden muss. Hingegen steht das NHEJ während des gesamten Zellzyklus zur Verfügung, findet aber meist während der G0/G1-Phase statt [Takata *et al.*, 1998]. Irreparable DNA-Schäden leiten im Allgemeinen entweder die Apoptose oder den "reproduktiven Tod" der betroffenen Zelle ein.

Das zentrale Reparaturenzym des NHEJ ist die DNA-PK, die aus den Untereinheiten Ku (Ku70/Ku80 Heterodimer) und der Serin/Threoninkinase DNA-PKcs besteht [Dvir *et al.*, 1992; Gottlieb & Jackson, 1993]. Tritt - zum Beispiel nach Bestrahlung - ein DNA-DSB auf, erkennt und bindet Ku die freien Enden der DNA

[Ramsden & Gellert, 1998]. Nachfolgend wird die DNA-PKcs über deren Nterminale Domäne an Ku gebunden und aktiviert [Davis *et al.*, 2013; Gottlieb & Jackson, 1993]. Die Autophosphorylierung der DNA-PKcs am sogenannten "ABCDE-Cluster" (Serin/Threoninreste zwischen Position 2609 und 2647) und die Phosphorylierung an Ser2056 spielen eine zentrale Rolle für die erfolgreiche NHEJ-Reparatur von DNA-DSBs [Chen *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2003; Povirk *et al.*, 2007]. Es konnte gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung die Phosphorylierung von Thr2609 und Ser2056 induziert, und dass Mutationen an diesen Stellen zu erhöhter zellulärer Strahlensensibilität führen [Chan *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Nagasawa *et al.*, 2011]. Im weiteren Verlauf des NHEJ phosphoryliert die aktivierte DNA-PKcs unter anderem das Protein Xrcc4 (x*-ray cross-complementing 4*) [Leber *et al.*, 1998], welches daraufhin einen Komplex mit der DNA-Ligase IV bildet. Die Autophosphorylierung der DNA-PKcs führt zu deren Dissoziation [Chan & Lees-Miller, 1996], und ermöglicht abschließend die Ligation der DNA-Enden durch den DNA-Ligase IV/Xrcc4-Komplex [Junop *et al.*, 2000].

1.2.4 Die Rolle des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs für die DNA-DSB Reparatur

Vor einigen Jahren konnten Toulany et al. [2006] in K-RAS_{mt} Lungenkarzinomzellen zeigen, dass die Reparatur von IR-induzierten DNA-DSBs beeinträchtigt war, nachdem der EGFR bzw. die PI3K mit Hilfe des Tyrosinkinase-Inhibitors BIBX1382BS bzw. LY294002 inhibiert wurde. Damit einhergehend war abhängig von K-RAS_{mt} jeweils eine Reduktion der IR-induzierten Phosphorylierung der DNA-PKcs an Thr2609 zu beobachten. Es konnte zudem festgestellt werden, dass auch die Hemmung des PI3K-Effektors Akt1 mittels Inhibitor bzw. AKT1-siRNA zur Reduktion der IR-induzierten Phosphorylierung der DNA-PKcs an Thr2609 und Ser2056 und in Folge zu einer Beeinträchtigung der DNS-DSB-Reparatur führte [Toulany et al., 2006; Toulany et al., 2008]. Dies stand hierbei in Zusammenhang mit erhöhter zellulärer Strahlensensibilität. Auch die Daten anderer Gruppen weisen darauf hin, dass die Strahlensensibilisierung, die durch Inhibition des PI3K-Akt Signalwegs hervorgerufen wird, eine Folge beeinträchtigter DNA-DSB-Reparatur und daraus resultierendem reproduktivem Zelltod sein könnte [Choi et al., 2010; Golding et al., 2009; Kao et al., 2007]. Es scheint, als spiele Akt eine wichtige Rolle in der Regulation des NHEJ. Tatsächlich gibt es Hinweise darauf,

dass Akt direkt mit der DNA-PKcs interagiert [Toulany *et al.*, 2012]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Akt die DNA-DSB-Reparatur über drei Funktionen regulieren kann: (a) Die Komplexbildung von Akt und der DNA-PKcs stimuliert die Bindung der DNA-PKcs an Ku-markierte freie DNA-Enden, (b) die Komplexbildung von Akt und der DNA-PKcs aktiviert die DNA-PKcs, (c) die Stimulierung der Autophosphorylierung der DNA-PKcs durch Akt bewirkt deren Dissoziation, so dass die DNA-Reparatur abgeschlossen werden kann.

1.3 Die Bedeutung von Tumorstammzellen in der Strahlentherapie

Die inzwischen meist frühzeitige Erkennung von Tumoren sowie verbesserte Behandlungsmöglichkeiten haben die Mortalitätsrate von Krebs im Allgemeinen zwar gesenkt [Ferlay et al., 2007], dennoch stellt das immernoch häufige Auftreten von Rezidiven nach Strahlen- und/oder Chemotherapie weiterhin ein großes Problem dar. Hierfür werden verstärkt sogenannte Tumorstammzellen (TSZ) bzw. Tumorinitiierende Zellen verantwortlich gemacht, denen Strahlen- und/oder Chemoresistenz nachgesagt wird [Alison et al., 2012; Brunner et al., 2012]. Obwohl kontrovers diskutiert, legen dennoch zahlreiche Daten aus verschiedenen Tumorentitäten die Strahlenresistenz von TSZ nahe. So identifizierten Phillips et al. [2006] strahlenresistente Brustkrebszellen, die Charakteristika von TSZ aufwiesen - wie das Wachstum in sogenannten Mammosphären und die Expression des Stammzellmarkers CD44 (CD = cluster of differentiation) bei gleichzeitig fehlender oder niedriger Expression von CD24 (CD44⁺/CD24^{-/low}-Phänotyp). Weiterhin wurden strahlenresistente TSZ z.B. in Glioblastomen [Bao et al., 2006; Facchino et al., 2010], nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen [Lundholm et al., 2013], Prostatakarzinomzellen [Wang et al., 2012] oder Kopf-Hals-Tumoren [Chen et al., 2009] gefunden. Bei in vitro Experimenten mit Tumorsphären ist allerdings zu beachten, dass dreidimensionales Wachstum an sich schon die Strahlensensitivität von Zellen beeinflußen kann [Storch et al., 2010].

Dass die Anzahl an TSZ (definiert als Zellen, die fähig sind einen neuen Tumor zu initiieren) in einem gegebenen Tumor die lokale Tumorkontrolle nach Bestrahlung bestimmt, war eine grundlegende Erkenntnis im Bereich der Radioonkologie, die durch *in vivo* Transplantationsassays gewonnen wurde [Baumann *et al.*, 2009]. Die vollständige Remission einer Krebserkrankung bzw. permanente lokale Tumor-

1. Einleitung

kontrolle versprechen sich Verfechter der Tumorstammzelltheorie daher nur durch das Abtöten aller TSZ während der Therapie [Baumann *et al.*, 2008; Dingli & Michor, 2006] (Abb. 1.2).



Abb. 1.2: Die Bedeutung von TSZ für die Krebstherapie schematisch dargestellt. (nach Reya *et al.*, 2001)

Zelluläre Mechanismen, durch die sich Tumorstammzellen der Strahlentherapie entziehen können, sind vielfältig. Verschiedene Studien legen nahe, dass dafür zum Beispiel eine effektivere Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden [Bao *et al.*, 2006; Duru *et al.*, 2012; Facchino *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012], die erhöhte Aktivität von anti-apoptotischen Signalwegen wie PKB/Akt [Ma *et al.*, 2008] oder ein niedrigeres Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) [Diehn *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2006] in TSZ im Vergleich zu Nicht-TSZ verantwortlich sein könnte. Die Resistenz von TSZ gegenüber Chemotherapie können zum Beispiel ABC-Transporter wie ABCG2 (*ATP-binding cassette superfamily G member 2*) vermitteln, die zytotoxische Substanzen aus der Zelle transportieren (*Multiple Drug Resistance*) [Goodell *et al.*, 1996; Hirschmann-Jax *et al.*, 2004; Wu & Alman, 2008]. Hierbei scheint das PI3K-Akt Signaling eine regulierende Rolle zu spielen [Bleau *et al.*, 2009].

1.3.1 Die Tumorstammzelltheorie

Stammzellen (SZ) sind in allen Organen unseres Körpers in jeweils einer gewissen Anzahl vorhanden. Diese undifferenzierten Zellen können homöostatisch die gewebespezifischen Zelltypen generieren. Typischerweise teilen SZ sich asymmetrisch, wobei jeweils eine neue SZ sowie ein Vorläufer (Progenitor) eines benötigten Zelltyps entsteht [Lin & Schagat, 1997]. Die Fähigkeit der SZ zur Selbsterneuerung und Bereitstellung von Vorläuferzellen ist hierbei potenziell unbegrenzt [Weissman, 2000]. Die Anfänge der Tumorstammzellhypothese liegen im 19. Jahrhundert, als die Theorie aufgestellt wurde, dass maligne Veränderungen ihren Ursprung in Stamm- bzw. Vorläuferzellen haben [Durante, 1974; Cohnheim, 1875]. Demnach könnten diese äußerst langlebigen Zellen Mutationen ansammeln, welche onkogenes Potential besitzen und die Stamm- bzw. Vorläuferzellen in Tumor-initiierende und sich selbst erneuernde Zellen umwandeln.

Bis vor einiger Zeit wurden allen Zellen eines Tumors mehrheitlich dieselben tumorigenen Eigenschaften zugeschrieben (stochastisches Modell). Jedoch ist auffallend, dass die Zellen eines Tumors bezüglich ihres Aussehens und ihres Verhaltens heterogen sind [Heppner, 1984], was für ein deterministisches Modell wie das der Tumorstammzellen spricht. Die Tumorstammzelltheorie liefert einen Erklärungsansatz dafür, wie diese Heterogenität auf der Basis einer Tumorsubpopulation - den TSZ - entstehen könnte. TSZ sind demnach per Definition tumorigene Zellen, die sich, im Gegensatz zur Tumorzellmasse (bulk), selbst erneuern und ausserdem die heterogenen Abstammungslinien des Tumors generieren können [Clarke et al., 2006]. Experimentell werden TSZ derzeit hauptsächlich über die Fähigkeit definiert, einen Tumor zu initiieren und zu rekapitulieren. Noch ist unklar, welchen Ursprung TSZ haben. Es gibt zwei Hauptkonzepte der Tumorstammzelltheorie: (a) Tumore entstehen aus Stamm- oder Vorläuferzellen durch Deregulation von Selbsterneuerungs- und Proliferationsprozessen, oder (b) Tumore besitzen eine Subpopulation, die ähnliche Eigenschaften wie Stammzellen aufweist (Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential) [Wicha et al., 2006]. Aufgrund der Art des experimentellen Nachweises und der ungeklärten Herkunft von TSZ bevorzugen viele Wissenschaftler anstatt des Begriffs "Tumorstammzelle" weniger irreführende Begriffe wie "Tumor-initiierende Zelle", "Stammzellähnliche Tumorzelle" oder "*tumor rescuing units*" [Baumann et al., 2008].

1. Einleitung

Als Ergänzung zur Theorie der TSZ bzw. tumor-initiierenden Zellen kann teilweise das (eigenständige) Modell der klonalen Evolution betrachtet werden. Auch dieses Modell versucht die Karzinogenese und die Heterogenität eines Tumors zu erklären, und zwar - basierend auf genetischer Instabilität - durch den Erwerb von multiplen, potenziell onkogenen Mutationen in entweder differenzierten oder pluripotenten Zellen, die einen Selektionsvorteil im Kampf um Ressourcen und Nischen darstellen, und so zur Vermehrung bestimmter Klone führen [Greaves & Maley, 2012; Nowell, 1976]. In einem Modell der klonalen Evolution, das die Existenz von Tumor-initiierenden Zellen mit einschließt, geht man davon aus, dass ein Tumor mehrere genetisch oder epigenetisch verschiedene TSZ-Populationen besitzt, die durch herrschende Selektionsdrücke evolvieren (oder untergehen). Dies bedingt die Heterogenität des Tumors und die daraus resultierende Vielfalt an unterschiedlichen Evasionsmechanismen bzw. Selektionsvorteilen, die schuld an Rezidiven sein können [Shibata & Shen, 2013].

Die Tumorstammzelltheorie konnte zum ersten Mal durch den Nachweis einer exklusiv tumorigenen Leukämiezellpopulation in humanen Akuten Myeloischen Leukämien (AMLs) belegt werden [Bonnet & Dick, 1997; Lapidot *et al.*, 1994]. Die Wissenschaftler beobachteten, dass nur ein Teil der Leukämiezellen fähig war, humane AML in immunsupprimierten SCID Mäusen zu initiieren und heterogene Leukämiesublinien hervorzubringen. In den darauffolgenden Jahren wurden stetig neue Hinweise dafür gefunden, dass TSZ existieren; auch in soliden Tumoren wie z.B. der Brust, der Prostata, der Haut, des Gehirns, des Darmes oder der Lunge [Al-Hajj *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2005; Dalerba *et al.*, 2007; Eramo *et al.*, 2008; Schatton *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2004]. Hierbei variiert der Anteil an TSZ in verschiedenen Tumorentitäten deutlich [Ishizawa *et al.*, 2010]. Gerade auch im Bereich der Radioonkologie sprechen die Ergebnisse aussagekräftiger *in vivo* Transplantationsassays für die Existenz von Tumorsubpopulationen mit stammzell-ähnlichen Eigenschaften [Baumann *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2006].

1.3.2 Tumorstammzellmarker

Die tumorigene Eigenschaft und Therapieresistenz von TSZ wurde vielfach mit der Expression bestimmter Markerproteine korreliert. Die ersten Zelloberflächenmole-

küle, die in diesem Zusammenhang entdeckt wurden, waren CD34 und CD38; der CD34⁺/CD38⁻ Phänotyp charakterisiert AML Stammzellen [Bonnet & Dick, 1997; Lapidot *et al.*, 1994]. Auch in soliden Tumoren konnten eine Reihe sogenannter Tumorstammzellmarker, wie zum Beispiel die Zelloberflächenproteine CD133 und CD44 oder funktionale Marker wie die Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) gefunden werden. Häufig wird zudem die Expression embryonaler Stammzellmarker herangezogen. Ebenso wird die *side population* (SP) in verschiedenen Tumorentitäten als TSZ-angereicherte, tumorigene Population betrachtet [Hadnagy *et al.*, 2006; Hirschmann-Jax *et al.*, 2004; Nakatsugawa *et al.*, 2011; Wu & Alman, 2008]. SP Zellen sind durch die Fähigkeit charakterisiert, zytotoxische Stoffe wie den Farbstoff Hoechst 33342 mit Hilfe von ABC-Transportern aus der Zelle zu transportieren, was ausserdem die Isolation der SP durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) möglich macht [Goodell *et al.*, 1996]. Eine Übersicht der gängigsten TSZ-Marker in den häufigsten soliden Tumoren zeigt Tabelle 1.1.

1.3.2.1 Der Oberflächenmarker CD133

Das transmembrane Glykoprotein Prominin-1/CD133 (AC133 Antigen) ist auffälligerweise in peripheren Zellausläufern lokalisiert und ca. 120 kDa schwer [Fargeas et al., 2003; Miraglia et al., 1997]. Das Wissen über seine physiologische Funktion ist zwar nach wie vor ungesichert, jedoch ist CD133 als Marker für hämatopoetische und somatische Stamm- und Progenitorzellen etabliert [Bhatia, 2001; Corbeil et al., 1998]. Vor wenigen Jahren zeigten Singh et al. [2003] zudem, dass humane Gehirntumore (z.B. Glioblastoma multiforme (GBM), Medulloblastom) patientenabhängig einen gewissen Anteil an CD133-positiven (CD133⁺) Zellen besitzen. Diese CD133⁺ Zellen wiesen in vitro Eigenschaften von TSZ auf, wie zum Beispiel das Wachstum in Neurosphären oder die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differentiation [Singh et al., 2003]. Im Jahr darauf konnte gezeigt werden, dass diese Zellen - im Gegensatz zur CD133 Population desselben Ausgangstumors - in immunsupprimierten NOD/SCID Mäusen Tumore induzieren und rekapitulieren können [Singh et al., 2004]. Darüber hinaus ist CD133 ebenso in Lungen-, Prostata-, Darm-, Leber- oder Pankreaskarzinomen als TSZ-Marker bekannt [Collins et al., 2005; Eramo et al., 2008; Hermann et al., 2007; Ma et al.,

2007; O'Brien *et al.*, 2007; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007]. Bao *et al.* [2006] beobachteten ausserdem, dass CD133⁺ Glioblastompopulationen strahlenresistenter als die korrespondierenden CD133⁻ Zellen waren.

Mittlerweile gibt es Anlass zur kontroversen Diskussion von CD133 als TSZ-Marker. So beobachteten Shmelkov *et al.* [2008], dass auch CD133⁻ Zellen aus Metastasen des Kolonkarzinoms in NOD/SCID Mäusen tumorigen waren. Weitere Studien schwächen die Bedeutung von CD133 als TSZ-Marker ab [Beier & Beier, 2011; Campos & Herold-Mende, 2011; Dittfeld *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2009]. Fraglich bleibt ausserdem die Funktion von CD133 in Bezug auf Krebsentstehung, Proliferation, Strahlenresistenz oder Metastasierung.

Tab. 1.1: Übersicht verschiedener Marker für die Charakterisierung von Tumorstammzellen in soliden Tumoren. Die gelisteten Marker sowie Tumorentitäten und Referenzen stellen eine Auswahl dar.

Tumorentität	Marker	Referenz
Mammakarzinom	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} ALDH1 ⁺ Oct-4 Sox2	[Al-Hajj <i>et al.</i> , 2003] [Ginestier <i>et al.</i> , 2007] [Ponti <i>et al.</i> , 2005] [Leis <i>et al.</i> , 2012]
Lungenkarzinom (NSCLC)	CD133 ⁺ ALDH1 ⁺ SP	[Eramo <i>et al.</i> , 2008] [Jiang <i>et al.</i> , 2009] [Ho <i>et al.</i> , 2007]
Glioblastom	CD133 ⁺	[Singh <i>et al.</i> , 2004]
Prostatakarzinom	$CD44^{+}/\alpha_{2}\beta_{1}^{high}/CD133^{+}$ $CD133^{+}/CXCR4^{+}$	[Collins <i>et al.</i> , 2005] [Miki <i>et al.</i> , 2007]
Kolonkarzinom	CD133 ⁺ ALDH1 ⁺ ; EpCAM ⁺ /CD44 ⁺	[O'Brien <i>et al.</i> , 2007; Ricci-Vitiani <i>et al.</i> , 2007] [Dalerba <i>et al.</i> , 2007]
Melanom	ABCB5 ⁺	[Schatton et al., 2008]
Leberkarzinom	CD133 ⁺ CD90 ⁺	[Ma <i>et al.</i> , 2007] [Yang <i>et al.</i> , 2008]
Pankreaskarzinom	CD133 ⁺ /CXCR4 ⁺ ALDH1 ⁺ EpCAM ⁺ /CD44 ⁺ /CD24 ⁺	[Hermann <i>et al.</i> , 2007] [Feldmann <i>et al.</i> , 2007; Rasheed <i>et al.</i> , 2010] [Li <i>et al.</i> , 2007]
Oesophaguskarzinom	Oct-4, Sox2; SP CD44 ⁺	[Huang <i>et al.</i> , 2009] [Zhao <i>et al.</i> , 2011]
Cervixkarzinom	ALDH1 ⁺ Oct-4, Sox2	[Yao <i>et al.</i> , 2011] [Feng <i>et al.</i> , 2009]

CD = *cluster of differentiation*; ALDH1 = Aldehyd-Dehydrogenase 1; SP = *side population* (Hoechst 33342 Efflux); CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; EpCAM = *epithelial cell adhesion molecule*; ABCB5 = ATP-Bindekassette Subfamilie B Mitglied 5.

1.3.2.2 Die embryonalen Stammzellmarker Oct-3/4 und Sox2

Zur Charakterisierung von TSZ wird häufig die Expression von embryonalen Stammzellmarkern betrachtet. *Octamer binding transcription factor 3/4* (Oct-3/4) und *sex determining region Y-box 2* (Sox2) sind zwei kooperierende Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die korrekt ablaufende Embryonalentwicklung von Säugetieren sind, indem sie Schlüsselrollen in der Regulation von Pluripotenz und Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen (ESCs) einnehmen [Masui *et al.*, 2007; Niwa *et al.*, 2000; Rizzino, 2009]. So resultiert der *knockdown* von Sox2 durch RNA-Interferenz genauso in der Differentiation von ESCs [Ivanova *et al.*, 2006], wie die Reduktion der Oct3/4 Expression auf < 50% des normalen Levels [Niwa *et al.*, 2000].

Die Expression von Oct-3/4 und Sox2 korreliert aber auch mit Rekurrenz, Metastasierung und/oder schlechter Prognose von z.B. Mammakarzinomen, Speiseröhrenoder Enddarmkrebs [Lengerke *et al.*, 2011; Saigusa *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009]. TSZ, die als SP aus verschiedenen Adenokarzinomzelllinien der Lunge isoliert wurden, waren im Vergleich zur jeweiligen Hauptpopulation durch eine höhere Sox2 Expression charakterisiert [Nakatsugawa *et al.*, 2011]. Die Überexpression von Sox2 in zwei dieser Zelllinien führte zu höherer Tumorigenität *in vivo*, wobei Proliferation und Zellzyklus dieser Zellen *in vitro* unverändert war. Wurde Sox2 mittels siRNA herunterreguliert, so war die Tumorigenität der SP Zellen verschwunden. In einer anderen Studie konnte ein Zusammenhang zwischen Oct-3/4 und Sox2 Expression und der Strahlenresistenz von TSZ der Mammakarzinomzelllinie MCF7 gefunden werden [Debeb *et al.*, 2010].

1.3.2.3 Die Aktivität von Aldehyd-Dehydrogenasen

Die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), genauergesagt deren Aktivität, ist als Marker sowohl für normale Stamm- und Progenitorzellen als auch für Tumorstammzellen etabliert [Douville *et al.*, 2009; Moreb, 2008; Povsic *et al.*, 2007]. Die ALDH-Superfamilie umfasst momentan eine Gruppe von 19 Enzymen in 15 Familien [www.aldh.org/superfamily. php], die NAD(P)+-abhängig die Oxidiation von Aldehyd-Metaboliten zu den entsprechenden Carboxylsäuren katalysieren und so z.B. im Zellmetabolismus und für die zelluläre Entgiftung eine wichtige Rolle spielen

1. Einleitung

[Vasiliou *et al.*, 2004; Vasiliou *et al.*, 2000]. Aldehyde sind elektrophile, hoch reaktive und relativ langlebige Moleküle, die kovalent an DNA binden und diese schädigen können [Brooks & Theruvathu, 2005]. Unter anderem werden Aldehyde als Folge von oxidativem Stress gebildet, der in der Zelle z.B. nach ionisierender Bestrahlung entsteht [Spitz *et al.*, 2004]. Die einzelnen Mitglieder der ALDH-Superfamilie sind in verschiedenen Organen von Säugetieren zu finden, und hauptsächlich zytosolisch oder mitochondrial, aber auch in Nukleus und endoplasmatischem Reticulum lokalisiert [Marchitti *et al.*, 2008]. Zur zytosolischen Familie 1 gehören die evolutionär stark konservierten Enzyme ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3, die die Oxidation von Retinaldehyd (Retinal, Vitamin A) zu Retinsäure (RA) katalysieren [Zhao *et al.*, 1996]. RA dient als Ligand für den RA-Rezeptor (RAR) und spielt bei Differenzierungsvorgängen während der Embryonal-entwicklung und auch im adulten Organismus eine Rolle [De Luca, 1991; Duester, 2000]. Über den Retinsäure-Rezeptor alpha (RARα) ist bekannt, dass er den EGFR auf Transkriptionsebene beeinflußen kann [Salvatori *et al.*, 2011].

In den 1980er Jahren fand man heraus, dass hämatopoetische Stammzellen (HSCs) im Vergleich zu weniger primitiven Progenitorzellen durch ein höheres Level an zytosolischer ALDH resistenter gegen das Zytostatikum Cyclophosphamid waren [Gordon et al., 1985; Sahovic et al., 1988]. Auch in Leukämiezellen wies man ALDHs solch eine Funktion nach [Sladek, 2002]. In der Lungenkarzinomzelllinie A549 konnte man mittels RNAi-Technik die Isoenzyme ALDH1A1 und ALDH3A1 für Cyclophosphamid-Resistenz verantwortlich machen [Moreb et al., 2007a]. In den 1990er Jahren wurde ein Testsystem (Aldefluor® Assay, Aldagen Inc.) entwickelt, mit dessen Hilfe vitale HSCs basierend auf deren ALDH-Aktivität isoliert werden konnten [Jones et al., 1995; Storms et al., 1999]. Dies ebnete den Weg, um Tumorzellpopulationen mit erhöhter ALDH-Aktivität auf stammzellähnliche Eigenschaften hin zu untersuchen. Ein Zusammenhang zwischen der ALDH-Aktivität (gemessen mittels Aldefluor® Assay) und TSZ-Eigenschaften wurde z.B. in Lungen-, Mamma-, Pankreas-, Kopf-Hals- und Cervixkarzinomen sowie Glioblastomen gefunden [Chen et al., 2009; Ginestier et al., 2007; Huang et al., 2012; Jiang et al., 2009; Kim et al., 2011; Liang & Shi, 2012; Rao et al., 2012; Rasper et al., 2010]. Hierbei wurden Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Tumorsphärenbildung, die Expression von embryonalen Stammzellmarkern und/oder die

Tumorigenität der Zellen untersucht. Der Aldefluor® Assay ist sensitiv gegenüber mehreren ALDH-Isoformen: ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 und ALDH2 [Marcato *et al.*, 2011; Moreb *et al.*, 2012; Moreb *et al.*, 2007b]. Diesbezügliche Untersuchungen weiterer Isoformen stehen noch aus.

1.3.3 Mögliche Ziele in TSZ für , Targeted Molecular Therapies'

In der Literatur werden verschiedene Signalwege diskutiert, die charakteristisch für TSZ sind und daher potenziell therapeutische Targets darstellen. Drei davon sind Wnt/ß-Catenin, Sonic Hedgehog und Notch [Karamboulas & Ailles, 2013], die normalerweise während der Embryonalentwicklung Schlüsselrollen spielen, indem sie z.B. die Selbsterneuerung von Stammzellen, Zellproliferation und/oder Zelldifferenzierung regulieren [Ingham & McMahon, 2001; Logan & Nusse, 2004; Miele, 2006]. Tatsächlich scheinen zum Beispiel Wnt/ß-Catenin und Notch eine Rolle für die Strahlenresistenz von Brustkrebs- bzw. Gliomstammzellen zu spielen [Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010]. Weiterhin führte die Inhibition des Notch-Liganden Delta-like 4 (DLL4) zur Reduktion des Anteils an TSZ im Kolonkarzinomund Brustkrebsmodell [Hoey *et al.*, 2009].

Von Interesse für gezielte Therapien sind ausserdem zum Beispiel auch Regulatoren der für die Tumorstammzellnische wichtigen Hypoxie (z.B. *Hypoxia-inducible factors* (HIFs)) [Li *et al.*, 2009], sowie der *Transforming growth factor beta* (TGF- β)-Signalweg [Peitzsch *et al.*, 2013]. Letzteres wurde durch einen genexpressionsanalytischen Vergleich von ALDH-positiven (Progenitor-) und ALDH-negativen, sowie ausserdem von strahlenresistenten und strahlensensitiven Prostatakarzinomzellen nahegelegt [Peitzsch *et al.*, 2013]. Der TGF- β Signalweg steht zudem bekanntermaßen in engem Zusammenhang mit EGFR-vermitteltem Signaling [Kang *et al.*, 2012].

EGFR, PI3K-Akt und DNA-Reparatur in Tumorstammzellen

Für die vorliegende Arbeit im Zusammenhang mit möglichen, gezielt gegen TSZ gerichteten Therapien ist natürlich der EGFR sowie der EGFR-vermittelte PI3K-Akt Signalweg (siehe 1.2) besonders interessant. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass diese Schlüsselproteine wichtige Rollen in der Biologie von TSZ spielen. So konnten Abhold *et al.* [2012] zeigen, dass die Stimulation des EGFR durch EGF

sowie die ektopische Überexpression des Rezeptors zu einem höheren Grad an "Stemness" in Kopf-Hals-Tumorzellen (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma) führte. Gemessen wurden hierzu die TSZ-Marker CD44, B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (Bmi-1), Oct-4, Nanog und CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4), sowie die Fähigkeit, Tumorsphären zu bilden. Wie eine andere Arbeitsgruppe zeigen konnte, behielten auch Gliomstammzellen diese Fähigkeit nur in Anwesenheit von EGF, nicht aber anderer Wachstumsfaktoren wie z.B. basic fibroblast growth factor (bFGF) [Soeda et al., 2008]. Nach EGF-Behandlung erhöhte sich hier zudem der Anteil an CD133⁺ Gliomzellen konzentrationsabhängig, wobei die Inhibition der EGFR-TK das Gegenteil bewirkte, was eventuell durch die beobachtete Apoptoseinduktion in CD133⁺ Zellen zu erklären sein könnte. Ausserdem führte die Inhibition der EGFR-TK zum Verlust der Selbsterneuerungskapazität der Gliomstammzellen (gemessen an der Formation von Tumorsphären). Zu ganz ähnlichen Ergebnissen bzgl. der Rolle des EGFR in TSZ kamen Feng et al. [2012] in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116. Hier wurde zudem die Rolle des PI3K-Akt Signalwegs deutlich: Der PI3K-Inhibitor LY294002 inhibierte die Bildung von HCT116-Tumorsphären. In einem anderen Ansatz kam man zu dem Ergebnis, dass ALDH1A1-positive Lungenkarzinomzellen, also putative TSZ, besonders resistent gegen TKIs wie Gefitinib sind [Huang et al., 2012].

Bleau *et al.* [2009] beobachteten des Weiteren in Glioblastomen, dass die Behandlung mit LY294002 zu einer Reduktion der SP führte. Es zeigte sich, dass möglicherweise PI3K-Akt die Aktivität des Transporters ABCG2 reguliert, der für den Efflux von Hoechst 33342 (der die SP charakterisiert) aus der Zelle verantwortlich ist [Bleau *et al.*, 2009]. In einer anderen Studie mit Gliomen wurde eine präferenzielle Empfindlichkeit von TSZ gegenüber der Inhibition von Akt beobachtet. Hier kam es nach Behandlung mit Akt Inhibitor III bevorzugt in CD133⁺ Zellen zu Apoptoseinduktion, Unterdrückung der Neurosphärenformation, reduzierter Motilität und Invasivität [Eyler *et al.*, 2008].

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass der PI3K-Akt Signalweg eine Rolle für die Strahlenresistenz von TSZ spielen könnte. So war in strahlenresistenten Medulloblastomstammzellen der Maus, die innerhalb des Tumors in einer perivaskulären Nische zu finden sind, das Level an phospho-Akt (Ser473) in beträcht-

lichem Maße erhöht [Hambardzumyan *et al.*, 2008]. Diese Zellen reagierten zudem besonders empfindlich auf Bestrahlung, wenn Akt zuvor mittels Perifosin inihibiert wurde. Ebenso zeigten TSZ der Brustkrebszelllinie MCF-7 eine präferenzielle Strahlenempfindlichkeit nach Hemmung von Akt [Zhan *et al.*, 2011]. Zhang *et al.* [2010] beobachteten in Tumor-initiierenden Brustkrebszellen der Maus im Vergleich zu den *bulk* Zellen des Tumors ein niedrigeres Expressionslevel des Tumor-suppressors und PI3K-Gegenspielers PTEN, was mit einer erhöhten Aktivität von Akt und mTOR sowie des Wnt/ß-Catenin Signalings einherging. Diese durch Lin⁻ CD29^{high} CD24^{high} charakterisierten Tumor-initiierenden Zellen reparierten strahlen-induzierte DNA-Schäden effizienter als die *bulk* Zellen des Tumors und waren dadurch strahlenresistenter. Weitere Hinweise auf eine effizientere DNA-Reparatur von TSZ im Vergleich zu nicht-TSZ sind vorhanden [Bao *et al.*, 2006; Duru *et al.*, 2012; Maugeri-Sacca *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012].

1.4 Zielsetzung

Trotz des stetigen Fortschritts in der strahlen- und radiochemotherapeutischen Behandlung von Krebspatienten besteht nach wie vor das große Problem häufig auftretender Rezidive. Für die bedingte Effizienz der aktuellen Therapieformen werden zunehmend TSZ verantwortlich gemacht, von denen angenommen wird, dass sie aufgrund ihrer strahlen- und chemoresistenten Eigenschaften die Therapie überleben und den Tumor erneut auftreten lassen [Brunner et al., 2012; Li et al., 2008; Phillips et al., 2006]. In diesem Zusammenhang war die Erkenntnis, dass unter anderem der EGFR-PI3K-Akt Signalweg eine wichtige Rolle in der Biologie der TSZ spielt, von großer Bedeutung im Hinblick auf mögliche , Targeted Molecular Therapies'. In Vorarbeiten der Sektion für Strahlenbiologie und Molekularen Umweltforschung der Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen, konnte die Rolle des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs für die Strahlenresistenz von Tumorzellen, insbesondere in Zusammenhang mit der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, nachgewiesen werden [Rodemann et al., 2007; Toulany et al., 2008; Toulany et al., 2012]. In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden, ob es in klonogenen Tumorzellen, die sequenzielle Bestrahlungen während eines Radioselektionsprozesses überlebten, einen Zusammenhang zwischen Strahlenresistenz und EGFR-PI3K-Akt Signalweg bzw. DNA-Reparatur gibt, und ob eine

1. Einleitung

mögliche Anreicherung von Subpopulationen, die Tumorstammzellmarker exprimieren, zu beobachten ist.

ALDHs sind in TSZ besonders stark exprimiert bzw. aktiv [Moreb, 2008] und spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress [Singh *et al.*, 2013], wie er z.B. durch IR hervorgerufen wird [Spitz *et al.*, 2004]. Es wäre möglich, dass die in TSZ beobachtete Strahlen- und Chemoresistenz durch die erhöhte ALDH-Aktivität dirket beeinflußt wird. Des Weiteren liegt es nahe, darüber nachzudenken, ob es sinnvoll wäre, ALDH-Inhibitoren wie Disulfiram, Chloralhydrat oder Chloramphenicol, die als Medikamente für diverse Erkrankungen schon auf dem Markt zugelassen sind, im Kampf gegen Krebs einzusetzen [Kast & Belda-Iniesta, 2009]. Denkbar wäre eine kombinierte Strahlentherapie. Ein weiteres Anliegen war es daher, mittels Inhibition und siRNA, grundlegende Erkenntnisse über die funktionale Rolle des TSZ-Markers ALDH für die Strahlenresistenz von Tumorzellen, mit besonderem Hinblick auf die Rolle unterschiedlicher Isoenzyme, zu gewinnen.

Folgenden Fragestellungen sollten in humanen Tumorzelllinien *in vitro* untersucht werden:

- 1) Ist es möglich, strahlenresistente Tumorzellen durch einen Strahlenselektionsprozess zu isolieren? Ist deren Proliferation verändert?
- 2) Welche Rolle spielen der EGFR-PI3K-Akt Signalweg und die DNA-Reparatur für die Strahlenresistenz der selektierten Tumorzellen?
- 3) Ist die Expression/Aktivität bestimmter Tumorstammzellmarker in den selektierten, strahlenresistenten Tumorzellen erhöht?
- 4) Sind Tumorzellen mit hoher ALDH-Aktivität strahlenresistenter als jene mit niedriger ALDH-Aktivität? Spielt der PI3K-Akt Signalweg eine Rolle für die Strahlenresistenz von ALDH^{bright} Zellen?
- 5) Welche Effekte hat eine ALDH-Inhibition oder der knockdown bestimmter ALDH-Isoformen auf die Strahlensensitivität von Tumorzellen? Welche Isoformen sind besonders wichtig?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Es wurden folgende etablierte humane Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
A549	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, epithelial	ATCC, CCL-185™
H460	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, epithelial	ATCC, HTB-177™
MDA-MB-231	Adenokarzinom der Mamma, epithelial	ATCC, HTB-26™
SK-BR-3	Adenokarzinom der Mamma, epithelial	ATCC, HTB-30™

Zur Kultivierung der Zelllinien wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) verwendet, dem 44 mM NaHCO₃ (Biochrom AG) zugesetzt wurde. Außerdem enthielt das Kulturmedium 10 % fötales Kälberserum (FCS, PAN Biotech) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS, Gibco). Für die Transfektion von Zellen mit siRNA wurde Opti-MEM (Gibco) verwendet. Für die Kryokonservierung wurden die Tumorzellen in DMEM mit 20 % FCS, 1 % PS und 5 % DMSO mit ca. 1°C/min sinkender Temperatur in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden, wo notwendig, in der Qualität pro analysis (p.a.) eingesetzt.

Produkt	Hersteller	
2-Isopropanol	Merck	
Acrylamid-Lösung	Roth	
APŚ	Sigma-Aldrich	
Borsäure	Sigma-Aldrich	
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech	
BSA	Roth	
Chromatografiepapier	Protran	
DAPI	Serva	
DMSO	Sigma-Aldrich	
Essigsäure	Merck	
Ethanol	Merck	
Formaldehyd 37%	Merck	
Glycerin	Applichem	
Glycin	Roth	

HCL	Roth
Kaleidoscope Proteinstandard	BioRad
Kaliumchlorid	Merck
KH ₂ PO ₄	Roth
Kristallviolett	Applichem
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
Methanol	Merck
Na ₂ HPO ₄	Roth
Natriumchlorid	Applichem
Natriumhydroxid	Roth
Nitrocellulosemembran 0,2µm	Roth
Nonidet P-40	Sigma-Aldr
Penicilin-Streptomycin	Gibco
Phosphataseinhibitor-Cocktail 3	Sigma-Aldr
Ponceau S	Sigma-Aldr
Proteaseinhibitor "Complete"	Roche
Röntgenfilme (Curix Cronex 5)	Agfa-Geva
SDS	Serva
Sterile Filterspitzen	Greiner Bio
Sterilfilter 0,2µM	Sarstedt
TEMED	Sigma-Aldr
Tris base	Sigma-Aldr
Triton X-100	Sigma-Aldr
Trypsin	Serva
Tween® 20	Roth
Zellkulturwaren	BD Bioscie
Zellsieb (100µm)	BD Bioscie
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldr

n drich drich drich /aert BioOne drich drich drich iences iences drich

2.1.3 Geräte und Software

Gerät	Hersteller
ELISA-Reader Gelelektrophorese-Kammer Lichtmikroskop Röntgenbestrahlungseinheit (RS-225) Semidry-Blot-System Ultraschallgerät Sonifier B-12 Zentrifugen	Anthos Labtec Instruments Hoefer Zeiss Gulmay Medical Hoefer Branson Ultrasonics Corporation/Emerson Eppendorf
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine	Agfa

2.1.4 Lösungen und Puffer

Blotpuffer (Anode)	3,1 g 4 ml 200 ml ad 1 l pH 9.0	Borsäure 10% SDS-Lsg. Methanol H ₂ O _{dest} NaOH
	рп 9,0	NaOH

2. Material und Methoden

Blotpuffer (Kathode)	3,1 g 4 ml 50 ml ad 1 l pH 9,0	Borsäure 10% SDS-Lsg. Methanol H ₂ O _{dest} NaOH
FACS-Puffer	0,1 % 300 ml	BSA PBS, sterilfiltriert
Laufpuffer	144 g 30 g 5 g ad 5 l	Glycin Tris base SDS H ₂ O _{dest}
Lysispuffer	1 % 0,87 g 0,6 g ad 1 I pH 8,0	Nonidet-P40 NaCl Tris base H ₂ O _{dest}
PBS	13,7 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBST	1 I 0,1 %	PBS ⁻ Tween20
Sammelgelpuffer (4x)	30,3 g 2 g ad 500 ml pH 6,8	Tris base SDS H ₂ O _{dest} HCI
SDS-Probenpuffer (2x)	20 ml 2 g 10 mg 24 ml 5,4 ml ad 100 ml	Glycerin SDS Bromphenolblau Sammelgelpuffer (4x) β -Mercaptoethanol H ₂ O _{dest}
Strippingpuffer	4,5 g 0,3 g 3 ml ad 300 ml pH 2,2	Glycin SDS Tween20 H2O _{dest} HCI
Kristallviolett-Färbelösung	0,5 g 27 ml ad 1 l	Kristallviolett Formaldehyd (37%) H ₂ O _{dest}
Trenngelpuffer (4x)	90,85 g 2 g ad 500 ml pH 8,8	Tris base SDS H ₂ O _{dest} HCI

2.1.5	Inhibitoren u	und s <i>mall</i>	interfering	RNA ((siRNA)
-------	---------------	-------------------	-------------	-------	---------

Inhibitor	Konzentration	Beschreibung	Hersteller
Erlotinib (Tarceva®)	5 μM 10 μM	EGFR Inhibitor	Roche Calbiochem
DEAB	100 μM	ALDH Inhibitor	Sigma-Aldrich
siRNA	Zielsequenz (5'·	-3')	Hersteller
ALDH1A1	GAACAGUGUG GAUCCAGGGC AGAGUACGGU GGGCGACUAU	GGUGAAUUG CGUACAAUA UUCCAUGAA UAUACAAGU	Thermo Scientific
ALDH2	GAAUUUCCCG CCGCAGCUGU GAAGGUAGCU UCAAAUGUCU	CUCCUGAUG CUUCACAAA GAGCAGACA CCGGUAUUA	Thermo Scientific
Non-targeting siRNA			Thermo Scientific

2.1.6 Antikörper

Primärer Antikörper	Beschreibung	Konz.	Hersteller
ALDH1A1	Kaninchen, mAb	1:2000	Abcam
ALDH1A2	Kaninchen, pAb	1:1000	Abcam
ALDH1A3	Kaninchen, pAb	1:1000	Abgent
ALDH2	Kaninchen, pAb	1:1000	Abcam
ß-Aktin	Kaninchen, mAb	1:1000	Sigma-Aldrich
CD133	Kaninchen, mAb	1:1000	Cell Signaling
p-DNA-PKcs (Ser2056)	Maus, mAb	1:1000	BD Pharmingen
DNA-PKcs	Maus, mAb	1:1000	Calbiochem
p-H2AX (Ser139)	Maus, mAb	1:500	Millipore
Oct4	Kaninchen, pAb	1:1000	Acris
Sox2	Maus, mAb	1:500	Abcam
Sekundärer Antikö.	Konjugat	Konz.	Hersteller
Esel IgG, anti-Kaninchen	HRP	1:4000	GE Healthcare
Schaf IgG, anti-Maus		1:4000	GE Healthcare
Ziege IgG, anti-Maus	AlexaFluor® 488	1:300	Invitrogen

2.1.7 Kits

Kit	Hersteller
ECL Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare
DC Protein Assay	BioRad
Aldefluor™ Assay	Aldagen Inc.
Senescence ß-Gal Staining Kit	Cell Signaling

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in wasserdampfgesättigten Brutschränken (Heraeus oder Binder) bei 37 °C und 7 % CO₂ kultiviert. Die Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer Steril-Bank (Thermo Scientific) durchgeführt. Es wurde nur mit vom Werk aus sterilen, ethanolsterilisierten oder autoklavierten Materialien gearbeitet. In regelmäßigen Abständen wurden die Zelllinien per DAPI-Färbung auf Mycoplasmen untersucht.

2.2.2 Verdopplungszeit

Die Verdopplungszeit (Generationszeit) ist die Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Teilungen einer Zelle bzw. die Zeit, die für eine Verdopplung der Zellzahl benötigt wird. Sie wird wie folgt berechnet (aus T. Lindl, Zell- und Gewebekultur, Spektrum Akademischer Verlag, 5. Aufl. 2002):

Verdopplungszeit [h] = log 2 * Kulturdauer [h] / log N - log N_0

wobei: N = Zellzahl nach Kulturdauer

N₀ = Zahl der Zellen zum Zeitpunkt 0 ist.

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte lichtmikroskopisch in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

2.2.3 Bestrahlung

Die ionisierende Bestrahlung der Zellen erfolgte im Röntgengenerator RS-225 (Gulmay Medical, UK) bei einer Dosisleistung von 1 Gy/Minute und mit einer Grundeinstellung von 200 kV und 15 mA bei 37 °C.

2.2.4 Radioselektion

Um strahlenresistente Subpopulationen einer Zelllinie zu selektionieren, wurden 4 x 10^4 Zellen (A549) bzw. 3 x 10^5 Zellen (SK-BR-3) in Kulturflaschen mit einer effektiven Wachstumsfläche von 75 cm² (T-75) in Kulturmedium mit 10% FCS und 1 % PS ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Parallel dazu wurden Kontrollzellen in einer zweifach niedrigeren Dichte, ansonsten aber unter gleichen

Kulturbedingungen, ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 4 Gy (A549) bzw. 3 Gy (SK-BR-3) bestrahlt und zurück in den Brutschrank gestellt. Die Kontrollzellen wurden nicht bestrahlt. Nach 10 bis 12 Tagen wurden die gewachsenen Kolonien abtrypsiniert und in jeweils oben genannter Dichte neu ausgesät und erneut bestrahlt bzw. nicht bestrahlt (Kontroll- bzw. Parentalzellen). Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal durchgeführt, anschließend wurden die mehrfach bestrahlten Populationen "A549-R" bzw. "SK-BR-3-R" genannt, während die unbestrahlten Parentalkulturen als "A549-p" bzw. "SK-BR-3-p" bezeichnet wurden. Für anschließende Experimente wurden die radioselektierten Zellen sowie die Parentalzellen nach dem Selektionsprozess einmal passagiert.



Abb. 2.1: Schema der Strahlenselektion am Beispiel der A549 Zellen. SK-BR-3 Zellen wurden in einer Dichte von 3×10^5 Zellen ausgesät und erhielten Fraktionen in einer Dosis von 3 Gy.

2.2.5 Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest wurde 1956 von Puck und Marcus entwickelt [Puck *et al.*, 1956] und kann als gültiger Standard zur Messung der Strahlensensibilität einer Zelllinie eingesetzt werden. Hierbei wird die Fähigkeit von bestrahlten Einzelzellen zu überleben und durch Zellteilungen eine Kolonie von mindestens 50 Zellen zu bilden, gemessen. Dies spiegelt sich in den Überlebensfraktionen (*surviving frac-tions*, SF) bei verschiedenen Strahlendosen wider, die in einer Dosis-Wirkungs-Kurve graphisch aufgetragen werden. Wichtig sind z.B. SF2 oder SF4, die den Anteil gebildeter Kolonien nach 2 bzw. 4 Gy angeben.

Um das klonogene Überleben der Zellen nach Bestrahlung oder kombinierter Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen zu bestimmen, wurden 250 Zellen (A549, H460, MDA-MB-231) bzw. 1000 Zellen (SK-BR-3) in 6-Well-Platten in Kulturmedium plus 20 % FCS und 1 % PS ausgesät und im Brutschrank inkubiert.
2. Material und Methoden

Nach 24 Stunden wurden sie mit dem jeweiligen Inhibitor bzw. dem Vehikel behandelt und nach genannter Vorbehandlungszeit mit Einzeldosen von 0 bis 4 Gy bestrahlt. Nach 8 bis 10 Tagen (A549, H460, MDA-MB-231) bzw. 18 bis 20 Tagen (SK-BR-3) Inkubation im Brutschrank wurden die Kolonien für mehrere Minuten in einer Kristallviolett-Lösung fixiert und gefärbt und anschließend im Trockenschrank bei 50 °C getrocknet. Unter dem Binokular wurden nun Kolonien, welche mehr als 50 Zellen aufwiesen, gezählt, um anschließend das klonogene Überleben mittels einer halblogarithmisch aufgetragenen Überlebenskurve im Vergleich zur Kontrolle festzustellen.

2.2.6 Seneszenz-assoziierte ß-Galaktosidase-Färbung

Der Nachweis der seneszenz-assoziierten ß-Galaktosidase (SA-ß-Gal)-Aktivität im sauren pH-Optimum (pH 6,0) stellt die gängigste Methode dar, seneszente Zellen einer Kultur zu markieren. Hierbei wird die Aktivität des in seneszenten Zellen überexprimierten Enzyms SA-ß-Gal qualitativ durch die Umsetzung von X-Gal und anschließender Oxidation des Produkts durch Luftsauerstoff, wodurch tiefblauer Indigo-Farbstoff entsteht, bestimmt [Dimri *et al.,* 1995]. Auf diese Weise lassen sich seneszente Zellen von präseneszenten, immortalen, quieszenten oder ausdifferenzierten Zellen unterscheiden.

A549-p und A549-R Zellen wurden auf Chamberslides (BD Falcon) in geringer Dichte ausgesät und 24 Stunden später mit einer Einzeldosis von 4 Gy bestrahlt bzw. nicht bestrahlt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe des Senescence ß-Gal Staining Kit (Cell Signaling) gemäß den Angaben des Herstellers fixiert und gefärbt. Anschließend wurden am Lichtmikroskop (Axiovert 135, Zeiss) Hellfeld-Aufnahmen gemacht, um seneszente und nicht-seneszente Zellen manuell auszählen zu können.

2.2.7 yH2AX Focus Assay

Um die DNA-Reparaturkapazität der radioselektierten Tumorzellen zu untersuchen, wurde die Zahl der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs) 24 Stunden nach Induktion durch ionisierende Strahlung mittels γ H2AX-Immunfärbung analysiert. Der γ H2AX Focus Assay beruht auf der Tatsache, dass das Histonprotein H2AX an Serin 139 phosphorylliert wird, sobald IR-induzierte DNA-DSBs in der Zelle auftreten [Rogakou *et al.*, 1998]. Dieses so genannte gamma-H2AX kann mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers immunhistochemisch als Fokus sichtbar gemacht werden.

A549-p und A549-R Zellen wurden auf Chamberslides (BD Falcon) ausgesät und im Brutschrank einige Tage inkubiert, bis die Kulturen konfluent waren. Dann wurden mittels Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy DNA-DSBs induziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 2 % Formaldehyd in PBS 15 Minuten lang fixiert, dann dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,2 % Triton X-100 in 1 % BSA/PBS auf Eis 5 Minuten permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 3 % BSA/PBS bei Raumtemperatur eine Stunde geblockt. Anschließend wurden die Kulturen mit einem γH2AX-spezifischen Antikörper (phospho-H2AX Ser139) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal mit PBST gewaschen. Der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Sekundärantikörper wurde daraufhin ebenso eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mittels DAPI-Färbung die DNA sichtbar gemacht. Am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Zeiss) wurden Aufnahmen in 400-facher Vergrößerung gemacht und für jede Kondition die residuellen DSBs, sichtbar als Foci, in mindestens 220 Zellkernen manuell ausgezählt.

2.2.8 Western Blot Analyse

Proteinaufarbeitung

Die Tumorzellkulturen, deren Protein isoliert werden sollte, wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, anschließend mit einem adäquaten Volumen Lysispuffer überschichtet und mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale gelöst und in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt. Eine 30minütige Inkubation auf Eis sowie eine Ultraschallbehandlung lysierten die Zellen vollständig. Die Lysate wurden mit 14000 rpm bei +4°C für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand für Proteinquantifizierung und SDS-PAGE (siehe unten) verwendet. Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit Hilfe des *DC* Protein Assays von BioRad nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Die Absorption der Proben sowie der BSA-Verdünnungen für die Eichkurve wurde bei 620 nm im ELISA-Reader gemessen.

SDS-PAGE, Western Blot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Es wurden je nach Experiment 80 bis 120 µg Protein je Probe bzw. Tasche auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden zuvor mit zweifachem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten in kochendem Wasser denaturiert. Bei 0,1 mA/cm² Gel wurden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt (Sambrook & Russell, CSH protocols 2006). Anschließend wurden die Proteine in einem Semidry-Blot-System bei 0,8 mA/cm² auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Effizienz der Übertragung der Proteine auf die Membran wurde mittels einer essigsauren Ponceau S-Färbung nachgewiesen.

Immundetektion

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % BSA/PBST vorinkubiert. Anschließend wurden die Primärantikörper (siehe Tab. unter *2.1.6*) in 3 % BSA/PBST bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBST für jeweils 10 Minuten folgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Peroxidasegekoppelten Antikörper bei Raumtemperatur. Der Nachweis der spezifischen Antikörper-Protein-Bindung erfolgte durch eine Chemoluminiszenzreaktion und wurde mittels Exposition auf Röntgenfilm und Entwicklung im Röntgenentwicklungsgerät (Agfa-Gevaert) sichtbar gemacht.

2.2.9 Behandlung mit Inhibitoren

Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und in folgenden Stammlösungen aliquotiert: 10 mM (Erlotinib, LY294002), 40 mM (DEAB). Bis zur endgültigen Verwendung wurden diese bei -20 °C gelagert. Erlotinib und LY294002 wurden in einer Endkonzentration von 5 μ M bzw. 10 μ M eingesetzt, DEAB in einer Endkonzentration von 100 μ M. Die Kontrollzellen wurden entsprechend mit der gleichen Konzentration an DMSO behandelt.

2.2.10 Transfektion mit spezifischer siRNA

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 6-well-Platten in geringer Dichte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamin[™] 2000 (Invitrogen), welches in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt wurde, mit der jeweiligen siRNA (siehe Tab. unter *2.1.5*) in einer Konzentration von 50 nM für 48 bis 72 Stunden transfiziert. Hierfür wurde das Kulturmedium durch Opti-MEM ersetzt. Nach der Transfektion wurden die Zellen für Western Blot Analysen sowie Koloniebildungstests verwendet.

2.2.11 Isolation von Tumorstammzellen

Aldefluor™ Assay

Das Prinzip der Detektion von Stamm- und Progenitorzellen sowie der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorstammzellen durch den Aldefluor™ Assay (Aldagen Inc.) basiert auf der erhöhten Enzymaktivität verschiedener Isoformen der Familie der Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDH) in diesen Zelltypen. Ein ungeladenes, fluoreszierendes Substrat (BODIPY-Aminoacetataldehyde, BAAA) wird durch die ALDH in ein geladenes Produkt (BODIPY-Aminoacetate, BAA) umgewandelt. In geladenem Zustand verliert das Produkt die Fähigkeit, durch die Plasmamembran zu diffundieren, akkumuliert somit in Zellen mit hoher ALDH-Aktivität und erhöht dementsprechend deren Fluoreszenz. Stark fluoreszierende bzw. schwach fluoreszierende Zellen wurden jeweils als ALDH^{br} bzw. ALDH^{low} bezeichnet.

Für die Isolation von ALDH^{br} und ALDH^{low} Zellen mittels Aldefluor[™] Assay wurden konfluente Kulturen verwendet. Die Zellen wurden trypsiniert, bei 400 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in FACS-Puffer aufgenommen. Um Zellverklumpungen zu entfernen, wurde die Suspension durch ein Zellsieb (100µm) pipettiert, anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (siehe oben) pelettiert. Dann wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml in Aldefluor[™] Assay-Puffer aufgenommen und 5 µl Aldefluor[™] Reagenz pro 1 x 10⁶ Zellen zugefügt. Als Negativkontrolle wurden sofort 50 µl der Suspension entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem 5 µl (A549) bzw. 1 µl (SK-BR-3) 1.5 mM DEAB in 95 % Ethanol vorgelegt war. Nach einer 35minütigen Inkubation beider Ansätze bei 37 °C wurden die Zellen bei 400 g abzentrifugiert und jeweils in frischem Aldefluor[™] Assay-Puffer resuspendiert. Schließlich konnten die ALDH^{br} / ALDH^{low} Zellen durch durchflusszytometrische Verfahren (siehe folgender Abschnitt) analysiert und ggf. voneinander getrennt werden.

Durchflusszytometrische Analyse und Auftrennung der Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse und die Auftrennung der Zellen mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) erfolgte in der FACS Core Facility der Medizinischen Klinik, Innere Medizin II, Universität Tübingen.

FACS-Analysen wurden mit Hilfe des BD FACSCanto[™] II (BD Biosciences), Analysen mit anschließender Auftrennung unterschiedlicher Zellpopulationen mit Hilfe des BD FACSAria[™] IIu (BD Biosciences) durchgeführt. Gesortete Zellen wurden in sterilen 5 ml FACS-Röhrchen, die mit 1 ml gekühltem Kulturmedium gefüllt waren, aufgenommen. Durchführung und Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen und des Sortens erfolgten mit Hilfe der FACSDiva Software (Version 6.1.2, BD Biosciences).

2.2.12 Densitometrische Auswertung und Statistik

Die densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden, die mittels Western Blot erhalten wurden, erfolgte mit einer bildanalysierenden Software (Scion Image, Scion Corporation). Bei der Bildung arithmetischer Mittelwerte wurde die Standardabweichung angegeben, um eine Abschätzung des Messfehlers von Einzelmessungen zu ermöglichen. Die Signifikanz der erhaltenen Daten wurde mittels zweiseitigem Student's *t*-test mit Hilfe der Software SigmaPlot 2001 (Systat Software GmbH) ermittelt. Werte von p < 0,05 wurden als statistisch signifikant anerkannt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Strahlenbiologische Charakterisierung von radioselektierten humanen Tumorzellen

Nachfolgend wurden für die Strahlenselektionsversuche die humane Lungenkarzinomzelllinie A549, sowie in begrenzterem Umfang auch die Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3, verwendet. Die fraktioniert zu bestrahlenden Tumorzellen wurden jeweils dünn ausgesät und 24 Stunden später bestrahlt. Nach 10 bis 12 Tagen wurden die Klone trypsiniert und erneut ausgesät und bestrahlt. Die mitgeführten Kontroll- bzw. Parentalzellen wurden nicht bestrahlt. Insgesamt erhielten die Zellen 4 Fraktionen mit jeweils 4 Gy (A549) bzw. 3 Gy (SK-BR-3) pro Fraktion.

3.1.1 Klonogenes Überleben und Strahlenresistenz radioselektierter Tumorzellen

Mit Hilfe von Koloniebildungstests wurde untersucht, ob die radioselektierten Tumorzellen strahlenresistenter sind als die Parentalzellen der jeweiligen Zelllinie und ob sich die Koloniebildungseffizienz nach Strahlenselektion verändert. Einzelzell-Kulturen wurden in 6-well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit aufsteigenden Einzeldosen ionisierender Strahlung von 0 bis 4 Gy (A549) bzw. bis 3 Gy (SK-BR-3) bestrahlt. Nach zehntägiger (A549) bzw. 14-tägiger (SK-BR-3) Inkubation wurden die Zellen fixiert und gefärbt, und Klone mit mehr als 50 Zellen ausgezählt.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve in Abb. 3.1 A zeigt, dass die strahlenselektierten A549 Zellen (genannt "A549-R") im untersuchten Strahlendosisbereich von 1 bis 4 Gy signifikant strahlenresistenter als die Parentalzellen waren. Dies war in ähnlicher Form auch bei den radioselektierten SK-BR-3 Zellen (genannt "SK-BR-3-R") zu beobachten (Abb. 3.1 B). Der berechnete D₃₇-Wert der A549-R Zellen war gegenüber den Parentalzellen um 25% erhöht, der D₃₇-Wert der SK-BR-3-R Zellen, die erst ab dem Dosisbereich um 3 Gy Strahlenresistenz zeigen, war nur um 11% gegenüber den Parentalzellen erhöht (Tab. 3.1).

31



Abb. 3.1: Strahlenresistenz von radioselektierten humanen Tumorzellen im klonogenen Assay. Klonogenes Überleben von (A) A549-p und A549-R und (B) SK-BR-3-p und SK-BR-3-R Zellen nach aufsteigenden Einzeldosen ionisierender Bestrahlung von 0 bis 4 bzw. 3 Gy. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± Standardabweichung (SD) aus 15 Datenpunkten von drei biologischen Replikaten (A549) bzw. aus 6 technischen Replikaten (SK-BR-3). Letzteres Ergebnis wird repräsentativ für zwei biologische Replikate gezeigt. (Student's *t*-Test)

Tab. 3.1: Koloniebildungseffizienz (PE, in %), Überlebensfraktion bei 2 und 3 bzw. 4 Gy (SF2, SF3, SF4) und D_{37} -Wert strahlenselektierter humaner Tumorzelllinien. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD aus 15 Datenpunkten von drei biologischen Replikaten (A549) bzw. 6 technischen Replikaten (SK-BR-3). D_{37} = Strahlendosis, bei der die Überlebensfraktion 37 % beträgt.

	PE ± S.D. (%)	SF2	SF3	SF4	D ₃₇ (Gy)
А549-р	51,6 ± 19,5	$0,40 \pm 0,19$	-	0,11 ± 0,07	1,97
A549-R	31,8 ± 12,2	0,53 ± 0,21	-	0,15 ± 0,06	2,45
SK-BR-3-p	38,2 ± 4,20	0,33 ± 0,04	0,13 ± 0,03	-	1,76
SK-BR-3-R	9,10 ± 2,80	$0,40 \pm 0,14$	0,20 ± 0,13	-	1,96

Wie aus Tabelle 3.1 ausserdem ersichtlich wird, weisen die A549-R Zellen eine von 51,6 % auf 31,8 % signifikant reduzierte Koloniebildungseffizienz auf. In den SK-BR-3-R Zellen war die Koloniebildungseffizienz sogar von 38,2 % auf 9,1 % signifikant reduziert.

3.1.2 Verdopplungszeit radioselektierter Tumorzellen

Um die Verdopplungszeit der A549-R Zellen im Vergleich zu den parentalen A549p Zellen zu ermitteln, wurde das Zellwachstum über einen Zeitraum von 7 Tagen gemessen. Für jeden Tag der Wachstumskurve wurden für A549-R und A549-p Zellen jeweils vier Schalen mit definierter Zellzahl ausgesät. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde am jeweiligen Tag lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und jeweils der Mittelwert der Zellzahlen der vier Schalen gebildet. Diese Mittelwerte wurden verwendet, um die Verdopplungszeit der Kulturen mathemathisch zu berechnen. In Tabelle 3.2 sind die Mittelwerte der Verdopplungszeiten von zwei Selektions-Experimenten dargestellt.

Tab. 3.2: Verdopplungszeit ± SD von A549-R und A549-p Zellen. DasWachstum der Zellen wurde über 7 Tage hinweg gemessen, um dieVerdopplungszeit der Zellen mathematisch zu ermitteln. (n = 2)

А549-р	19,25 h ± 0,07 h
A549-R	22,95 h ± 0,49 h



Abb. 3.2: Graphische Darstellung des Wachstums von A549-p und A549-R Zellen. Die Proliferation der Tumorzellen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen hinweg gemessen. Hierbei wurde die Zellzahl jeweils lichtmikroskopisch bestimmt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SD aus 8 Datenpunkten von zwei biologischen Replikaten.

Es konnte beobachtet werden, dass die A549-R Zellen eine um fast vier Stunden längere Generationszeit besitzen als die Parentalzellen. Dies entspricht einer Zunahme der Verdopplungszeit der A549-R Zellen um 19,2 % im Vergleich zu den A549-p Zellen. Obwohl der Unterschied in der Verdopplungszeit laut Student's *t*-

Test nicht signifikant ist, könnte dies trotzdem ein Hinweis auf den Tumorstammzellcharakter der A549-R Zellen sein. Abbildung 3.2 veranschaulicht das Wachstum der A549-p und A549-R Zellen über einen Zeitraum von 7 Tagen graphisch.

3.1.3 Die Transienz des strahlenresistenten Phänotyps

Um zu untersuchen, wie stabil bzw. transient der strahlenresistente Phänotyp der A549-R Zellen ist, wurden deren Koloniebildungseffizienz, ihr klonogenes Überleben nach Bestrahlung mit Einzeldosen und ihre Verdopplungszeit jeweils nach 5 Passagen ohne Selektionsbestrahlung nochmals untersucht.

3.1.3.1 Klonogenes Überleben und Strahlenresistenz 5 Passagen nach Strahlenselektion

Abbildung 3.3 A zeigt, dass sich die Koloniebildungseffizienz der A549-R Zellen wieder dem Niveau der parentalen A549 Zellen angleicht, wenn diese 5 Passagen ohne Selektionsbestrahlung durchlaufen. Ebenso ist zu beobachten, dass die relative Strahlenresistenz der A549-R Zellen gegenüber der A549-p Zellen transient war (Abb. 3.3 B).



Abb. 3.3: Transienz des radioresistenten Phänotyps der strahlenselektierten A549-R Zellen. (A) Koloniebildungseffizienz (PE) von A549-p und A549-R Zellen nach 5 Passagen ohne Selektionsbestrahlung. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SD aus 6 Datenpunkten. (B) Klonogenes Überleben von A549-p und A549-R Zellen nach 5 Passagen ohne Selektionsbestrahlung nach Bestrahlung mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 4 Gy. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SD aus 6 technischen Replikaten.

3.1.3.2 Verdopplungszeit 5 Passagen nach Strahlenselektion

Nicht nur Koloniebildungseffizienz und klonogenes Überleben nach Bestrahlung, sondern auch die Verdopplungszeit der A549-R Zellen hat sich 5 Passagen nach der Selektion wieder dem Niveau der A549-p Zellen angeglichen (Tab. 3.3).

> **Tab. 3.3**: **Verdopplungszeit von A549-p und A549-R Zellen nach 5 Passagen ohne Selektionsbestrahlung.** Das Wachstum der Zellen wurde über 6 Tage hinweg gemessen, um die Verdopplungszeit der Zellen mathematisch zu ermitteln. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD aus jeweils 4 technischen Replikaten.

А549-р	20,81 h ± 0,69 h
A549-R	20,34 h ± 0,82 h

3.1.4 Seneszenz-assoziierte ß-Galaktosidase-Aktivität

Da ionisierende Strahlung durch DNA-Schädigung die sogenannte "*stress-induced premature senescence*" induzieren kann [Zhang, 2007], wurde untersucht ob die reduzierte Koloniebildungseffizienz der strahlenselektierten Tumorzellen durch einen erhöhten Anteil von seneszenten, also sich nicht mehr teilenden Zellen, bedingt sein könnte. Hierfür wurde die seneszenz-assoziierte ß-Galaktosidase-Aktivität der Tumorzellen bei pH 6,0 untersucht.

Nach der letzten Selektionsbestrahlung wurden die A549-p und A549-R Zellen einmal passagiert und dann auf Glasobjektträger ausgesät. Am nächsten Tag betrug die Konfluenz der Kultur etwa 50 % und es wurde mit einer Einzeldosis von 4 Gy bestrahlt, während die Kontrollen unbestrahlt blieben. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe des Senescence ß-Gal Staining Kits gemäß den Angaben des Herstellers fixiert und gefärbt.

Es konnte beobachtet werden, dass sich 24 Stunden nach einer Einzeldosis-Bestrahlung von 4 Gy der Anteil seneszenter Zellen sowohl in A549-p Zellen als auch in A549-R Zellen ungefähr verdoppelte, und zwar von 30,2 % auf 56,4 % bzw. von 34,4 % auf 62,0 % (Abb. 3.4 A, B). Der Unterschied zwischen A549-p und A549-R im Anteil seneszenter Zellen eine Passage nach der Selektion ist so gering, dass praktisch ausgeschlossen werden kann, dass die Reduktion der

Koloniebildungseffizienz der A549-R Zellen durch einen höheren Anteil seneszenter Zellen in der Kultur zum Zeitpunkt der Durchführung des Koloniebildungstests erklärt werden kann.



Abb. 3.4: Zelluläre Seneszenz in A549-p und A549-R Zellen. (A) Seneszenz-assoziierte ß-Galaktosidasefärbung (bei pH 6,0), 24 Stunden nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy (rechte Spalte), sowie ohne Einzeldosis-Bestrahlung (linke Spalte). Seneszente Zellen weisen eine perinukleäre Blaufärbung auf (roter Pfeil). (B) Graphische Darstellung der Anteile seneszenter Tumorzellen aus Abb. 3.4 A (in % \pm SD). Pro Bedingung wurden mindestens 850 Zellen auf 10 Bildausschnitten ausgewertet.

3.2 Die Rolle des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs und der DNA-Reparatur für die Strahlenresistenz radioselektierter Tumorzellen

3.2.1 Einfluss einer EGFR-Hemmung auf klonogenes Überleben und Strahlenresistenz

Um zu untersuchen, ob in den strahlenresistenten Klonen, welche durch die Radioselektion gewonnen werden konnten, EGFR-vermittelte Signalwege eine Rolle für das klonogene Überleben spielen, wurden Koloniebildungstests in Kombination mit dem EGFR-Tyrosinkinase (TK)-Inhibitor Erlotinib (Tarceva®, Roche) durchgeführt. Hierfür wurden A549-p und A549-R Zellen als Einzelzell-Kulturen in 6-well-Platten ausgesät und 22 Stunden später mit 5 µM Erlotinib behandelt. Um das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung zu untersuchen, wurden die Zellen ausserdem nach weiteren zwei Stunden mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 5 Gy bestrahlt. Nach 10 Tagen wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.



Abb. 3.5: Erlotinib hat keinen Effekt auf die Koloniebildungseffizienz (PE) der A549-p und -R Zellen. A549-p Zellen (linke Seite) bzw. A549-R Zellen (rechte Seite) wurden als Einzelzell-Kulturen ausgesät und 22 Stunden später mit 5 μ M Erlotinib bzw. einem äquivalenten Volumen des Vehikels (DMSO) behandelt. Nach 10 Tagen wurden die Zellen gefärbt und Kolonien \geq 50 Zellen ausgezählt. Jede Säule entspricht dem Mittelwert \pm SD aus 6 technischen Replikaten.

Wie in Abbildung 3.5 dargestellt, hat die Hemmung des EGFR durch 5 µM Erlotinib sowohl in A549-p als auch in A549-R Zellen keinen signifikanten Effekt auf die Koloniebildungseffizienz. Jedoch wirkt Erlotinib strahlensensitivierend auf beide Zellpopulationen (Abb. 3.6). Interessanterweise hebt die EGFR-Hemmung durch Erlotinib die Strahlenresistenz der A549-R Zellen auf. Dies bedeutet, dass EGFR- vermittelte Signalwege zumindest teilweise für die Strahlenresistenz der A549-R Zellen verantwortlich zu sein scheinen.



Abb. 3.6: Klonogenes Überleben radioselektierter A549 Zellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit dem EGFR-TK-Inhibitor Erlotinib. 22 Stunden nach Aussaat als Einzelzell-Kulturen wurden die Zellen mit DMSO (Kontrolle, linke Seite) bzw. 5 μ M Erlotinib (rechte Seite) vorbehandelt, nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 5 Gy bestrahlt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SD aus 6 technischen Replikaten.

3.2.2 Einfluss einer PI3K-Hemmung auf klonogenes Überleben und Strahlenresistenz

Um zu untersuchen, welche Rolle der PI3K-Akt Signalweg für die Strahlenresistenz der radioselektierten Tumorzellen spielt, wurde deren klonogenes Überleben in Koloniebildungstests unter Einfluss des PI3K-Inhibitors LY294002 (LY) untersucht. Hierfür wurden Einzelzell-Kulturen in 6-well-Platten ausgesät und nach 22 Stunden mit 10 µM LY behandelt. Um das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung zu untersuchen, wurden die Zellen nach zweistündiger LY-Vorbehandlungszeit mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 4 Gy bestrahlt. Nach 10 (A549) bzw. 20 Tagen (SK-BR-3) wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.



Abb. 3.7: Der PI3K-Inhibitor LY294002 reduziert signifikant die Koloniebildungseffizienz (PE) von A549-p und -R Zellen (A), aber nicht von SK-BR-3-p und -R Zellen (B). Die Zellen wurden als Einzelzell-Kulturen in 6-well-Platten ausgesät und nach 22 Stunden mit 10 μM LY294002 behandelt. Nach 10 (A549) bzw. 20 Tagen (SK-BR-3) wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt. Jede Säule entspricht dem Mittelwert ± SD aus 12 Datenpunkten von zwei biologischen Replikaten (A549) bzw. aus 6 technischen Replikaten (SK-BR-3). (Student's *t*-Test)



Abb. 3.8: Klonogenes Überleben radioselektierter humaner Tumorzellen nach ionisierender Strahlung in Kombination mit dem PI3K-Inhibitor LY294002. 22 Stunden nach Aussaat wurde mit 10 μ M LY vorbehandelt, nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit wurde mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 4 bzw. 3 Gy bestrahlt. (A) A549-p und A549-R Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SD aus 12 Datenpunkten von zwei biologischen Replikaten (Student's *t*-Test). (B) SK-BR-3-p und -R Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SD aus 6 technischen Replikaten.

Die Inhibition der PI3K durch LY294002 bewirkte eine signifikante Reduzierung der Koloniebildungseffizienz der A549-p und A549-R, aber nicht der SK-BR-3-p und SK-BR-3-R Zellen, für die nur eine tendenzielle Reduktion zu beobachten war

(Abb. 3.7). Der Unterschied bezüglich der Koloniebildungseffizienz zwischen A549p und A549-R Zellen konnte durch Inhibition der PI3K aufgehoben werden. Abbildung 3.8 zeigt das klonogene Überleben radioselektierter A549 bzw. SK-BR-3 Zellen nach ionisierender Strahlung und zweistündiger LY294002-Vorbehandlung in einer Konzentration von 10 μ M. Die Strahlenresistenz der radioselektierten Tumorzellen konnte durch die PI3K-inhibition aufgehoben werden (vgl. Abb. 3.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der PI3K-Akt Signalweg eine Rolle für die Strahlenresistenz der radioselektierten Tumorzellen spielen könnte.

3.2.3 Die Rolle der DNA-Reparatur für die Strahlenresistenz

Um zu untersuchen, in welchem Maße die DNA-Reparatur in den radioselektierten Tumorzellen für deren Strahlenresistenz eine Rolle spielt, wurde die Zahl der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs) im Zellkern mittels γ H2AX-Immunfärbung (siehe auch 2.2.7 γ H2AX Focus Assay) 24 Stunden nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy quantitativ ermittelt. Des Weiteren wurden Western Blot Analysen durchgeführt, um die Expression und Aktivität der DNA-PKcs, eines zentralen DNA-Reparaturproteins, in den strahlenselektierten und parentalen Tumorzellen zu untersuchen.

3.2.3.1 γH2AX Focus Assay

A549-p und A549-R Zellen wurden auf Chamber Slides ausgesät und 24 Stunden später mit einer Einzeldosis von 0 oder 4 Gy bestrahlt. Es ließ sich zunächst beobachten, dass die strahlenselektierten A549-R Zellen basal eine leicht erhöhte Zahl an γ H2AX Foci aufweisen (Abb. 3.9 A, B). Vierundzwanzig Stunden nach der Induktion von DNA-DSBs durch die Einzeldosis-Bestrahlung war die Zahl der residuellen DNA-DSBs in den strahlenresistenten A549-R Zellen signifikant niedriger als in den parentalen A549-p Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Strahlenresistenz der A549-R Zellen durch eine effektivere DNA-DSB-Reparatur nach Strahlenschädigung zu erklären sein könnte.



Abb. 3.9: Darstellung der residuellen DNA-DSBs in radioselektierten A549 Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung mittels γ H2AX Focus Assay. A549-p und A549-R Zellen wurden auf Chamber Slides ausgesät und nach 24 Stunden mit 0 oder 4 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen fixiert. Mittels einem anti-phospho H2AX (Ser139)-Antikörper wurden die DNA-Restschäden markiert und am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. (A) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von A549-p und A549-R Zellen 24 Stunden nach 0 bzw. 4 Gy. (B) Graphische Darstellung der γ H2AX Foci aus Abb. 3.9 (A). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SEM aus mindestens 220 ausgezählten Zellkernen/Bedingung. (Student's *t*-Test)

Bestrahlungsdosis

0 Gy

4 Gy

3.2.3.2 Proteinexpression und Aktivität der DNA-PKcs

Für die Western Blot Analysen wurden die strahlenselektierten Tumorzellpopulationen in Zellkulturschalen ausgesät, bis zur Konfluenz im Brutschrank inkubiert und zu den angegeben Zeiten nach Einzeldosis-Bestrahlung mit 4 Gy in Lysepuffer aufgenommen.



Abb. 3.10: Vergleich der Proteinexpression und des Aktivierungslevels der DNA-PKcs nach Einzeldosisbestrahlung von radioselektierten Tumorzellen. (A) Konfluente A549-p und A549-R Zellen sowie (B) SK-BR-3-p und SK-BR-3-R Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt oder blieben unbestrahlt (-). Nach den angegeben Zeitpunkten wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen und für die Western Blot Analyse verwendet. Jeweils unten: Graphische Darstellung der verhältnismäßigen Expression von S2056 (DNA-PKcs) zu DNA-PKcs anhand densitometrischer Auswertung der Banden.

Bezüglich der Proteinexpression der DNA-PKcs läßt sich jeweils kein Unterschied zwischen A549-p und A549-R sowie SK-BR-3-p und SK-BR-3-R feststellen (Abb. 3.10 A, B). Bedeutend für die Aktivität der DNA-PKcs ist die Phosphorylierung an Serin 2056 (S2056, Autophosphorylierung). Vergleicht man diese zwischen A549-p und A549-R Zellen (Abb. 3.10 A), so kann man nicht nur basal, sondern auch im untersuchten Zeitfenster von 10 Minuten bis 6 Stunden nach Bestrahlung eine erhöhte Autophosphorylierung der DNA-PKcs in den A549-R Zellen beobachten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt man im SK-BR-3-Modell (Abb. 3.10 B), wo jedoch nur die Zeitpunkte 10 und 60 Minuten nach Bestrahlung untersucht wurden, und basal kein phospho-S2056 messbar war. Diese Ergebnisse unterstützen die Schlussfolgerung des vorangegangenen Abschnitts, nach dem die DNA-DSB-Reparatur für die Strahlenresistenz der radioselektierten Zellen eine Rolle zu spielen scheint.

3.3 Können durch Radioselektion humaner Tumorzelllinien TSZ-Marker exprimierende Subpopulationen angereichert werden?

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass sogenannte Tumorstammzellen (TSZ) für die Resistenz eines Tumors gegen Strahlentherapie verantwortlich zu sein scheinen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob in den strahlenresistenten Tumorzellpopulationen, welche in den beiden vorangegangenen Abschnitten beschrieben wurden, TSZ-ähnliche Zellen angereichert sind. Hierfür wurde in den radioselektierten Tumorzellen und ihren Parentalzellen die Expression der in der Literatur diskutierten potenziellen TSZ-Marker CD133, Oct-4 sowie Sox2 mittels Western Blot Analyse untersucht. Des Weiteren wurde die Proteinexpression zweier Isoformen des funktionalen TSZ-Markers Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) analysiert. Viel aussagekräftiger ist in diesem Zusammenhang allerdings die Enzymaktivität der ALDH, welche mittels Aldefluor® Assay gemessen wurde.

3.3.1 CD133, Oct-4 und Sox2 Expression

Um die Proteinexpression und eventuelle strahleninduzierte Modulation der Expression von CD133, Oct-4 und Sox2 in den radioselektierten A549 und SK-BR-3 Zellen zu untersuchen, wurden diese in Kulturschalen ausgesät und bis zur Kon-

43

fluenz im Brutschrank inkubiert. Zu den angegeben Zeiten nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy bzw. ohne weitere Einzeldosisbestrahlung wurden die Zellen dann in Lysepuffer aufgenommen und die Proben für die Western Blot Analyse vorbereitet.



Abb. 3.11: Vergleich der Proteinexpression von potenziellen Tumorstammzellmarkern CD133 (A), Oct-4 (B) und Sox2 (C) ohne und nach Bestrahlung in A549-p und A549-R, sowie SK-BR-3-p und SK-BR-3-R Zellen. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Zu den angegeben Zeiten nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy bzw. ohne Bestrahlung (-) wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen und die Proben für die Western Blot Analyse vorbereitet. Die Zelllinie NCCIT (Teratoma) wurde als Positivkontrolle für die CD133-Expression in SK-BR-3 Zellen eingesetzt. Wie in Abbildung 3.11 A zu sehen, wurden sowohl in A549-p als auch A549-R Zellen etwa gleiche Mengen an CD133 exprimiert. Jedoch konnte eine strahleninduzierte Modulation von CD133 in A549-R Zellen 6 Stunden nach Bestrahlung beobachtet werden. In SK-BR-3 Zellen konnten nur sehr geringe Mengen an CD133 nachgewiesen werden. Dies zeigt der Vergleich mit der Teratomzelllinie NCCIT, welche hier als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Zwischen SK-BR-3-p und SK-BR-3-R gab es keinen Unterschied bzgl. der CD133-Proteinexpression. Oct-4 konnte weder in A549-p noch in A549-R Zellen mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden (Abb. 3.11 B). Hierbei wurden SK-BR-3-R Zellen als Positivkontrolle verwendet. Vergleicht man die Oct-4 Proteinexpression in SK-BR-3-p und SK-BR-3-R Zellen, so kann man interessanterweise eine Anreicherung des TSZ-Markers in den strahlenresistenten SK-BR-3-R Zellen beobachten (Abb. 3.11 B). Eine strahleninduzierte Modulation der Oct-4 Expression konnte, zumindest im beobachteten Zeitfenster bis 60 Minuten nach Bestrahlung, nicht eindeutig festgestellt werden. Auch die Proteinexpression von Sox2 konnte durch eine Einzeldosis von 4 Gy in beiden Tumorzelllinien im untersuchten Zeitfenster bis 20 bzw. 24 Stunden nicht moduliert werden (Abb. 3.11 C). Des Weiteren war weder in A549-R noch in SK-BR-3-R Zellen eine Anreicherung des TSZ-Markers Sox2 im Vergleich zu den Parentalzellen zu beobachten (Abb. 3.11 C).

3.3.2 Aldehyd-Dehydrogenasen

3.3.2.1 ALDH1A1 und ALDH2 Proteinexpression

Für die Western Blot Analyse wurden die radioselektierten A549 und SK-BR-3 Zellen in Kulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Zu den angegeben Zeiten nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy bzw. ohne weitere Einzeldosisbestrahlung wurden die Zellen dann in Lysepuffer aufgenommen und die Proben für die Analyse vorbereitet.



Abb. 3.12: Western Blot Analyse der Proteinexpression und strahleninduzierten Modulation von ALDH1A1 bzw. ALDH2 in A549-p/-R bzw. SK-BR-3-p/-R Zellen. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Zu den angegeben Zeiten nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy bzw. ohne Bestrahlung (-) wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen und die Proben für den Western Blot vorbereitet.

Abbildung 3.12 zeigt, dass die Expression von ALDH1A1 weder in A549-R Zellen gegenüber A549-p Zellen erhöht ist, noch durch ionisierende Strahlung in einem Zeitraum von bis zu 24 Stunden moduliert werden kann. Da in SK-BR-3 Zellen ALDH1A1 mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte (siehe 3.5.3, Abb. 3.28), wurde in diesen Zellen die Proteinexpression von ALDH2, einer anderen Isoform der ALDH-Familie, untersucht. Auch hier war kein Unterschied zwischen parentalen und strahlenselektionierten Zellen, und im untersuchten Zeitraum bis 60 Minuten keine strahleninduzierte Modulation zu beobachten.

3.3.2.2 Messung der ALDH Enzymaktivität mittels Aldefluor™ Assay

Um zu untersuchen, ob es in den A549-R Zellen eine Anreicherung von Zellen mit ALDH-Enzymaktivität (ALDH^{bright}, ALDH^{br}) im Vergleich zu den Parentalzellen gab, wurden A549-p und A549-R Zellen in Kulturflaschen ausgesät und 6 Tage im Brutschrank inkubiert. In konfluentem Zustand wurden die Zellen schließlich abtrypsiniert und mit dem Aldefluor® Kit (Aldagen Inc.) gefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse bzw. Auftrennung mit FACS (*fluorescence-activated cell sorting*).

Wie in Abbildung 3.13 zu sehen, wiesen A549-p und A549-R Zellen mit 29,2 % bzw. 30,1 % gleiche Anteile an ALDH^{br} Zellen auf. Die Strahlenresistenz der A549-R Zellen hängt somit wahrscheinlich nicht mit einer erhöhten ALDH^{br}-Population zusammen.



Abb. 3.13: A549-p und A549-R Zellen weisen gleiche Anteile an ALDH^{bright (br)} Zellen auf. Radioselektierte und parentale Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und im Brutschrank inkubiert. In konfluentem Zustand wurden die Zellen dann abtrypsiniert und in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml mit dem Aldefluor® Kit gemäß den Angaben des Herstellers gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. **Obere Reihe:** FACS-Analyse der A549-p Zellen, der Anteil der ALDH^{br} Zellen betrug 29,2 %. **Untere Reihe:** FACS-Analyse der A549-R Zellen, der Anteil der ALDH^{br} Zellen betrug 30,1 %. Jeweils links: DEAB-behandelte Kontrolle (150 µM, 1 x 10⁶ Zellen/ml). Das abgebildete Experiment ist repräsentativ für zwei biologische Replikate gezeigt.

Die jeweils in ALDH^{br} und ALDH^{low} (= niedrige ALDH-Aktivität) aufgetrennten radioselektierten A549 Zellen wurden ausserdem mittels Western Blot Analyse hinsichtlich ihrer ALDH1A1 Expression verglichen (Abb. 3.14). Es konnte hierbei kein Unterschied in der ALDH1A1 Expression zwischen ALDH^{br}- und ALDH^{low}-Population festgestellt werden. Des Weiteren wiesen A549-p und A549-R Zellen, wie auch schon unter Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben, gleiche Mengen an ALDH1A1 Protein auf.



Abb. 3.14: ALDH^{br}- und ALDH^{low}-Populationen von A549-p bzw. A549-R Zellen weisen gleiche Mengen an ALDH1A1 auf. Die Zellen wurden direkt nach dem FACS-Sort abzentrifugiert und in Lysepuffer aufgenommen, anschließend erfolgte Proteinisolierung und Western Blot Analyse.

3.3.2.3 Klonogenes Überleben radioselektierter ALDH^{br} und ALDH^{low} A549 Zellen nach ionisierender Bestrahlung

Die unter Abschnitt 3.3.2.2 beschriebenen radioselektierten und anschließend in ALDH^{br} und ALDH^{low} aufgetrennten A549 Zellen sollten nun hinsichtlich ihres klonogenen Überlebens nach ionisierender Strahlung untersucht werden. Dazu wurden diese als Einzelzellen in 6-well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit aufsteigenden Einzeldosen ionisierender Strahlung behandelt. Nach 9-tägiger Inkubation im Brutschrank wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.



Abb. 3.15: In ALDH^{br}- und ALDH^{low}-Populationen aufgetrennte radioselektierte A549 Zellen zeigen unterschiedliche Strahlenresistenz. Das klonogene Überleben der Zellen nach aufsteigenden Einzeldosen ionisierender Bestrahlung von 0 bis 4 Gy wurde im Koloniebildungstest untersucht. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus 6 technischen Replikaten.

Interessanterweise war zu beobachten, dass die Strahlenresistenz der A549-R Zellen im Vergleich zu den A549-p Zellen deutlicher zu Tage tritt, wenn man die ALDH^{br} Zellen der beiden Populationen separat von den ALDH^{low} Zellen im Koloniebildungstest untersucht (Abb. 3.15).

3.4 Die Strahlenresistenz von ALDH^{br} und ALDH^{low} Populationen humaner Tumorzelllinien und die Rolle des PI3K-Akt Signalwegs

Im vorangegangenen Abschnitt wurde erwähnt, dass A549-p und A549-R ALDH^{br} Zellen strahlenresistenter sind als die entsprechenden ALDH^{low} Zellen. Aus der Literatur ist bekannt, dass unter anderem durch ALDH-Enzymaktivität charakterisierte potenzielle TSZ-Populationen resistent gegen ionisierende Strahlung sind [Croker & Allan, 2011]. Dies sollte nun für ALDH^{br} Zellen der Zelllinien A549 und SK-BR-3 untersucht werden. Ausserdem wurde die Rolle des PI3K-Akt Signalwegs für die Strahlenresistenz dieser ALDH^{br} Populationen beleuchtet.

Um aus A549 und SK-BR-3 Zellkulturen jeweils ALDH^{br}- und ALDH^{low}-Populationen zu isolieren, wurden die Zellen mit dem Aldefluor®-Reagenz gefärbt und mittels FACS sortiert. Der Anteil der ALDH^{br} Zellen an der Gesamtpopulation lag bei 32,72 % ± 10,12 % (n = 8) für A549 Zellen und bei 50,38 % ± 24,51 % (n = 6) für SK-BR-3 Zellen. Als ALDH^{low} wurden für die Koloniebildungstests nur die am schwächsten fluoreszierenden 6,36 % ± 3,48 % (A549) bzw. 11,38 % ± 7,59 % (SK-BR-3) der Gesamtpopulation verwendet. Abbildung 3.16 zeigt jeweils repräsentative FACS-Analysen.



▲ Abb 3.16: Aldefluor® FACS-Analyse für die anschließende Isolierung von ALDH^{br} und ALDH^{low}-Populationen. A549 (A) und SK-BR-3 (B) Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und im Brutschrank inkubiert. In konfluentem Zustand wurden die Zellen dann abtrypsiniert und mit dem Aldefluor® Kit gemäß den Angaben des Herstellers gefärbt. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse. Jeweils links: DEAB-behandelte Kontrolle (150 µM). P2 = ALDH^{low}-Population, P3 = ALDH^{br}-Population. Abgebildete Experimente sind jeweils repräsentativ für 8 (A549) bzw. 6 (SK-BR-3) biologische Replikate gezeigt.

3.4.1 Koloniebildungseffizienz und klonogenes Überleben nach ionisierender Strahlung von ALDH^{br} und ALDH^{low} Zellen

Die mit Hilfe von Aldefluor®-Färbung und FACS erhaltenen ALDH^{br}- und ALDH^{low}-Populationen wurden nun als Einzelzellen in 6-well-Platten ausgesät, um das klonogene Überleben ohne und nach ionisierender Strahlung zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen 24 Stunden nach Aussaat mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 4 Gy bestrahlt. Nach 9 (A549) bzw. 18 bis 20 Tagen (SK-BR-3) wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.



Abb. 3.17: ALDH^{br} und ALDH^{low} A549 (A) bzw. SK-BR-3 (B) Zellen zeigen keinen Unterschied in der Koloniebildungseffizienz. Einzelzell-Kulturen wurden in 6-well-Platten ausgesät. Nach 9 (A549) bzw. 18 bis 20 Tagen (SK-BR-3) wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt. Jede Säule entspricht dem Mittelwert ± SD aus 5 biologischen Replikaten (A549) bzw. aus 18 Datenpunkten von drei biolgischen Replikaten (SK-BR-3).

Bezüglich der Koloniebildungseffizienz von A549 ALDH^{br} und ALDH^{low} Zellen sowie SK-BR-3 ALDH^{br} und ALDH^{low} Zellen konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.17). Umso auffälliger ist die Strahlenresistenz der ALDH^{br}-Zellen im Vergleich zu den ALDH^{low}-Zellen (Abb. 3.18). Dies gilt sowohl für A549 als auch SK-BR-3 Zellen, bei denen sich die D₃₇-Werte von ALDH^{br} und ALDH^{low} Zellen jeweils signifikant unterschieden (Tab. 3.4).



Abb. 3.18: Tumorzellen mit ALDH-Enzymaktivität (ALDH^{br}) sind resistenter gegen ionisierende Strahlung als ALDH^{low} Zellen derselben Kultur. Klonogenes Überleben von (A) A549 und (B) SK-BR-3 Zellen, welche mittels Aldefluor®-FACS aufgetrennt wurden, nach aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 4 Gy. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SD aus 30 Datenpunkten von 5 biologischen Replikaten (A549) bzw. aus 6 technischen Replikaten (SK-BR-3). Letzteres Ergebnis wird repräsentativ für drei biologische Replikate gezeigt. (Student's *t*-Test)

Tab. 3.4: Vergleich der D_{37} -Werte von ALDH^{br} und ALDH^{low} A549 bzw. SK-BR-3 Zellen mit Angabe des *p*-Werts. Der Berechnung des D_{37} liegen 5 (A549) bzw. 4 (SK-BR-3) biologische Replikate zugrunde.

Zellpopulation	D ₃₇ (Gy)	<i>p</i> -Wert	
A549 ALDH ^{br}	2,49	0.042	
A549 ALDH ^{low}	1,83	0.042	
SK-BR-3 ALDH ^{br}	1,76	0.040	
SK-BR-3 ALDH ^{low}	1,33	0.049	

3.4.2 Die Rolle des PI3K-Akt Signalwegs für die Strahlenresistenz von ALDH^{br} Tumorzellen

Um nun zu klären, welche Rolle der PI3K-Akt Signalweg für die Strahlenresistenz der ALDH^{br} Zellen spielt, wurde deren klonogenes Überleben nach Bestrahlung im Koloniebildungstest unter Einfluss des PI3K-Inhibitors LY294002 im Vergleich zu ALDH^{low} Zellen untersucht. Hierfür wurden die mit Hilfe von Aldefluor®-Färbung und FACS erhaltenen ALDH^{br}- und ALDH^{low}-Populationen der Tumorzelllinien A549 und SK-BR-3 als Einzelzell-Kulturen in 6-well-Platten ausgesät und 22 Stun-

den später mit 10 µM LY behandelt. Nach zweistündiger LY-Vorbehandlungszeit wurden die Zellen dann mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 4 Gy bestrahlt. Nach durchschnittlich 10 Tagen (A549) bzw. nach 18 Tagen (SK-BR-3) wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.

Wie in Abbildung 3.19 zu sehen, konnte die Strahlenresistenz sowohl der A549 ALDH^{br} Zellen (3.19 A) als auch der SK-BR-3 ALDH^{br} Zellen (3.19 B) gegenüber den jeweiligen ALDH^{low} Zellen durch Inhibition der PI3K aufgehoben werden. Abbildung 3.19 C veranschaulicht dies zusätzlich durch Darstellung der Überlebensfraktion bei 2 Gy im Balkendiagramm.



◀ Abb. 3.19: Die Strahlenresistenz von ALDH^{br} Tumorzellen ist zumindest teilweise vom PI3K Signalweg abhängig. Klonogenes Überleben von (A) A549 und (B) SK-BR-3 Zellen, welche mittels Aldefluor®-FACS in ALDH^{br} und ALDH^{low} aufgetrennt wurden, nach aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 4 Gy. Zuvor wurde für 2 h mit 10 µM LY behandelt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SD aus 12 Datenpunkten von 2 biologischen (A549) bzw. aus 6 technischen Replikaten (SK-BR-3). (C) Darstellung der Überlebensfraktion bei 2 Gy (SF₂) aus 3.19 A. (Student's *t*-Test)

3.5 Die Rolle von Aldehyd-Dehydrogenasen für die Strahlenresistenz

humaner Tumorzelllinien

3.5.1 Auswirkungen einer Hemmung von ALDH durch

Diethylaminobenzaldehyd

Um die funktionale Rolle der ALDH im Zusammenhang mit Strahlenresistenz humaner Tumorzelllinien zu untersuchen, wurde Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) eingesetzt. DEAB inhibiert die Enzymaktivität verschiedener Isoformen der ALDH-Familie, darunter zum Beispiel ALDH1A1, ALDH1A2 oder ALDH2 [Moreb *et al.*, 2012].

3.5.1.1 Einfluß von DEAB auf das Proteinexpressionslevel von ALDH Isoformen und ErbB-Rezeptoren

Um zu untersuchen, ob sich die Behandlung mit DEAB auf das Proteinexpressionslevel von ALDH Isoformen (ALDH1A1, ALDH2) und/oder ErbB-Rezeptoren (EGFR, ErbB2) in A549 und H460 Zellen bzw. SK-BR-3 und MDA-MB-231 Zellen auswirkt, wurden diese ausgesät und nach 24 Stunden für 24, 48 oder 72 Stunden mit DEAB (100 μ M) behandelt. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen und die Proben für die nachfolgende SDS-PAGE und Western Blot Analyse vorbereitet.

Abbildung 3.20 A zeigt, dass die Hemmung der ALDH-Aktivität durch 100 µM DEAB die Proteinexpression von ALDH1A1 bzw. ALDH2 in den Lungenkarzinomzelllinien A549 und H460 bzw. in den Brustkrebszelllinien SK-BR-3 und MDA-MB-231 im Behandlungzeitraum von 24 bis 72 Stunden nicht verändert. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Inhibition der ALDH-Enzymaktivität keinen Einfluß auf das Expressionslevel von EGFR bzw. ErbB2 in den untersuchten Lungenkarzinomzellen respektive Brustkrebszellen hat. Vergleicht man nun ausserdem die Aktivität des EGFR in A549 Zellen, die entweder 72 h mit oder ohne DEAB kultiviert wurden (Abb. 3.20 B), so ist 5 und 10 Minuten nach Bestrahlung mit 4 Gy und nach fünfminütiger EGF-Behandlung (1:2000) jeweils kein Unterschied im Tyrosin-Phosphorylierungsstatus zwischen Kontroll- und DEAB-behandelten Zellen festzustellen.



Abb. 3.20: (A) DEAB hat keinen Einfluß auf das Expressionslevel von ALDH1A1 und EGFR in A549 und H460 Zellen bzw. ALDH2 und ErbB2 in SK-BR-3 und MDA-MB-231 Zellen. Die vier Zelllinien wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit 100 μ M DEAB bzw. dem Vehikel DMSO (-) behandelt und anschließend in Lysepuffer aufgenommen. Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und dann auf Nitrocellulosemembran übertragen. (B) **DEAB hat keinen Einfluß auf das Aktivitätslevel des EGFR in A549 Zellen.** Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 100 μ M DEAB bzw. dem Vehikel DMSO (con) behandelt und entweder nicht bestrahlt, mit 4 Gy bestrahlt, oder 5 Minuten mit EGF behandelt, bevor sie in Lysepuffer aufgenommen wurden.

3.5.1.2 Einfluss von DEAB auf Koloniebildungseffizienz und klonogenes Überleben nach ionisierender Strahlung

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob und wie sich die ALDH-Hemmung durch DEAB auf die Koloniebildungseffizienz (PE) und das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung auf humane Tumorzellen auswirkt. Hierzu wurden A549, H460, SK-BR-3 und MDA-MB-231 Zellen als Einzelzell-Kulturen in 6-well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 100 µM DEAB behandelt. Nach 5 Stunden Vorbehandlungszeit wurden die Zellen mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 4 Gy bestrahlt.



Abb. 3.22: Die Inhibition der ALDH durch DEAB hat unterschiedliche Effekte auf die Koloniebildungseffizienz in Abhängigkeit von der Zelllinie. A549, H460, SK-BR-3 und MDA-MB-231 Zellen wurden als Einzelzell-Kulturen in 6-well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 100 μ M DEAB behandelt. Nach ca. 10 (A549, H460, MDA-MB-231) bzw. 20 (SK-BR-3) Tagen wurden die Kolonien gefärbt und Kolonien mit \geq 50 Zellen ausgezählt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus 12 Datenpunkten von zwei (A549, H460) bzw. 18 Datenpunkten von drei biologischen Replikaten (SK-BR-3, MDA-MB-231). (Student's *t*-Test)

Nach Behandlung mit DEAB kann man, abhängig von der Zelllinie, unterschiedliche Auswirkungen auf die PE beobachten (Abb. 3.22). In A549 und MDA-MB-231 Zellen reduzierte DEAB die PE signifikant, in H460 Zellen jedoch konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. In SK-BR-3 Zellen war nach DEAB-Behandlung interessanterweise eine signifikante Erhöhung der PE zu beobachten. Die Effekte auf PE und klonogenes Überleben nach Bestrahlung unter Einfluß von

DEAB korrelierten (Abb. 3.23, 3.24). Am eindrucksvollsten zeigte sich die Wirkung von DEAB auf das klonogene Überleben nach IR in A549 sowie SK-BR-3 Zellen, wo starke Strahlensensibilisierung bzw. -protektion zu beobachten war.



Abb. 3.23: Die Inhibition der ALDH hat unterschiedliche Effekte auf das klonogene Überleben nach ionisierender Bestrahlung, abhängig von der Zelllinie. A549, H460, SK-BR-3 und MDA-MB-231 Zellen wurden als Einzelzell-Kulturen in 6-well-Platten ausgesät und am nächsten Tag für 5 Stunden mit 100 μ M DEAB behandelt, bevor mit Einzeldosen von 0 bis 4 Gy bestrahlt wurde. Nach ca. 10 (A549, H460, MDA-MB-231) bzw. 20 (SK-BR-3) Tagen wurden die Kolonien gefärbt und Kolonien mit \geq 50 Zellen gezählt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus 12 Datenpunkten von zwei (A549, H460) bzw. 18 Datenpunkten von 3 biologischen Replikaten (SK-BR-3, MDA-231). (Student's *t*-Test)



Abb. 3.24: Der Einfluß von DEAB auf das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung hängt mit dem Einfluß auf die Koloniebildungseffizienz (PE) zusammen. Die prozentuale Änderung der Überlebensfraktion bei 4 Gy (Δ SF 4 Gy, entnommen aus Abb. 3.23) und der PE (Δ PE, entnommen aus Abb. 3.22) unter Einfluß von 100 µM DEAB wurden gegeneinander aufgetragen.



Abb 3.25: Die Koloniebildungseffizienz von ALDH^{br} und ALDH^{low} Tumorzellen wird durch ALDH-Inhibition gleichermaßen beeinflußt. A549 (A) und SK-BR-3 (B) Zellen, die zuvor mit Hilfe von Aldefluor®-Färbung und FACS jeweils in ALDH^{br}- und ALDH^{low}-Populationen aufgetrennt wurden, wurden als Einzelzell-Kulturen in 6-well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit 100 μ M DEAB behandelt. Nach 8 (A549) bzw. 20 (SK-BR-3) Tagen wurden die Kolonien gefärbt und Kolonien mit \geq 50 Zellen ausgezählt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus 18 Datenpunkten von drei biologischen Replikaten. (Student's *t*-Test)

Untersucht man nun in einem gleichartigen Experiment A549 und SK-BR-3 Zellen, welche zuvor in ALDH^{br} und ALDH^{low}-Populationen aufgetrennt wurden, so läßt sich beobachten, dass die Koloniebildungseffizienz von ALDH^{br} und ALDH^{low} Zellen durch DEAB-Behandlung jeweils gleich stark signifikant reduziert (A549) bzw. signifikant erhöht (SK-BR-3) wird (Abb. 3.25 A, B).



Abb. 3.26: Die ALDH-Inhibition durch DEAB hebt die relative Strahlenresistenz der (A) A549 ALDH^{br}-Population gegenüber den A549 ALDH^{low} Zellen auf, wirkt sich jedoch nicht differentiell auf (B) SK-BR-3 ALDH^{br} und ALDH^{low} Zellen aus. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert ± SD aus 9 Datenpunkten von zwei biologischen Replikaten (A549) bzw. 6 Datenpunkten (SK-BR-3). Letztere Abbildung ist repräsentativ für drei biologische Replikate gezeigt. (Student's *t*-Test)

Im Koloniebildungstest zeigte sich, dass sowohl A549 ALDH^{br} als auch A549 ALDH^{low} Zellen durch die DEAB-Behandlung strahlensensitiviert werden (Abb. 3.26 A). Jedoch wirkt sich die ALDH-Inhibition auf die A549 ALDH^{br} Zellen stärker aus, so dass der signifikante Unterschied in der Strahlenresistenz zwischen ALDH^{br} und ALDH^{low} Zellen aufgehoben war. Auch im Fall der SK-BR-3 Zellen ist ein Effekt auf beide Populationen, ALDH^{br} und ALDH^{low}, zu beobachten (Abb. 3.26 B). Interessanterweise jedoch, wie schon unter 3.5.1.2 beschrieben, wirkte sich DEAB auf SK-BR-3 Zellen radioprotektiv aus. Anders als bei den A549 Zellen ist der Effekt hierbei auf beide Populationen gleich stark.

3.5.2 Proteinexpressionsmuster verschiedener ALDH Isoformen in vier humanen Tumorzelllinien

Für die Western Blot Analysen wurden A549, H460, SK-BR-3 und MDA-MB-231 Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und jeweils bis zur Konfluenz 4 bis 6 Tage im Brutschrank inkubiert. Dann wurden sie mit Lysepuffer abgekratzt und die Proben wurden für die Analyse vorbereitet.



Abb. 3.27: Vergleich der Proteinexpression verschiedener ALDH-Isoformen der Klasse 1 und 2 in den humanen Tumorzelllinien A549, H460 (Lungenkarzinom), sowie SK-BR-3 und MDA-MB-231 (Mammakarzinom). Die Zellen wurden jeweils in Zellkulturschalen ausgesät, bis zur Konfluenz 4 bis 6 Tage im Brutschrank inkubiert, dann in Lysepuffer aufgenommen und für die Western Blot Analyse verwendet.

Wie in Abbildung 3.27 zu sehen, werden die vier Isoformen ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 und ALDH2 in den vier untersuchten Zelllinien unterschiedlich exprimiert. ALDH1A1 ist in A549 Zellen sehr stark exprimiert, hingegen in H460 Zellen vergleichsweise schwach. In SK-BR-3 und MDA-MB-231 Zellen konnte überhaupt keine Expression dieser Isoform nachgewiesen werden. ALDH1A2 wird in allen vier Zelllinien exprimiert, jedoch in H460 nur sehr schwach. Es ist davon auszugehen, dass die zweite, obere Bande, die hier in den A549 Zellen zu sehen ist, eine unspezifische Bindung des ALDH1A2-Antikörpers an ALDH1A1 darstellt. Auch ALDH2 konnte in allen vier Zelllinien nachgewiesen werden, am stärksten wird diese Isoform in A549 und SK-BR-3 Zellen exprimiert, am schwächsten in H460 Zellen. In obiger Abbildung wird die ALDH2-Bande der A549 Zellen von einer unspezifischen Bindung des Antikörpers an ALDH1A1 überdeckt; Abbildung 3.28 A verdeutlicht die ALDH2 Expression in A549 Zellen besser. Der Antikörper gegen ALDH1A3 erzeugte starke Hintergrundsignale, jedoch konnte zumindest in SK-BR-3 Zellen ALDH1A3 gefunden werden.

3.5.3 Transfektion mit ALDH1A1 oder ALDH2 siRNA und klonogenes Überleben nach ionisierender Bestrahlung

Eine andere Methode, die Rolle der ALDH für die Strahlenresistenz von humanen Tumorzelllinien zu untersuchen, stellte die temporäre Hemmung der Proteinexpression der Isoformen ALDH1A1 und ALDH2 mittels spezifischer siRNA (*small interfering* RNA) mit anschließendem Koloniebildungstest dar. Für die Transfektion wurden A549 bzw. SK-BR-3 Zellen in 70 bis 80 %iger Dichte in 6-well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die spezifischen siRNAs sowie eine *non-silencing* Kontroll siRNA mit Hilfe von Lipofectamin[™] 2000 (Invitrogen) in die Zellen eingeschleust. Dazu wurde das Kulturmedium durch Opti-MEM (Gibco) ersetzt. Nach einer Transfektionszeit von 48 oder 72 Stunden wurden die Zellen abtrypsiniert und für Koloniebildungstests und ausserdem Western Blot Analysen verwendet. Für die Koloniebildungstests wurden die Zellen als Einzelzellen in 6-well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit aufsteigenden Einzeldosen von 0 bis 4 Gy bestrahlt. Nach 8 bis 11 Tagen (A549) bzw. 18 bis 25 Tagen (SK-BR-3) wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.

Die erfolgreiche Hemmung der ALDH1A1 Proteinexpression in A549 Zellen und der ALDH2 Expression in A549 und SK-BR-3 Zellen ist exemplarisch in Abbildung 3.28 A dargestellt. Die Unterdrückung von ALDH1A1 führte in A549 Zellen zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung (Abb. 3.28 B links). In SK-BR-3 Zellen konnte, wie auch schon an anderer Stelle erwähnt, keine ALDH1A1 Expression mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden, und so verwundert es nicht, dass die ALDH1A1 siRNA in dieser Zelllinie keine Wirkung zeigte (Abb. 3.28 B rechts). Interessanterweise hatte jedoch die Unterdrückung der ALDH2 Expression - wie auch die oben gezeigte ALDH-Inhibition durch DEAB - eine deutliche Radioprotektion der SK-BR-3 Zellen zur Folge, während in A549 Zellen insgesamt kein Effekt zu beobachten war (Abb. 3.28 C). Bezüglich letzterer Feststellung soll jedoch erwähnt werden, dass in den einzelnen Experimenten, aus denen sich Abbildung 3.28 C (links) zusammensetzt, sowohl Protektion als auch Sensibilisierung zu beobachten war, jedoch war weder die eine noch die andere Beobachtung statistisch signifikant (Daten nicht gezeigt).

60



Abb. 3.28: Strahlensensitivität humaner Tumorzelllinien nach Transfektion mit spezifischer siRNA gegen ALDH1A1 und ALDH2. (A) Nachweis der erfolgreichen Reduktion der ALDH1A1 (oben) bzw. ALDH2 (unten) Proteinexpression nach 48 und 72 Stunden siRNA-Behandlung in A549 und SK-BR-3 Zellen mittels Western Blot Analyse. Oben rechts zeigt fehlende Expression von ALDH1A1 in SK-BR-3 Zellen. c, Kontroll-siRNA (B) Dosis-Wirkungs-Kurve ALDH1A1 siRNA-trans-
3. Ergebnisse

fizierter A549 und SK-BR-3 Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus 15 Datenpunkten von drei biologischen Replikaten. **(C)** Dosis-Wirkungs-Kurve ALDH2 siRNA-transfizierter A549 und SK-BR-3 Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert \pm SD aus 27 Datenpunkten von 5 (A549) bzw. 13 Datenpunkten von 3 (SK-BR-3) biologischen Replikaten. (Student's *t*-Test).

3.5.3.1 Transfektion mit ALDH1A1 oder ALDH2 siRNA und klonogenes

Überleben nach ionisierender Bestrahlung unter Einfluß von DEAB

Um die Spezifität des ALDH-Inhibitors DEAB bezüglich den Isoformen ALDH1A1 und ALDH2 zu untersuchen, wurden die unter 3.5.3 beschriebenen Koloniebildungstests zusätzlich in Kombination mit DEAB durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 5 Stunden vor Bestrahlung mit 100 µM DEAB behandelt.



Abb. 3.29: Strahlensensitivität humaner Tumorzelllinien nach Transfektion mit spezifischer siRNA gegen ALDH1A1 (A) oder ALDH2 (B), jeweils unter Einfluß des ALDH-Inhibitors DEAB. ALDH1A1 oder ALDH2 siRNA-transfizierte A549 bzw. SK-BR-3 Zellen wurden als Einzelzellen in 6-well-Platten ausgesät und am nächsten Tag für 5 Stunden mit 100 μ M DEAB behandelt, bevor sie mit Einzeldosen von 0 bis 4 Gy bestrahlt wurden. Alle Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert ± SD aus jeweils 6 technischen Replikaten.

Abbildung 3.29 A (links) zeigt, dass sowohl A549 Zellen mit normalem ALDH1A1 Level als auch jene mit unterdrückter ALDH1A1 Proteinexpression durch DEAB strahlensensitiviert werden konnten. Jedoch reduzierte DEAB das klonogene Überleben nach Bestrahlung, gemessen am D₃₇-Wert, stärker in den A549 Zellen die mit non-silencing siRNA transfiziert wurden. Während deren D₃₇-Wert durch DEAB-Vorbehandlung von 4,82 Gy auf 3,35 Gy um 30,5 % reduziert wurde, wurde der D₃₇-Wert der ALDH1A1 siRNA-transfizierten A549 Zellen von 3,67 Gy auf 2,92 Gy, also nur um 20,4 %, reduziert. Da ALDH1A1 auf Proteinebene in SK-BR-3 Zellen nicht nachweisbar war, war zu erwarten, dass DEAB sich gleichermaßen radioprotektiv auf Kontroll siRNA- und ALDH1A1 siRNA-transfizierte Zellen auswirkte (Abb. 3.29 A rechts). Wie in Abbildung 3.29 B (links) zu sehen, konnten A549 Zellen mit unterdrückter ALDH2 Proteinexpression genauso wie jene mit normalem ALDH2 Level durch DEAB strahlensensitiviert werden. In SK-BR-3 Zellen war hierbei interessanterweise zu beobachten, dass der radioprotektive Effekt von DEAB in ALDH2 siRNA-transfizierten Zellen, gemessen am D₃₇-Wert, um 72,6 % reduziert war.

4. DISKUSSION

Radioresistente Tumorzellen stellen ein großes Problem bei der Strahlentherapie von Krebspatienten dar, da diese Zellen zur Repopulation des Tumors oder Rezidiven führen können. Seit einigen Jahrzehnten geht man davon aus, dass solide Tumoren nicht aus einer homogenen Zellmasse, sondern aus verschiedenen Zellpopulationen mit zum Beispiel unterschiedlicher intrinsischer Strahlenresistenz bestehen. Strahlenresistente Zellen werden häufig mit sogenannten Tumorstammzellen (TSZ) oder tumor-initiierenden Zellen in Verbindung gebracht. Die bis heute kontrovers diskutierte Tumorstammzell-Hypothese postuliert, dass diese Zellpopulationen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorinitiation besitzen und verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums sowie das Auftreten von Rezidiven sind. So bestimmen strahlenresistente TSZ also die lokale Tumorkontrolle [Baumann *et al.*, 2009; Krause *et al.*, 2011]. Die Resistenz von TSZ gegenüber ionisierender Strahlung konnte mehrfach nahegelegt werden und wird durch verschiedene, für das zelluläre Überleben wichtige Mechanismen vermittelt [Brunner *et al.*, 2012; Kvinlaug & Huntly, 2007].

4.1 Durch mehrfache Bestrahlung können strahlenresistente Klone aus Tumorzelllinien *in vitro* selektiert werden

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass klonogene Zellpopulationen mit transient strahlenresistentem Phänotyp aus den humanen Tumorzelllinien A549 und SK-BR-3 *in vitro* durch einen Radioselektionsprozeß angereichert werden können. In diesen Zellen konnten zum Beispiel Strahlenresistenzmechanismen und die Expression von TSZ-Markern untersucht werden. Mit Hilfe von Koloniebildungstests konnte gezeigt werden, dass die radioselektierten A549 Zellen (A549-R) signifikant bzw. die radioselektierten SK-BR-3 Zellen (SK-BR-3-R) deutlich strahlenresistenter als die jeweiligen Parentalzellen (A549-p bzw. SK-BR-3-p) waren. Konzeptionell sind solche klonogenen Zellen nicht dasselbe wie TSZ, doch haben beide die Fähigkeit gemeinsam, über mehrere Zellteilungen, sprich Generationen hinweg Nachkommen zu bilden [Baumann *et al.*, 2009]. Die Klonogenität der A549-R bzw. SK-BR-3-R Zellen sowie die Proliferationsrate der A549-R Zellen war reduziert. Dies könnte eventuell für einen erhöhten Anteil an TSZ in der Kultur sprechen. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese einen verlangsamten Zellzyklus besitzen können bzw. sich sogar im Ruhezustand befinden können [Holyoake *et al.*, 1999; Passegue *et al.*, 2005], und dass diese Eigenschaft Strahlenresistenz vermitteln kann [Facompre *et al.*, 2012]. Vorstellbar wäre hierbei, dass die Zelle durch den verlangsamten Zellzyklus mehr Zeit für die Reparatur von DNA-Schädigungen hat. Nahegelegt haben dies auch Bao *et al.* [2006], die zeigten, dass in strahlenresistenten Glioblastomastammzellen zum Teil schon basal sowie nach Bestrahlung bevorzugt die Checkpoint Kinasen Chk1 und Chk2 aktiviert waren. Um eine eventuelle Anreicherung von TSZ in den vorliegenden radioresistenten Populationen basierend auf der angenommenen verlangsamten Proliferation von TSZ zu untersuchen, könnten vor und nach Bestrahlung Zellzyklus-regulierende Proteine analysiert, sowie ausserdem Zellzyklusanalysen durchgeführt werden.

Zunächst sollte aber ausgeschlossen werden, dass die beobachtete geringere Proliferationsrate und Klonogenität der radioselektierten Tumorzellen auf einem erhöhten Anteil an seneszenten, also sich nicht mehr teilenden Zellen beruht. Es ist bekannt, dass ionisierende Strahlung durch DNA-Schädigung die sogenannte *"stress-induced premature senescence"* induzieren kann [Zhang, 2007]. Zwar war eine deutliche Induktion zellulärer Seneszenz 24 Stunden nach ionisierender Strahlung in A549-p und A549-R Zellen zu beobachten, jedoch gab es basal keinen Unterschied im Anteil seneszenter Zellen zwischen der A549-p und A549-R Population. Reduzierte Proliferationsgeschwindigkeit und Koloniebildungseffizienz konnten also nicht auf einen erhöhten Anteil seneszenter Zellen in der Kultur zurückgeführt werden.

Stattdessen könnten jedoch nicht-lethale DNA-Schäden, die in den Zellen durch den Radioselektionsprozeß akkumulieren, für die beobachteten Effekte bzgl. Koloniebildungseffizienz und Proliferation verantwortlich sein. Dafür spricht, dass in A549-R Zellen basal deutlich mehr residuelle DNA-DSBs beobachtet wurden. Diese Schädigungen könnten dazu führen, dass die Zelle ihre Klonogenität verliert und sich nicht mehr teilt, jedoch auch nicht als seneszent erkannt wird. Auf die

Strahlenresistenz der Zellen scheint dies keinen Einfluss zu haben. Eine Aussage über einen möglicherweise erhöhten Anteil an langsam proliferierenden bzw. ruhenden Zellen in A549-R Zellen kann momentan nicht getroffen werden.

Es zeigte sich, dass die Strahlenresistenz sowie die reduzierte Koloniebildungseffizienz und die verlangsamte Proliferation der A549-R Zellen transient war, da dieser Phänotyp schon fünf Passagen nach Radioselektion nicht mehr zu beobachten war. Dies ist wohl dadurch zu erklären, dass sich die angereicherte strahlenresistente Subpopulation während der Weiterkultivierung wieder verliert, da der Selektionsdruck der ionisierenden Strahlung wegfällt.

4.2 Die Strahlenresistenz der radioselektierten Tumorzellen ist abhängig von der EGFR-PI3K-Akt-vermittelten DNA-Reparatur

Es stellte sich die Frage, welche zellulären Mechanismen für die Strahlenresistenz der radioselektierten A549 bzw. SK-BR-3 Zellen verantwortlich sein könnten. Eine unabdingbare Notwendigkeit für Überleben und Wachstum von Zellen, deren DNA durch ionisierende Strahlung (IR) stark geschädigt wurde, ist die Reparatur dieser DNA-Schädigungen. Der wichtigste Mechanismus ist hierbei, neben der homologen Rekombination, das nicht-homologe *end joining* (NHEJ), bei dem die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit,* DNA-PKcs) eine Schlüsselrolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) einnimmt [Jackson, 2002; Smith & Jackson, 1999]. Dass die DNA-Reparatur im Übrigen für die Strahlenresistenz von TSZ wichtig ist, konnten z.B. Bao *et al.* [2006] und Duru *et al.* [2012] im Brustkrebs und Wang *et al.* [2012] im Prostatakarzinom zeigen.

Die Reparaturkapazität von IR-induzierten DNA-DSBs in A549-p und A549-R Zellen wurde mittels γH2AX Focus Assay verglichen. Es zeigte sich basal zunächst eine deutlich, aber nicht signifikant höhere Anzahl an Foci in den A549-R Zellen im Vergleich zu den A549-p Zellen. Dies ist durch die sequenziellen Bestrahlungen des Radioselektionsprozesses bedingt und könnte zu der weiter oben beschriebenen Reduktion der Klonogenität geführt haben. Von Relevanz ist, dass die A549-R Zellen 24 Stunden nach 4 Gy signifikant weniger Foci aufweisen als die Parental-

4. Diskussion

zellen, also eine höhere Reparaturkapazität von IR-induzierten DNA-DSBs besitzen. Des Weiteren wiesen A549-R sowie auch SK-BR-3-R Zellen eine erhöhte konstitutionelle und IR-induzierte Aktivität der DNA-PKcs auf, charakterisiert durch eine erhöhte Phosphorylierung der DNA-PKcs an Serin Nr. 2056 (S2056). Diese Autophosphorylierung ist essentiell für die Funktion der DNA-PKcs [Povirk *et al.*, 2007] und wird durch ionisierende Strahlung induziert [Toulany *et al.*, 2008]. Die Strahlenresistenz der radioselektierten Tumorzellen könnte also zumindest teilweise durch eine effizientere DNA-DSB-Reparatur zu erklären sein.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass der ErbB-Rezeptor-vermittelte Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Akt Signalweg eine Rolle in der DNA-PKcsabhängigen Reparatur von strahleninduzierten DNA-DSBs spielt [Toulany et al., 2006; Toulany et al., 2008]. Auch Zhang et al. [2010] stellen einen Zusammenhang zwischen DNA-Reparatur und PTEN/PI3K-Akt Signaling her, interessanterweise in Brustkrebsstammzellen der Maus. Ionisierende Strahlung aktiviert den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR), ein Mitglied der ErbB-Familie, ligandenunabhängig, dies äußert sich in der Autophosphorylierung des Rezeptors [Toulany et al. 2010]. Die IR-induzierte Aktivierung des EGFR hat unter anderem die Aktivierung des PI3K-Akt Signalwegs zur Folge [Park et al., 2006]. Die Aktivierung der Effektoren der Proteinkinase B/Akt schließlich ist zentral für das Überleben der Zelle nach exogenem Stress wie ionisierender Strahlung [Fahy et al., 2003; Nicholson & Anderson, 2002]. Aus verschiedenen Studien geht zudem zusammenfassend hervor, dass das ErbB-PI3K-Akt Signaling eine wichtige Rolle in der Biologie von Tumorstammzellen zu spielen scheint, insbesondere in Hinblick auf Strahlenresistenz [Feng et al., 2012; Hambardzumyan et al., 2008; Magnifico et al., 2009; Martelli et al., 2011; Singh et al., 2012; Zhan et al., 2011; Zhang et al., 2010].

Um die Rolle des EGFR-vermittelten Signalings in A549-R versus A549-p Zellen zu untersuchen, wurde der selektive EGFR-Tyrosinkinase (TK)-Inhibitor Erlotinib verwendet. Die Hemmung der EGFR-TK-Aktivität erfolgt durch kompetitive Blockade der ATP-Bindungsstelle der zytoplasmatischen TK-Domäne des EGFR [Siegel-Lakhai *et al.*, 2005]. Koloniebildungstests, in denen der EGFR mit Hilfe von Erlotinib zwei Stunden vor Bestrahlung gehemmt wurde, zeigten eine Abhängigkeit

der Strahlenresistenz der A549-R Zellen von EGFR-vermittelten Signalwegen. Um nun zu untersuchen, ob der EGFR-regulierte PI3K-Akt Signalweg eine Rolle für die Strahlenresistenz der radioselektierten A549-R bzw. SK-BR-3-R Zellen spielt, wurde der selektive reversible PI3K-Inhibitor LY294002 [Vlahos *et al.*, 1994] im Koloniebildungstest eingesetzt. Wurden die Zellen zwei Stunden vor Bestrahlung mit LY294002 behandelt, verschwand der signifikante Unterschied zwischen den Überlebenskurven der radioselektierten A549-R bzw. SK-BR-3-R Zellen und den jeweiligen Parentalzellen.



Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Bedeutung des EGFR-PI3K Signalwegs und der DNA-Reparatur für die Strahlenresistenz radioselektierter Tumorzellen. Ob durch Radioselektion eine Anreicherung von TSZ stattfindet, ist weiter unklar. Es konnte jedoch mittels Inhibition durch DEAB und siRNA Transfektion gezeigt werden, dass die ALDH im Allgemeinen eine wichtige Rolle für die Strahlenresistenz von Tumorzellen spielt. Diese wurde in ALDH^{bright} Tumorzellen teilweise durch das PI3K Signaling vermittelt.

Zusammengenommen lässt sich also folgern, dass der EGFR-PI3K-Akt Signalweg die Strahlenresistenz der untersuchten radioselektierten humanen Tumorzelllinien zumindest teilweise vermittelt, eventuell hängt dies direkt mit der beobachteten effizienteren DNA-DSB-Reparatur dieser Zellen zusammen (Abb. 4.1). Dies legen Daten von Toulany *et al.* [2006; 2012] nahe, die dem EGFR-PI3K-Akt Signalweg eine Rolle in der Regulation der DNA-PKcs-abhängigen DNA-DSB-Reparatur zuschreiben. Ob die Aktivität des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs und der DNA-Reparatur in den überlebenden Zellen schon vor der Selektion intrinsisch erhöht war oder erst durch die Selektionsbestrahlungen stabil induziert wurde, bleibt zu klären.

Die vorliegenden Ergebnisse zur Rolle des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs und der DNA-Reparatur für die Strahlenresistenz der untersuchten radioselektierten Zellen sind konsistent mit der aus der Literatur bekannten Bedeutung des ErbB-PI3K-Akt Signalwegs und der DNA-PKcs-abhängigen DNA-DSB-Reparatur für das Überleben von Tumorzellen nach ionisierender Strahlung. Ob die von EGFR-PI3K-Akt und DNA-DSB-Reparatur abhängige Strahlenresistenz der untersuchten radioselektierten Lungen- bzw. Mammakarzinomzellen in Zusammenhang mit einer Anreicherung von TSZ stehen könnte, soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.3 Die Bedeutung von Tumorstammzellen in radioselektierten

Tumorzellpopulationen

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass das EGFR-PI3K-Akt Signaling und die DNA-Reparatur im Zusammenhang mit der Strahlenresistenz von TSZ von Bedeutung sind, so zum Beispiel aus Studien mit Glioblastomstammzellen, Prostataoder Mammakarzinomstammzellen [Bao et al., 2006; Duru et al., 2012; Facchino et al., 2010; Wang et al., 2012; Zhan et al., 2011; Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2008]. Die Expression/Aktivität von potenziellen TSZ-Markern könnte also erste Hinweise auf eine mögliche Anreicherung von TSZ in den radioselektierten Populationen liefern.

4.3.1 Expression von Tumorstammzellmarkern

Die tumorigene Eigenschaft und Therapieresistenz von TSZ wird vielfach mit der Expression bestimmter Markerproteine korreliert. Bao *et al.* isolierten 2006 mit Hilfe des Zelloberflächenmarkers CD133 (Prominin-1) strahlenresistente Glioblastom-

stammzellen (CD133⁺), die sich im Vergleich zur strahlensensitiven CD133⁻ Population durch eine effizientere DNA-Reparatur sowie eine erhöhte IR-induzierte Aktivität des DNA-Reparaturproteins ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und der Checkpoint Kinasen 1 und 2 (Chk1/2) auszeichneten. Der TSZ-Charakter der CD133⁺ Population wurde durch Eigenschaften wie das Wachstum in rundlichen Zellaggregaten (Neurosphären) und die Expression von weiteren TSZ-Markern nachgewiesen.

Das Glycoprotein CD133 wird in der Literatur nicht nur als Marker für potenzielle Glioblastomstammzellen (s.o.), sondern ebenso Lungenkarzinomstammzellen erwähnt [Chen et al., 2008]. Die Proteinexpressionsanalyse zeigte, dass die CD133-Expression in A549-R, so wie auch in SK-BR-3-R Zellen im Vergleich zu den Parentalzellen nicht erhöht war. Mit Hilfe des Markers CD133 konnte also keine Anreicherung von TSZ in den radioselektierten Subpopulationen nachgewiesen werden. Des Weiteren läßt sich schließen, dass CD133 wohl nicht als Marker für Strahlenresistenz radioselektierter Tumorzellen gilt. Zur Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 ist zu sagen, dass hier CD133 generell so gut wie nicht messbar war, dies deckt sich mit Daten von Hwang-Verslues [2009]. Die Aussagekraft von CD133 als TSZ-Marker, besonders von Lungenkarzinomstammzellen, wird in der Literatur gegensätzlich diskutiert. So kamen Meng et al. [2009] zu dem Ergebnis, dass CD133⁺ und CD133⁻ Zellen der Lungenkarzinomzelllinien A549 und H446 gleiche Anteile an TSZ enthalten. Cui et al. [2011] postulieren eine Rolle für CD133 als Marker für TSZ der Linie H446, nicht aber der anderen untersuchten Lungenkarzinomlinien A549, H157, H226, Calu-1 und H292. Des Weiteren fanden Dittfeld et al. [2010] keinen Unterschied in der Tumorigenität und der Strahlensensitivität von CD133⁺ und CD133⁻ Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116. Es ist also anzunehmen, dass CD133 nur in bestimmten Tumorentitäten bzw. Zelllinien und/oder in Kombination mit anderen Markern als TSZ-Marker dienen kann. Des Weiteren scheint das Tumor-Mikromilieu eine sehr wichtige Rolle für die zelluläre Strahlensensitivität und eventuell generell für den Tumorstammzellcharakter von CD133⁺ Tumorzellen zu spielen [Jamal et al., 2012]. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass CD133⁺ Glioblastomzellen orthotopisch in vivo. nicht aber in vitro, eine geringere Anzahl an IR-induzierten und residuellen DNA-Schäden (gemessen als γH2AX Foci) aufwiesen.

Auch Schlüsselfaktoren der Erhaltung der Selbsterneuerungskapazität und der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen, wie Octamer binding transcription factor 4 (Oct-4) und Sex determining region Y-box 2 (Sox2) [Masui et al., 2007; Niwa et al., 2000], können potenzielle TSZ-Marker sein. Die Expression dieser Marker korreliert aber auch mit Rekurrenz, Metastasierung und schlechter Prognose einiger Tumoren [Lengerke et al., 2011; Saigusa et al., 2009], sowie mit Strahlenresistenz z.B. von Tumorstammzellen der Mammakarzinomzelllinie MCF7 [Debeb et al., 2010]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinexpression von Oct-4 und Sox2 in A549-R und SK-BR-3-R Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Parentalzellen untersucht. Interessanterweise war die Oct-4 Proteinexpression in den SK-BR-3-R Zellen erhöht, was zum einen auf eine eventuelle Anreicherung von TSZ hindeuten könnte, und zum anderen die beobachtete Strahlenresistenz direkt oder indirekt teilweise bedingen könnte. Möglich wäre zudem, dass die fraktionierte Bestrahlung, wie sie während der Radioselektion erfolgte, die stabile Erhöhung der Oct-4 Expression induzierte. Hier wäre es sicher angebracht, die Rolle von Oct-4 für die Strahlenresistenz der SK-BR-3-R Zellen sowie von Mammakarzinomzellen im Allgemeinen weiter zu untersuchen. Weder in A549-p noch A549-R Zellen war Oct-4 hingegen mittels Western Blot Analyse messbar, obwohl Oct-4 in A549 Zellen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte [Singh et al., 2012]. Hierfür könnte eine zu geringe Oct-4 Proteinmenge, für deren Nachweis die Methode des Western Blottings eventuell zu insensitiv ist, verantwortlich sein. Des Weiteren sind technische Gründe in Bezug auf die Funktionalität des Oct-4 Antikörpers in dieser speziellen Zelllinie nicht auszuschließen. Eine Aussage über die Rolle von Oct-4 in A549-R Zellen konnte also nicht getroffen werden.

Bezüglich des Sox2 Levels konnte weder in A549 noch in SK-BR-3 Zellen ein Unterschied zwischen strahlenresistenter Population und Parentalzellen festgestellt werden. Nakatsugawa *et al.* [2011] beobachteten, dass die A549 *side population* (SP), welche eine tumor-initiierende stammzellähnliche Population darstellt [Ho *et al.*, 2007], kein höheres Level an Sox2 mRNA als die *major population* (MP) besitzt. Dies würde bedeuten, dass der fehlende Unterschied in der Sox2-Expression zwischen A549-p und A549-R Zellen nicht zwangsläufig auf das Fehlen einer TSZ-Anreicherung in den A549-R Zellen hindeuten muss. Die Daten von Nakatsugawa *et al.* stehen allerdings in Widerspruch zu einer aktuelleren Studie, in

der die A549 SP eine etwa dreimal höhere Sox2 mRNA Expression als die MP aufweist [Singh *et al.*, 2012]. Eine Schlussfolgerung kann man jedoch aus den Daten der vorliegenden Arbeit ziehen: Sox2 scheint kein Marker für die Strahlenresistenz der radioselektierten Tumorzellen zu sein.

Die Ergebnisse zur Expression der potenziellen TSZ-Marker CD133, Oct-4 und Sox2 in den radioselektierten A549 bzw. SK-BR-3 Zellen lassen keine eindeutige Aussage über eine mögliche Anreicherung von TSZ in den strahlenresistenten Tumorzellen zu. Um zu einem schlüssigeren Ergebnis zu kommen, könnten weitere, tumorentitätsspezifische Marker untersucht werden. Die Tumorstammzellpopulation von Mammakarzinomen, zu dessen Entität die Zelllinie SK-BR-3 gehört, wird nach aktuellem Wissensstand hauptsächlich durch einen CD44⁺CD24^{-/low}lin⁻ Phänotyp charakterisiert [Al-Hajj *et al.*, 2003]. Eventuelle nähere Untersuchungen der SK-BR-3-R Zellen könnten diese Oberflächenmarker miteinbeziehen. Ein funktionaler Marker, der potenzielle Lungenkarzinomstammzellen charakterisiert, soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.3.2 Die Aktivität von Aldehyd-Dehydrogenasen

Die Familie der zytosolischen Aldehyd-Dehydrogenasen 1 (ALDH1), die zur Enzym-Superfamilie der Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDH) gehört, wird seit einiger Zeit als funktionaler Marker nicht nur für Lungenkarzinom- und Mammakarzinomstammzellen [Ginestier *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2012; Liang & Shi, 2012], sondern z.B. auch für Glioblastomstammzellen oder TSZ von Kopf-Hals-Tumoren (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) [Chen *et al.*, 2009; Rasper *et al.*, 2010] diskutiert. Schon in den 1980er Jahren wurde entdeckt, dass hämatopoetische Stammzellen im Vergleich zu weniger primitiven Progenitorzellen durch ein höheres Level an zytosolischer ALDH charakterisiert sind [Gordon *et al.*, 1985; Sahovic *et al.*, 1988]. Die Entwicklung eines Assays zur Isolation von lebenden Zellen mit hoher ALDH1-Aktivität [Jones *et al.*, 1995] ermöglichte enorme Fortschritte in der Untersuchung von potenziellen TSZ. Der heute als Aldefluor® Assay (Aldagen Inc.) im Handel erhältliche Test basiert auf der Tatsache, dass sich ein fluoreszierendes Substrat in Zellen mit hoher ALDH-Aktivität (ALDH^{br}) anreichert, aus Zellen mit niedriger bzw. keiner ALDH-Aktivität (ALDH^{low}) jedoch hinausdiffundiert. Es stellte sich erst in den letzten Jahren heraus, dass neben ALDH1, mit dem meist die Isoform ALDH1A1 gemeint war [Moreb *et al.*, 2012], auch die Aktivität anderer Mitglieder der Enzym-Superfamilie wie ALDH1A2, ALDH1A3 und ALDH2 im Aldefluor® Assay detektiert wird [Marcato *et al.*, 2011; Moreb *et al.*, 2012]. Möglicherweise gibt es noch weitere Isoformen der momentan 19 Enzyme umfassenden ALDH-Superfamilie, deren Aktivität für ALDH^{br}-Zellen charakteristisch sein könnte.

Die Analyse der ALDH Proteinexpression und Enzymaktivität mittels Aldefluor® Assay zeigte, dass die A549-R Population den gleichen Anteil an Zellen mit aktiver ALDH (ALDH^{br}) aufwies wie die Parentalpopulation, und beide Populationen exprimierten das gleiche Level an ALDH1A1. Es konnte also zumindest auch auf diese Art und Weise keine Anreicherung von TSZ in den radioselektierten Zellen nachgewiesen werden. Eine interessante Beobachtung war dennoch, dass die Strahlenresistenz der A549-R Zellen im Koloniebildungstest deutlicher zu Tage trat, wenn man die ALDH^{br} Populationen von A549-p und A549-R verglich. Der Unterschied in der Strahlenresistenz zwischen A549-p und A549-R war in den ALDH^{low} Populationen minimal. Aufgrund dessen wäre es möglich, dass die Strahlenresistenz der A549-R Zellen zu einem kleinen Teil doch ALDH-abhängig ist.

4.4 Die Rolle von Aldehyd-Dehydrogenasen für die Strahlenresistenz von Tumorzellen

Die Relevanz der ALDH-Aktivität für die Strahlenantwort von Tumorzellen zeigten Koloniebildungstests mit A549 bzw. SK-BR-3 Zellen, die zuvor mittels FACS jeweils in ALDH^{br} und ALDH^{low} Populationen aufgetrennt wurden. Hierbei war zu beobachten, dass ALDH^{br} A549 bzw. SK-BR-3 Zellen bei gleicher Koloniebildungseffizienz signifikant strahlenresistenter waren als die entsprechenden ALDH^{low} Zellen. Dies ist konsistent mit einer Studie von Chen *et al.* [2009], in der - allerdings mittels 3D-Softagar-Koloniebildungstest - gezeigt werden konnte, dass ALDH^{br} HNSCC-Zellen strahlenresistenter als ALDH^{low} Zellen desselben Tumors sind. So kann man aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, insbesondere zusammen mit den Daten von Chen *et al.* [2009] schließen, dass die mittels Aldefluor® Assay gemessene ALDH-Aktivität als Marker für strahlenresistente klonogene Zellen dienen kann. Unterstützt wird dies durch eine Studie an Mammakarzinomzelllinien (MDA-MB-468, MDA-MB-231), in der gezeigt werden konnte, dass die ALDH^{br}CD44⁺ Population dieser Zelllinie jeweils strahlenresistenter als die ALDH^{low} CD44⁻ Population war [Croker & Allan, 2011]. Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass das PI3K-Akt Signaling eine wichtige Rolle für das Überleben von Tumorstammzellen zu spielen scheint, insbesondere in Hinblick auf Strahlenresistenz [Hambardzumyan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010]. Wie weiter oben dargelegt wurde, kommt ihm auch in den radioselektierten Tumorzellen der vorliegenden Arbeit eine Bedeutung für deren Strahlenresistenz zu. Dass hier die PI3K zumindest teilweise auch die Strahlenresistenz der ALDH^{br} A549 bzw. SK-BR-3 Zellen vermittelt, konnte mit Hilfe des Inhibitors LY294002 in Koloniebildungstests gezeigt werden. Die Untersuchung, ob die DNA-Reparatur in den ALDH^{br} Zellen effizienter ist als in den ALDH^{low} Zellen, steht noch aus.

Es ist bekannt, dass die Enzyme der ALDH-Familie vielfältige Aufgaben im Bereich der Detoxifikation und des Zellmetabolismus innehaben. Die Isoenzyme ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3 zum Beispiel sind zudem verantwortlich für die Umwandlung von Retinaldehyd zu Retinsäure (RA) [Vasiliou et al., 2004], welche wiederum Einfluß auf den EGFR nimmt [Carter & Shaw, 2000; Salvatori et al., 2011]. ALDH2 spielt z.B. eine Rolle bei der Verwertung von Alkohol im Körper [Manzo-Avalos & Saavedra-Molina, 2010]. Die Detoxifikation von über dem normalen Level in der Zelle vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch ALDH ist wichtig für das Zellüberleben. Solche exzessiven ROS entstehen in der Zelle unter anderem nach ionisierender Strahlung und können die DNA schädigen [Spitz et al., 2004]. Die Kenntnis dieser Eigenschaften legt eine funktionale Rolle der ALDH für die Strahlenresistenz im Allgemeinen und von TSZ im Besonderen nahe. Wie weiter oben schon dargelegt, sind ALDH^{br} A549 und SK-BR-3 Zellen strahlenresistent. Zudem führte die Hemmung der ALDH durch den spezifischen Inhibitor Diethylaminobenzaldehyd (DEAB) zu einer signifikanten Strahlensensibilisierung der Lungenkarzinomzelllinie A549 sowie ausserdem der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231. Letzteres wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe beobachtet [Croker & Allan, 2011]. Eine interessante Beobachtung war die Radioprotektion der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 durch DEAB. Im Hinblick auf die Strahlenresistenz von ALDH^{br} SK-BR-3 Zellen birgt dies einen gewissen Widerspruch, für

den weiter unten ein Erklärungsansatz gegeben werden soll. In der Lungenkarzinomzelllinie H460, die insgesamt die geringste Proteinexpression der vier untersuchten ALDH-Isoformen aufwies, zeigte die DEAB-Behandlung weder einen strahlensensibilisierenden noch -protektiven Effekt. Es läßt sich folgern, dass DEAB in Abhängigkeit der Zelllinie zum Teil tiefgreifenden Einfluß auf die Strahlenreaktion der Zellen nimmt.

Western Blot Analysen zeigten, dass die vier untersuchten Zelllinien A549, H460, SK-BR-3 und MDA-MB-231 sehr unterschiedliche Mengen an ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 und ALDH2 besitzen. So lag die Vermutung nahe, dass die unterschiedliche Strahlensensibilisierung, die DEAB hervorrief, durch ein bestimmtes Expressionsmuster von ALDH-Isoformen bedingt sein könnte. Am prominentesten war die Expression von ALDH1A1, und zwar in den durch DEAB am stärksten strahlensensibilisierten A549 Zellen. In den durch DEAB radioprotektierten SK-BR-3 Zellen war hingegen keine ALDH1A1 Expression mittels Western Blot nachzuweisen, sie besaßen jedoch ein relativ hohes Level an ALDH2. ALDH2 wird zwar in selbem Maße auch in den A549 Zellen exprimiert, wird hier quantitativ aber um ein vielfaches von ALDH1A1 übertroffen. Es wäre also möglich, dass die Behandlung mit DEAB durch Hemmung der ALDH1A1 zu einer Strahlensensibilisierung führt, jedoch bei Nicht-Expression von ALDH1A1 die Hemmung von ALDH2 zum Tragen kommt, die wiederum Radioprotektion zur Folge haben könnte. Dass DEAB potenziell beide Isoenzyme hemmen kann, ist bekannt [Moreb et al., 2012].

Durch nachfolgende Experimente, in denen ALDH1A1 und ALDH2 in A549 und SK-BR-3 Zellen jeweils mittels siRNA unterdrückt wurden, konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Expression von ALDH1A1 einen Überlebensvorteil nach Strahlenexposition darstellt und DEAB durch ALDH1A1-Inhibition zu der beobachteten Strahlensensibilisierung der A549 Zellen geführt haben könnte. So waren ALDH1A1-siRNA transfizierte A549 Zellen signifikant strahlensensibler als die Kontrollzellen. Dies überrascht nicht angesichts der oben erwähnten zellulären Aufgaben dieser Enzymfamilie. Die Expression von ALDH2 allerdings scheint der Zelle nicht nur, wie allgemein angenommen, Vorteile zu bringen, denn die Unterdrückung von ALDH2 mittels siRNA führte, zumindest bei gleichzeitig fehlender

Expression von ALDH1A1 wie im Fall der SK-BR-3 Zellen, zu einer deutlichen Radioprotektion. Die Vermutung liegt also nahe, dass DEAB über die Inhibition von ALDH2 zur beobachteten Radioprotektion der SK-BR-3 geführt haben könnte. Diese Annahme konnte durch ein weiteres Experiment noch verdichtet werden, in dem SK-BR-3 Zellen, deren ALDH2 Expression durch siRNA unterdrückt wurde, im Koloniebildungstest zusätzlich mit DEAB behandelt wurden. Hierbei war der radioprotektive Effekt von DEAB durch die vorherige ALDH2-siRNA Unterdrückung, gemessen am D₃₇-Wert, um 72,6 % reduziert. Dass die Unterdrückung von ALDH2 Überlebensvorteile für eine Zelle bringen könnte, ist bis jetzt aus der Literatur noch nicht bekannt. Die Behandlung der SK-BR-3 Zellen mit ALDH1A1-siRNA hatte übrigens keinen Effekt auf das klonogene Überleben nach IR und beeinflußte die Radioprotektion durch DEAB nicht, was oben erwähnte Beobachtung bestätigt, dass diese Zelllinie keine nennenswerten Mengen an ALDH1A1

Dass die H460 Zellen zum einen die insgesamt geringste Expression der untersuchten ALDH-Isoformen aufwiesen, und zum anderen bezüglich klonogenem Überleben nach Bestrahlung in Kombination mit DEAB-Behandlung keine signifikante Reaktion zeigten, spricht für die Spezifität des gewählten Inhibitors DEAB. Unspezifische Effekte ließen sich jedoch nicht völlig ausschließen, so wurden nicht nur ALDH^{br} A549 bzw. SK-BR-3 Zellen, sondern auch ALDH^{low} A549 bzw. SK-BR-3 Zellen durch DEAB strahlensensitiviert bzw. -protektiert, wenn auch zumindest im A549-Modell in geringerem Ausmaß. Es wäre ebenso möglich, dass die ALDH^{low} Population während Aldefluor® Assay und FACS durch falsch-negative Zellen verunreinigt wurde, da die Fluoreszenz in den Zellen naturgemäß nach einiger Zeit nachläßt. Dieser Ansatz könnte jedoch nicht plausibel erklären, warum ALDH^{low} SK-BR-3 Zellen in genau dem gleichen Ausmaß durch DEAB protektiert werden wie ALDH^{br} Zellen. Angesichts des Verhaltens der SK-BR-3 Zellen könnte man eher die Vermutung aufstellen, dass die Aktivität der Isoform ALDH2 nicht durch Aldefluor® detektiert wird und somit ALDH^{br} und ALDH^{low} Populationen jeweils ein vergleichbares Level an ALDH2 exprimieren, wodurch sich DEAB auf beide Populationen gleich auswirken würde. Im Aldefluor® Assay könnte eventuell ALDH1A2, eine ALDH1-Isoform, die ausreichend in SK-BR-3 Zellen exprimiert wurde, ausschlaggebend für die gemessene ALDH-Aktivität der SK-BR-3 Zellen

sowie in Konsequenz verantwortlich für die Strahlenresistenz der ALDH^{br} Zellen sein. Ob ALDH1A2, wie es auf ALDH1A1 zutrifft, der Zelle einen Überlebensvorteil nach IR bringt, könnte anhand von Experimenten, in denen ALDH1A2 mittels siRNA unterdrückt wird, geklärt werden. Die Hypothese, dass ALDH2 zum einen für den Aldefluor® Assay nicht relevant ist und ALDH2-Unterdrückung zum anderen der Zelle nach IR-Exposition einen Vorteil bringt, könnte den Konflikt, dass zum einen ALDH^{br} SK-BR-3 Zellen strahlenresistener als ALDH^{low} SK-BR-3 Zellen sind, und zum anderen aber die ALDH-Inhibition durch DEAB eine Radioprotektion bewirkt, erklären. Hierzu müsste in den DEAB-behandelten SK-BR-3 Zellen die Wirkung der ALDH2-Inhibition allerdings die der ALDH1A2-Inhibition übertreffen (vorausgesetzt ALDH1A2 spielt eine Rolle in die Strahlenreaktion). Die hier aufgestellten Überlegungen stehen momentan jedoch im Gegensatz zu einer Studie, in der nachgewiesen werden konnte, dass der Aldefluor® Assay die Enzymaktivität von ALDH2 in Lungenkarzinomzelllinien detektiert [Moreb et al., 2012]. Aufgrund dieser Ungereimtheiten erscheint es wichtig, die Rolle von ALDH2 für die Strahlenresistenz in weiteren Zelllinien zu untersuchen.

Ein interessanter Zusammenhang besteht zwischen der Aktivität und Expression des EGFR und dem Molekül all-trans-Retinsäure (ATRA) [Pasonen-Seppanen et al., 2008; Salvatori et al., 2011]. Die ALDH-Isoformen ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3 sind für die Umwandlung bzw. Oxidation von Retinaldehyd in ATRA verantwortlich [Perlmann, 2002]. ATRA wiederum ist ein Signalmolekül, welches an einen Rezeptor (retinoic acid receptor alpha, RARa) bindet und so den EGFR auf Transkriptionsebene beeinflußen kann [Salvatori et al., 2011]. Es stellte sich die Frage, ob eine Behandlung mit dem ALDH-Inhibitor DEAB die Expression bzw. Aktivität des EGFR modifiziert, was widerum in Zusammenhang mit den beobachteten Effekten von DEAB auf die Klonogenität und Strahlenresistenz der Zellen stehen könnte. Den untersuchten Tumorzellen stand Vitamin A, die Vorstufe von Retinaldehyd, durch FCS im Kulturmedium zur Verfügung. Eine Modulation der EGFR-Expression und/oder -Aktivität durch DEAB konnte im untersuchten Zeitraum von 24 bis 72 Stunden Behandlungszeit jedoch nicht beobachtet werden. Eventuell könnte dafür eine zu geringe Konzentration an Vitamin A im Kulturmedium verantwortlich sein. In jedem Fall läßt sich daraus schließen, dass ein

mehr oder weniger direkter Zusammenhang zwischen dem EGFR und den beobachteten Effekten von DEAB in den untersuchten Zelllinien und unter den gegebenen Bedingungen unwahrscheinlich ist.

4.5 Abschließende Besprechung/ Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mittels eines Strahlenselektionsprozesses transient IR-resistente Tumorzellen *in vitro* selektiert werden können. Die Strahlenresistenz dieser klonogenen Zellen, die mehrere fraktionierte Bestrahlungen überlebten, basierte zumindest teilweise auf dem EGFR-PI3K-Akt Signalweg und einer effizienteren DNA-DSB-Reparatur, wie Koloniebildungstests in Kombination mit Inhibitoren sowie γH2AX Assay und Proteinexpressionsanalyse zeigten. Vorarbeiten von Toulany *et al.* [2006; 2012] legen nahe, dass der EGFR-PI3K-Akt Signalweg hierbei eine regulatorische Bedeutung für die DNA-DSB-Reparatur hat. Ob der EGFR-PI3K-Akt Signalweg und die DNA-DSB-Reparatur in den überlebenden Tumorzellen schon vor der Selektion intrinsisch aktiver waren oder erst durch die Selektionsbestrahlungen stabil induziert wurden, bleibt zu klären. Die Ergebnisse unterstreichen jedoch, dass die EGFR-PI3K-Akt-vermittelte DNA-DSB-Reparatur ein wichtiges Ziel molekularen *Targetings* darstellt, vor allem in Zusammenhang mit fraktionierter Bestrahlungstherapie.

Eine Anreicherung von TSZ in den radioselektierten Tumorzellpopulationen konnte weder mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD133 oder der embryonalen Stammzellmarker Oct-4 und Sox2, noch mittels Aldefluor® Assay nachgewiesen werden, und erscheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt unwahrscheinlich. Weitere potenzielle TSZ-Marker sowie die Tumorigenität der radioselektierten Zellen *in vivo* oder deren Fähigkeit zur Tumorsphärenformation könnten untersucht werden. Letzteres ist nicht nur ein wichtiges Merkmal von Tumorstammzellen [Dontu *et al.*, 2003], sondern wird zudem teilweise vom PI3K-Akt Signalweg reguliert, wie eine Studie mit Prostatakarzinomzellen zeigte [Peitzsch *et al.*, 2013]. Zu TSZ-Markern ist anzumerken, dass diese bezüglich ihrer Aussagekraft teilweise sehr kontrovers diskutiert werden und als alleinige Charakterisierungsmethode von TSZ wohl nicht ausreichen. Bezüglich der gewählten Methode der Radioselektion muss beachtet werden, dass durch die mutagene Wirkung der Strahlung zwei genotypisch

verschiedene Populationen entstehen, deren unterschiedliche Strahlensensibilität neben dem EGFR-PI3K-Akt Signalweg auf verschiedensten zusätzlichen Mechanismen beruhen könnte, die in keiner Weise mit Tumorstammzelleigenschaften in Zusammenhang stehen müssen.

Bezüglich der Bedeutung der ALDH bzw. deren Enzymaktivität läßt sich aufgrund der erzielten Ergebnisse zusammenfassend sagen, dass diese im Allgemeinen eine wichtige Rolle für die Strahlenresistenz von Tumorzellen spielt bzw. einen Marker für Strahlenresistenz darstellt. Hierbei ist auch das Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen wichtig, wie der Zusammenhang von DEAB-induzierter Strahlensensitivität und der relativen Expression bestimmter ALDH-Isoformen zeigte. Im Hinblick auf die hypothetische Überlegung, ALDH-Inhibitoren gegen Krebs einzusetzen, muss differenziert vorgegangen werden, da deutlich wurde, dass die Isoenzyme zum Teil sogar entgegengesetzte Funktionen in der Biologie von Tumorzellen übernehmen könnten. Sollten TSZ tatsächlich im Allgemeinen durch eine hohe ALDH-Enzymaktivität charakterisiert sein, könnte diese also unmittelbar oder auch indirekt für bestimmte Eigenschaften der TSZ wie Strahlen- und Chemoresistenz mitverantwortlich sein. Interessanterweise wies die Strahlenresistenz der ALDH^{br} Zellen eine teilweise Abhängigkeit vom PI3K-Akt Signalweg auf. Wie dies zusammenhängt, muss noch geklärt werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abhold EL, Kiang A, Rahimy E, Kuo SZ, Wang-Rodriguez J, Lopez JP, Blair KJ, Yu MA, Haas M, Brumund KT, Altuna X, Patel A, Weisman RA, Ongkeko WM. 2012. *EGFR kinase promotes acquisition of stem cell-like properties: a potential therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma stem cells*. <u>PLoS One</u> 7(2):e32459.
- Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L. 1999. *Inverse relationship* between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. <u>Clin Cancer Res</u> 5(10):2884-2890.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. 2003. *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 100(7):3983-3988.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. <u>Curr Biol</u> 7(4):261-269.
- Ali IU, Schriml LM, Dean M. 1999. *Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity*. <u>J Natl Cancer Inst</u> 91(22):1922-1932.
- Alison MR, Lin WR, Lim SM, Nicholson LJ. 2012. *Cancer stem cells: in the line of fire.* <u>Cancer Treat Rev</u> 38(6):589-598.
- Anastasov NA, Hofig I, Vasconcellos IG, Rappl K, Braselmann H, Ludyga N, Auer G, Aubele M, Atkinson MJ. 2012. *Radiation resistance due to high expression of miR-*21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. Radiat Oncol 7(1):206.
- Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT. 1998. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. Curr Biol 8(12):684-691.
- Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. 1997. *Role of translocation in the activation and function of protein kinase B*. <u>J Biol Chem</u> 272(50):31515-31524.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. 2006. *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation* of the DNA damage response. <u>Nature</u> 444(7120):756-760.
- Baumann M, Dorr W, Petersen C, Krause M. 2003. *Repopulation during fractionated radiotherapy: much has been learned, even more is open*. <u>Int J Radiat Biol</u> 79(7):465-467.
- Baumann M, Krause M, Hill R. 2008. *Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance*. <u>Nat Rev Cancer</u> 8(7):545-554.
- Baumann M, Krause M, Thames H, Trott K, Zips D. 2009. *Cancer stem cells and radiotherapy*. Int J Radiat Biol 85(5):391-402.
- Beier CP, Beier D. 2011. *CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma*. Front Biosci (Elite Ed) 3:701-710.
- Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Siragusa A, Dreher E, Smith PD. 2001. *EGFR* dependent expression of STAT3 (but not STAT1) in breast cancer. Int J Oncol 19(6):1155-1160.
- Beskow C, Skikuniene J, Holgersson A, Nilsson B, Lewensohn R, Kanter L, Viktorsson K. 2009. *Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86*. <u>Br J Cancer</u> 101(5):816-821.
- Bhatia M. 2001. AC133 expression in human stem cells. Leukemia 15(11):1685-1688.
- Bleau AM, Hambardzumyan D, Ozawa T, Fomchenko EI, Huse JT, Brennan CW, Holland EC. 2009. *PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells*. <u>Cell Stem Cell</u> 4(3):226-235.
- Bonnet D, Dick JE. 1997. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. <u>Nat Med</u> 3(7):730-737.

- Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. 2001. *Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation*. <u>Cancer Res</u> 61(10):3986-3997.
- Brooks PJ, Theruvathu JA. 2005. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. <u>Alcohol</u> 35(3):187-193.
- Brunner TB, Kunz-Schughart LA, Grosse-Gehling P, Baumann M. 2012. *Cancer stem cells as a predictive factor in radiotherapy*. <u>Semin Radiat Oncol</u> 22(2):151-174.
- Campos B, Herold-Mende CC. 2011. Insight into the complex regulation of CD133 in glioma. Int J Cancer 128(3):501-510.
- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 296(5573):1655-1657.
- Carpenter CL, Auger KR, Chanudhuri M, Yoakim M, Schaffhausen B, Shoelson S, Cantley LC. 1993. *Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit*. J Biol Chem 268(13):9478-9483.
- Carter CA, Shaw BL. 2000. *Retinoic acid affects the EGF-R signaling pathway during differentiation induction of human endometrial adenocarcinoma cells*. <u>Exp Mol</u> <u>Pathol</u> 68(3):170-186.
- Chan DW, Chen BP, Prithivirajsingh S, Kurimasa A, Story MD, Qin J, Chen DJ. 2002. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. <u>Genes Dev</u> 16(18):2333-2338.
- Chan DW, Lees-Miller SP. 1996. *The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit*. <u>J Biol Chem</u> 271(15):8936-8941.
- Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. 2003. *Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy.* Leukemia 17(3):590-603.
- Chattopadhyay A, Vecchi M, Ji Q, Mernaugh R, Carpenter G. 1999. The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. J Biol Chem 274(37):26091-26097.
- Chen BP, Chan DW, Kobayashi J, Burma S, Asaithamby A, Morotomi-Yano K, Botvinick E, Qin J, Chen DJ. 2005. *Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks*. <u>J Biol Chem</u> 280(15):14709-14715.
- Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, Chen DT, Tai LK, Yung MC, Chang SC, Ku HH, Chiou SH, Lo WL. 2009. *Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer*. <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> 385(3):307-313.
- Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, Hung SC, Chang YL, Tsai ML, Lee YY, Ku HH, Chiou SH. 2008. *Oct-4 expression maintained cancer stem-like* properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. <u>PLoS One</u> 3(7):e2637.
- Cho HJ, Kim JK, Kim KD, Yoon HK, Cho MY, Park YP, Jeon JH, Lee ES, Byun SS, Lim HM, Song EY, Lim JS, Yoon DY, Lee HG, Choe YK. 2006. Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. Cancer Lett 237(1):56-66.
- Choi EJ, Ryu YK, Kim SY, Wu HG, Kim JS, Kim IH, Kim IA. 2010. *Targeting epidermal* growth factor receptor-associated signaling pathways in non-small cell lung cancer cells: implication in radiation response. <u>Mol Cancer Res</u> 8(7):1027-1036.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. 2006. *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. <u>Cancer Res</u> 66(19):9339-9344.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. 2005. *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. <u>Cancer Res</u> 65(23):10946-10951.
- Corbeil D, Roper K, Weigmann A, Huttner WB. 1998. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? <u>Blood</u> 91(7):2625-2626.

- Critchlow SE, Jackson SP. 1998. DNA end-joining: from yeast to man. <u>Trends Biochem</u> <u>Sci</u> 23(10):394-398.
- Croker AK, Allan AL. 2011. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH(hi)CD44 (+) human breast cancer cells. <u>Breast Cancer Res Treat</u>.
- Cui F, Wang J, Chen D, Chen YJ. 2011. *CD133 is a temporary marker of cancer stem cells in small cell lung cancer, but not in non-small cell lung cancer*. <u>Oncol Rep</u> 25(3):701-708.
- Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. 2007. *Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells*. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 104(24):10158-10163.
- Davis AJ, Lee KJ, Chen DJ. 2013. The amino-terminal region of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) is required for its DNA double-strand break-mediated activation. J Biol Chem.
- De Luca LM. 1991. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. FASEB J 5(14):2924-2933.
- Debeb BG, Xu W, Mok H, Li L, Robertson F, Ueno NT, Reuben J, Lucci A, Cristofanilli M, Woodward WA. 2010. *Differential radiosensitizing effect of valproic acid in differentiation versus self-renewal promoting culture conditions*. <u>Int J Radiat Oncol</u> Biol Phys 76(3):889-895.
- Dent P, Yacoub A, Contessa J, Caron R, Amorino G, Valerie K, Hagan MP, Grant S, Schmidt-Ullrich R. 2003. *Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways*. <u>Radiat Res</u> 159(3):283-300.
- Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF. 2009. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. <u>Nature</u> 458(7239):780-783.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. 1995. *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 92(20):9363-9367.
- Ding Q, Reddy YV, Wang W, Woods T, Douglas P, Ramsden DA, Lees-Miller SP, Meek K. 2003. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. Mol Cell Biol 23(16):5836-5848.
- Dingli D, Michor F. 2006. Successful therapy must eradicate cancer stem cells. <u>Stem Cells</u> 24(12):2603-2610.
- Dittfeld C, Dietrich A, Peickert S, Hering S, Baumann M, Grade M, Ried T, Kunz-Schughart LA. 2010. *CD133 expression is not selective for tumor-initiating or radioresistant cell populations in the CRC cell line HCT-116*. <u>Radiother Oncol</u> 94(3):375-383.
- Dong LQ, Liu F. 2005. *PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle.* <u>Am J Physiol Endocrinol Metab</u> 289(2):E187-196.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. 2003. *In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells*. <u>Genes & Dev</u> 17: 1253-1270.
- Douville J, Beaulieu R, Balicki D. 2009. *ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells*. <u>Stem Cells Dev</u> 18(1):17-25.
- Duester G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. <u>Eur J Biochem</u> 267(14):4315-4324.
- Duru N, Fan M, Candas D, Menaa C, Liu HC, Nantajit D, Wen Y, Xiao K, Eldridge A, Chromy BA, Li S, Spitz DR, Lam KS, Wicha MS, Li JJ. 2012. *HER2-associated*

radiation resistance of breast cancer stem cells isolated from HER2-negative breast cancer cells. <u>Clin Cancer Res</u>.

- Dvir A, Peterson SR, Knuth MW, Lu H, Dynan WS. 1992. *Ku autoantigen is the regulatory* component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 89(24):11920-11924.
- Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. <u>Cell Death Differ</u> 15(3):504-514.
- Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. 2008. Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. <u>Stem Cells</u> 26(12):3027-3036.
- Facchino S, Abdouh M, Chatoo W, Bernier G. 2010. *BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery*. J Neurosci 30(30):10096-10111.
- Facompre N, Nakagawa H, Herlyn M, Basu D. 2012. *Stem-like cells and therapy resistance in squamous cell carcinomas*. <u>Adv Pharmacol</u> 65:235-265.
- Fahy BN, Schlieman M, Virudachalam S, Bold RJ. 2003. AKT inhibition is associated with chemosensitisation in the pancreatic cancer cell line MIA-PaCa-2. Br J Cancer 89(2):391-397.
- Fargeas CA, Corbeil D, Huttner WB. 2003. AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature. <u>Stem</u> <u>Cells</u> 21(4):506-508.
- Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W, Maitra A. 2007. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. <u>Cancer Res</u> 67(5):2187-2196.
- Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z. 2009. *Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri*. <u>Oncol Rep</u> 22(5):1129-1134.
- Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA. 2004. *Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase*. J Biol Chem 279(39):41189-41196.
- Feng Y, Dai X, Li X, Wang H, Liu J, Zhang J, Du Y, Xia L. 2012. EGF signalling pathway regulates colon cancer stem cell proliferation and apoptosis. <u>Cell Prolif</u> 45(5):413-419.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. 2007. *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. <u>Ann Oncol</u> 18(3):581-592.
- Friesen C, Fulda S, Debatin KM. 1997. *Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas)* system in drug-resistant cells. Leukemia 11(11):1833-1841.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. 2007. *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. <u>Cell Stem Cell</u> 1(5):555-567.
- Giralt J, de las Heras M, Cerezo L, Eraso A, Hermosilla E, Velez D, Lujan J, Espin E, Rosello J, Majo J, Benavente S, Armengol M, de Torres I. 2005. *The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis.* <u>Radiother Oncol</u> 74(2):101-108.
- Golding SE, Morgan RN, Adams BR, Hawkins AJ, Povirk LF, Valerie K. 2009. *Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA doublestrand break repair in human glioma cells*. <u>Cancer Biol Ther</u> 8(8):730-738.

- Golding SE, Rosenberg E, Adams BR, Wignarajah S, Beckta JM, O'Connor MJ, Valerie K. 2012. *Dynamic inhibition of ATM kinase provides a strategy for glioblastoma multiforme radiosensitization and growth control*. <u>Cell Cycle</u> 11(6):1167-1173.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med 183(4):1797-1806.
- Gordon MY, Goldman JM, Gordon-Smith EC. 1985. 4-Hydroperoxycyclophosphamide inhibits proliferation by human granulocyte-macrophage colony-forming cells (GM-CFC) but spares more primitive progenitor cells. Leuk Res 9(8):1017-1021.
- Gottlieb TM, Jackson SP. 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. <u>Cell</u> 72(1):131-142.
- Greaves M, Maley CC. 2012. Clonal evolution in cancer. Nature 481(7381):306-313.
- Guo Q, Huang X, Zhang J, Luo Y, Peng Z, Li S. 2012. Downregulation of peroxiredoxin I by a novel fully human phage display recombinant antibody induces apoptosis and enhances radiation sensitization in A549 lung carcinoma cells. <u>Cancer Biother</u> <u>Radiopharm</u> 27(5):307-316.
- 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. 2002. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. <u>Clin Cancer Res</u> 8(3):885-892.
- Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. 2006. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. Exp Cell Res 312(19):3701-3710.
- Hambardzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK, Pandolfi PP, Manova-Todorova K, Holland EC. 2008. *PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo*. <u>Genes Dev</u> 22(4):436-448.
- Heppner GH. 1984. Tumor heterogeneity. Cancer Res 44(6):2259-2265.
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. 2007. *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. <u>Cell Stem Cell</u> 1(3):313-323.
- Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. 2004. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 101(39):14228-14233.
- Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. 2007. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. Cancer Res 67(10):4827-4833.
- Hoey T, Yen WC, Axelrod F, Basi J, Donigian L, Dylla S, Fitch-Bruhns M, Lazetic S, Park IK, Sato A, Satyal S, Wang X, Clarke MF, Lewicki J, Gurney A. 2009. DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency. <u>Cell</u> <u>Stem Cell</u> 5(2):168-177.
- Holbro T, Hynes NE. 2004. *ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life*. <u>Annu Rev Pharmacol Toxicol</u> 44:195-217.
- Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. 1999. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. <u>Blood</u> 94(6):2056-2064.
- Huang CP, Tsai MF, Chang TH, Tang WC, Chen SY, Lai HH, Lin TY, Yang JC, Yang PC, Shih JY, Lin SB. 2012. *ALDH-positive lung cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors*. <u>Cancer Lett</u>.
- Huang D, Gao Q, Guo L, Zhang C, Jiang W, Li H, Wang J, Han X, Shi Y, Lu SH. 2009. Isolation and identification of cancer stem-like cells in esophageal carcinoma cell lines. <u>Stem Cells Dev</u> 18(3):465-473.
- Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai ST, Jeng YM, Shew JY, Kung JT, Chen CH, Lee EY, Chang KJ, Lee WH. 2009. *Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers*. PLoS One 4(12):e8377.

- Ingham PW, McMahon AP. 2001. *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. <u>Genes Dev</u> 15(23):3059-3087.
- Ishizawa K, Rasheed ZA, Karisch R, Wang Q, Kowalski J, Susky E, Pereira K, Karamboulas C, Moghal N, Rajeshkumar NV, Hidalgo M, Tsao M, Ailles L, Waddell TK, Maitra A, Neel BG, Matsui W. 2010. *Tumor-initiating cells are rare in many human tumors*. <u>Cell Stem Cell</u> 7(3):279-282.
- Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR. 2006. *Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference*. <u>Nature</u> 442(7102):533-538.
- Jackson SP. 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. <u>Carcinogenesis</u> 23(5):687-696.
- Jamal M, Rath BH, Tsang PS, Camphausen K, Tofilon PJ. 2012. *The brain microenvironment preferentially enhances the radioresistance of CD133(+) glioblastoma stem-like cells*. <u>Neoplasia</u> 14(2):150-158.
- Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL. 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. Mol Cancer Res 7(3):330-338.
- Joiner M, Van der Kogel A. 2009. *Basic Clinical Radiobiology*. <u>Hodder Education</u> 4th Edition.
- Jones RJ, Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM, Colvin OM, Hilton J. 1995. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. <u>Blood</u> 85(10):2742-2746.
- Junop MS, Modesti M, Guarne A, Ghirlando R, Gellert M, Yang W. 2000. Crystal structure of the Xrcc4 DNA repair protein and implications for end joining. <u>EMBO J</u> 19(22):5962-5970.
- Kang M, Choi S, Jeong SJ, Lee SA, Kwak TK, Kim H, Jung O, Lee MS, Ko Y, Ryu J, Choi YJ, Jeong D, Lee HJ, Ye SK, Kim SH, Lee JW. 2012. *Cross-talk between TGFβ1 and EGFR signalling pathways induces TM4SF5 expression and epithelial-mesenchymal transition*. <u>Biochem J</u> 443.
- Kao GD, Jiang Z, Fernandes AM, Gupta AK, Maity A. 2007. *Inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt signaling impairs DNA repair in glioblastoma cells following ionizing radiation*. J Biol Chem 282(29):21206-21212.
- Karamboulas C, Ailles L. 2013. *Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors*. <u>Biochim Biophys Acta</u> 1830(2):2481-2495.
- Kast RE, Belda-Iniesta C. 2009. Suppressing glioblastoma stem cell function by aldehyde dehydrogenase inhibition with chloramphenicol or disulfiram as a new treatment adjunct: an hypothesis. Curr Stem Cell Res Ther 4(4):314-317.
- Kim MP, Fleming JB, Wang H, Abbruzzese JL, Choi W, Kopetz S, McConkey DJ, Evans DB, Gallick GE. 2011. ALDH activity selectively defines an enhanced tumorinitiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma. <u>PLoS One</u> 6(6):e20636.
- Krause M, Yaromina A, Eicheler W, Koch U, Baumann M. 2011. *Cancer stem cells: targets and potential biomarkers for radiotherapy*. <u>Clin Cancer Res</u> 17(23):7224-7229.
- Kumar P, Benedict R, Urzua F, Fischbach C, Mooney D, Polverini P. 2005. Combination treatment significantly enhances the efficacy of antitumor therapy by preferentially targeting angiogenesis. Lab Invest 85(6):756-767.
- Kvinlaug BT, Huntly BJ. 2007. *Targeting cancer stem cells*. <u>Expert Opin Ther Targets</u> 11(7):915-927.
- Lammering G, Hewit TH, Valerie K, Contessa JN, Amorino GP, Dent P, Schmidt-Ullrich RK. 2003. *EGFRvIII-mediated radioresistance through a strong cytoprotective response*. <u>Oncogene</u> 22(36):5545-5553.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. 1994. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. <u>Nature</u> 367(6464):645-648.

- Lawlor MA, Alessi DR. 2001. *PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?* J Cell Sci 114(Pt 16):2903-2910.
- Leber R, Wise TW, Mizuta R, Meek K. 1998. *The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase*. J Biol Chem 273(3):1794-1801.
- Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, Pandiella A, Rezola R, Martin AG. 2012. *Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells*. <u>Oncogene</u> 31(11):1354-1365.
- Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Muller F, Schneider F, Petersen K, Wallwiener D, Kanz L, Fend F, Perner S, Bareiss PM, Staebler A. 2011. *Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma*. <u>BMC Cancer</u> 11:42.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. 2007. *Identification of pancreatic cancer stem cells*. <u>Cancer Res</u> 67(3):1030-1037.
- Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. 2008. *Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy*. <u>J Natl Cancer Inst</u> 100(9):672-679.
- Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. 2009. *Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells*. <u>Cancer Cell</u> 15(6):501-513.
- Liang D, Shi Y. 2012. Aldehyde dehydrogenase-1 is a specific marker for stem cells in human lung adenocarcinoma. <u>Med Oncol</u> 29(2):633-639.
- Lin H, Schagat T. 1997. *Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells.* <u>Trends Genet</u> 13(1):33-39.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. 2009. *Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer*. <u>Nat Rev Drug Discov</u> 8(8):627-644.
- Logan CY, Nusse R. 2004. *The Wnt signaling pathway in development and disease*. <u>Annu</u> <u>Rev Cell Dev Biol</u> 20:781-810.
- Lundholm L, Haag P, Zong D, Juntti T, Mork B, Lewensohn R, Viktorsson K. 2013. Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumorinitiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest. <u>Cell Death Dis</u> 4:e478.
- Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. 2007. *Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells*. <u>Gastroenterology</u> 132(7):2542-2556.
- Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. 2008. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. Oncogene 27(12):1749-1758.
- Magnifico A, Albano L, Campaner S, Delia D, Castiglioni F, Gasparini P, Sozzi G, Fontanella E, Menard S, Tagliabue E. 2009. *Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab.* <u>Clin Cancer Res</u> 15(6):2010-2021.
- Manzo-Avalos S, Saavedra-Molina A. 2010. *Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption*. Int J Environ Res Public Health 7(12):4281-4304.
- Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW. 2011. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. <u>Stem Cells</u> 29(1):32-45.
- Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. 2008. *Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily*. <u>Expert Opin Drug Metab</u> <u>Toxicol</u> 4(6):697-720.
- Martelli AM, Evangelisti C, Follo MY, Ramazzotti G, Fini M, Giardino R, Manzoli L, McCubrey JA, Cocco L. 2011. *Targeting the Phosphatidylinositol 3-*

Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Network in Cancer Stem Cells. Curr Med Chem.

- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. 2007. *Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells*. <u>Nat Cell Biol</u> 9(6):625-635.
- Maugeri-Sacca M, Bartucci M, De Maria R. 2012. DNA damage repair pathways in cancer stem cells. Mol Cancer Ther 11(8):1627-1636.
- McKenna WG, Muschel RJ, Gupta AK, Hahn SM, Bernhard EJ. 2003. *The RAS signal transduction pathway and its role in radiation sensitivity*. <u>Oncogene</u> 22(37):5866-5875.
- Meng X, Li M, Wang X, Wang Y, Ma D. 2009. *Both CD133+ and CD133- subpopulations* of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. <u>Cancer Sci</u> 100(6):1040-1046.
- Miele L. 2006. Notch signaling. Clin Cancer Res 12(4):1074-1079.
- Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Rhim JS. 2007. *Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumorderived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens.* <u>Cancer Res</u> 67(7):3153-3161.
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. 1997. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. <u>Blood</u> 90(12):5013-5021.
- Moreb JS. 2008. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. <u>Curr Stem Cell Res</u> <u>Ther</u> 3(4):237-246.
- Moreb JS, Mohuczy D, Ostmark B, Zucali JR. 2007a. RNAi-mediated knockdown of aldehyde dehydrogenase class-1A1 and class-3A1 is specific and reveals that each contributes equally to the resistance against 4-

hydroperoxycyclophosphamide. Cancer Chemother Pharmacol 59(1):127-136.

- Moreb JS, Ucar D, Han S, Amory JK, Goldstein AS, Ostmark B, Chang LJ. 2012. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. Chem Biol Interact 195(1):52-60.
- Moreb JS, Zucali JR, Ostmark B, Benson NA. 2007b. *Heterogeneity of aldehyde* dehydrogenase expression in lung cancer cell lines is revealed by Aldefluor flow cytometry-based assay. <u>Cytometry B Clin Cytom</u> 72(4):281-289.
- Nagasawa H, Little JB, Lin YF, So S, Kurimasa A, Peng Y, Brogan JR, Chen DJ, Bedford JS, Chen BP. 2011. *Differential role of DNA-PKcs phosphorylations and kinase activity in radiosensitivity and chromosomal instability*. <u>Radiat Res</u> 175(1):83-89.
- Nakatsugawa M, Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Murase M, Asanuma H, Tamura Y, Morita R, Michifuri Y, Kondo T, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N. 2011. SOX2 is overexpressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumorigenicity. Lab Invest 91(12):1796-1804.
- Nicholson KM, Anderson NG. 2002. *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. <u>Cell Signal</u> 14(5):381-395.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. 2000. *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.* <u>Nat Genet</u> 24(4):372-376.
- Nowell PC. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194(4260):23-28.
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. <u>Nature</u> 445(7123):106-110.
- Overgaard J. 2007. *Hypoxic radiosensitization: adored and ignored*. <u>J Clin Oncol</u> 25(26):4066-4074.

- Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, Kim MS, Lee SH, Park IC, Rhee CH, Hong SI. 2006. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. <u>Cancer Res</u> 66(17):8511-8519.
- Pasonen-Seppanen SM, Maytin EV, Torronen KJ, Hyttinen JM, Hascall VC, MacCallum DK, Kultti AH, Jokela TA, Tammi MI, Tammi RH. 2008. *All-trans retinoic acid-induced hyaluronan production and hyperplasia are partly mediated by EGFR signaling in epidermal keratinocytes*. J Invest Dermatol 128(4):797-807.
- Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. 2005. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. J Exp Med 202(11):1599-1611.
- Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrovska A. 2013. *Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance*. <u>Radiother Oncol</u> 108(3):378-87.
- Perlmann T. 2002. Retinoid metabolism: a balancing act. Nat Genet 31(1):7-8.
- Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. 2006. *The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation*. J Natl Cancer Inst 98(24):1777-1785.
- Pires IM, Olcina MM, Anbalagan S, Pollard JR, Reaper PM, Charlton PA, McKenna WG, Hammond EM. 2012. *Targeting radiation-resistant hypoxic tumour cells through ATR inhibition*. <u>Br J Cancer</u> 107(2):291-299.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. <u>Cancer Res</u> 65(13):5506-5511.
- Povirk LF, Zhou RZ, Ramsden DA, Lees-Miller SP, Valerie K. 2007. *Phosphorylation in the serine/threonine 2609-2647 cluster promotes but is not essential for DNA-dependent protein kinase-mediated nonhomologous end joining in human whole-cell extracts*. <u>Nucleic Acids Res</u> 35(12):3869-3878.
- Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Peterson ED. 2007. *Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity*. J Am Coll Cardiol 50(23):2243-2248.
- Puck TT, Marcus PI, Cieciura SJ. 1956. *Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer*. J Exp Med 103(2):273-283.
- Ramsden DA, Gellert M. 1998. *Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks*. <u>EMBO J</u> 17(2):609-614.
- Rao QX, Yao TT, Zhang BZ, Lin RC, Chen ZL, Zhou H, Wang LJ, Lu HW, Chen Q, Di N, Lin ZQ. 2012. *Expression and functional role of ALDH1 in cervical carcinoma cells*. <u>Asian Pac J Cancer Prev</u> 13(4):1325-1331.
- Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C, Hong SM, Koorstra JB, Rajeshkumar NV, He X, Goggins M, Iacobuzio-Donahue C, Berman DM, Laheru D, Jimeno A, Hidalgo M, Maitra A, Matsui W. 2010. *Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma*. J Natl Cancer Inst 102(5):340-351.
- Rasper M, Schafer A, Piontek G, Teufel J, Brockhoff G, Ringel F, Heindl S, Zimmer C, Schlegel J. 2010. Aldehyde dehydrogenase 1 positive glioblastoma cells show brain tumor stem cell capacity. <u>Neuro Oncol</u> 12(10):1024-1033.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissmann IL. 2001. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. <u>Nature</u> 414: 105-111.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. 2007. *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. <u>Nature</u> 445(7123):111-115.

- Rizzino A. 2009. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. <u>Wiley Interdiscip Rev</u> <u>Syst Biol Med</u> 1(2):228-236.
- Rodemann HP, Dittmann K, Toulany M. 2007. *Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair*. Int J Radiat Biol 83(11-12):781-791.
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. 1994. *Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras*. <u>Nature</u> 370(6490):527-532.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem 273(10):5858-5868.
- Sahovic EA, Colvin M, Hilton J, Ogawa M. 1988. Role for aldehyde dehydrogenase in survival of progenitors for murine blast cell colonies after treatment with 4hydroperoxycyclophosphamide in vitro. <u>Cancer Res</u> 48(5):1223-1226.
- Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, Miki C, Kusunoki M. 2009. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. <u>Ann Surg Oncol</u> 16(12):3488-3498.
- Salvatori L, Ravenna L, Caporuscio F, Principessa L, Coroniti G, Frati L, Russo MA, Petrangeli E. 2011. Action of retinoic acid receptor on EGFR gene transactivation and breast cancer cell proliferation: Interplay with the estrogen receptor. <u>Biomed</u> <u>Pharmacother</u> 65(4):307-312.
- Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH. 2008. *Identification of cells initiating human melanomas*. <u>Nature</u> 451(7176):345-349.
- Shibata M, Shen MM. 2013. The roots of cancer: Stem cells and the basis for tumor heterogeneity. <u>Bioessays</u> 35(3):253-260.
- Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S. 2008. *CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors*. J Clin Invest 118(6):2111-2120.
- Siegel-Lakhai WS, Beijnen JH, Schellens JH. 2005. *Current knowledge and future directions of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa)*. <u>Oncologist</u> 10(8):579-589.
- Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, Thompson DC, Vasiliou V. 2013. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilicstress. Free Radic Biol Med 56:89-101.
- Singh S, Trevino JG, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiok S, Chellappan SP. 2012. EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. Mol Cancer 11(1):73.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. 2003. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. <u>Cancer Res</u> 63(18):5821-5828.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. 2004. *Identification of human brain tumour initiating cells*. <u>Nature</u> 432(7015):396-401.
- Sjolander A, Yamamoto K, Huber BE, Lapetina EG. 1991. Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 88(18):7908-7912.
- Sladek NE. 2002. Leukemic cell insensitivity to cyclophosphamide and other oxazaphosphorines mediated by aldehyde dehydrogenase(s). Cancer Treat Res 112:161-175.

- Smith GC, Jackson SP. 1999. The DNA-dependent protein kinase. <u>Genes Dev</u> 13(8):916-934.
- Soeda A, Inagaki A, Oka N, Ikegame Y, Aoki H, Yoshimura S, Nakashima S, Kunisada T, Iwama T. 2008. *Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells*. <u>J Biol Chem</u> 283(16):10958-10966.
- Soga T. 2012. Cancer metabolism: key players in metabolic reprogramming. Cancer Sci.
- Song G, Ouyang G, Bao S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J Cell Mol Med 9(1):59-71.
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, et al. 1993. *SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences*. <u>Cell</u> 72(5):767-778.
- Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. 2004. *Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology*. <u>Cancer Metastasis Rev</u> 23(3-4):311-322.
- Storch K, Eke I, Borgmann K, Krause M, Richter C, Becker K, Schrock E, Cordes N. 2010. *Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification*. <u>Cancer Res</u> 70(10):3925-3934.
- Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. 1999. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 96(16):9118-9123.
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S. 1998. *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. <u>EMBO J</u> 17(18):5497-5508.
- Tannock IF. 1996. *Treatment of cancer with radiation and drugs*. <u>J Clin Oncol</u> 14(12):3156-3174.
- Toker A, Newton AC. 2000. *Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site*. J Biol Chem 275(12):8271-8274.
- Toulany M, Baumann M, Rodemann HP. 2007. *Stimulated PI3K-AKT signaling mediated through ligand or radiation-induced EGFR depends indirectly, but not directly, on constitutive K-Ras activity*. <u>Mol Cancer Res</u> 5(8):863-872.
- Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, Wang S, Chen J, Dittmann K, Baumann M, Dikomey E, Rodemann HP. 2006. *Blockage of epidermal growth factor receptorphosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair*. <u>Clin Cancer Res</u> 12(13):4119-4126.
- Toulany M, Kehlbach R, Florczak U, Sak A, Wang S, Chen J, Lobrich M, Rodemann HP. 2008. *Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair*. <u>Mol Cancer Ther</u> 7(7):1772-1781.
- Toulany M, Minjgee M, Kehlbach R, Chen J, Baumann M, Rodemann HP. 2010. *ErbB2 expression through heterodimerization with erbB1 is necessary for ionizing radiation- but not EGF-induced activation of Akt survival pathway*. <u>Radiother Oncol</u> 97(2):338-45.
- Toulany M, Lee KJ, Fattah KR, Lin YF, Fehrenbacher B, Schaller M, Chen BP, Chen DJ, Rodemann HP. 2012. Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. Mol Cancer Res 10(7):945-957.
- Ullrich A, Schlessinger J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. <u>Cell</u> 61(2):203-212.
- Vasiliou V, Pappa A, Estey T. 2004. *Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism*. <u>Drug Metab Rev</u> 36(2):279-299.

- Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR. 2000. *Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism*. <u>Chem Biol Interact</u> 129(1-2):1-19.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J Biol Chem 269(7):5241-5248.
- Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, Rich JN, Sullenger BA. 2010. *Notch promotes radioresistance of glioma stem cells*. <u>Stem</u> <u>Cells</u> 28(1):17-28.
- Wang Q, He W, Lu C, Wang Z, Wang J, Giercksky KE, Nesland JM, Suo Z. 2009. Oct3/4 and Sox2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. <u>Anticancer Res</u> 29(4):1233-1241.
- Wang X, Ma Z, Xiao Z, Liu H, Dou Z, Feng X, Shi H. 2012. *Chk1 knockdown confers* radiosensitization in prostate cancer stem cells. Oncol Rep 28(6):2247-2254.
- Waters SB, Chen D, Kao AW, Okada S, Holt KH, Pessin JE. 1996. Insulin and epidermal growth factor receptors regulate distinct pools of Grb2-SOS in the control of Ras activation. J Biol Chem 271(30):18224-18230.
- Weissman IL. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. <u>Cell</u> 100(1):157-168.
- Wicha MS, Liu S, Dontu G. 2006. *Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift*. <u>Cancer</u> <u>Res</u> 66(4):1883-1890; discussion 1895-1886.
- Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC. 2007. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. Mol Biol Cell 18(4):1437-1446.
- Withers HR. 1975. *The four R's of radiotherapy*. In: Lett JT, Adler H (eds) Advances in radiation biology New York: Academic Press:241-271.
- Wu C, Alman BA. 2008. Side population cells in human cancers. Cancer Lett 268(1):1-9.
- Xia L, Wang L, Chung AS, Ivanov SS, Ling MY, Dragoi AM, Platt A, Gilmer TM, Fu XY, Chin YE. 2002. *Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation*. J Biol Chem 277(34):30716-30723.
- Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. 2008. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. <u>Cancer Cell</u> 13(2):153-166.
- Yao T, Chen Q, Zhang B, Zhou H, Lin Z. 2011. *The expression of ALDH1 in cervical carcinoma*. <u>Med Sci Monit</u> 17(8):HY21-26.
- Yarden Y. 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. <u>Eur J Cancer</u> 37 Suppl 4:S3-8.
- Zhan JF, Wu LP, Chen LH, Yuan YW, Xie GZ, Sun AM, Liu Y, Chen ZX. 2011. *Pharmacological inhibition of AKT sensitizes MCF-7 human breast cancer-initiating cells to radiation*. <u>Cell Oncol (Dordr)</u> 34(5):451-456.
- Zhang H. 2007. *Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging*. J Cell Physiol 210(3):567-574.
- Zhang M, Atkinson RL, Rosen JM. 2010. Selective targeting of radiation-resistant tumorinitiating cells. Proc Natl Acad Sci U S A 107(8):3522-3527.
- Zhang M, Behbod F, Atkinson RL, Landis MD, Kittrell F, Edwards D, Medina D, Tsimelzon A, Hilsenbeck S, Green JE, Michalowska AM, Rosen JM. 2008. *Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer*. <u>Cancer Res</u> 68(12):4674-4682.
- Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, Drager UC. 1996. *Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase*. <u>Eur J Biochem</u> 240(1):15-22.

- Zhao JS, Li WJ, Ge D, Zhang PJ, Li JJ, Lu CL, Ji XD, Guan DX, Gao H, Xu LY, Li EM, Soukiasian H, Koeffler HP, Wang XF, Xie D. 2011. *Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44*. <u>PLoS One</u> 6(6):e21419.
- Zips D, Krause M, Yaromina A, Dorfler A, Eicheler W, Schutze C, Gurtner K, Baumann M. 2008. Epidermal growth factor receptor inhibitors for radiotherapy: biological rationale and preclinical results. J Pharm Pharmacol 60(8):1019-1028.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten	
Name	Julia Mihatsch
Geburtsdatum	16.09.1981 in Schorndorf Württ.
Nationalität	deutsch
Berufstätigkeit	
seit 01/2015	Studiengangskoordinatorin, Graduate Training Center of
	Neuroscience, Universität Tübingen
06/2013 – 12/2014	Projektkoordination EU-Projekt "myCopter"
	Max-Planck-Institut für Biologische Kybernetik, Abteilung
	Wahrnehmung, Kognition und Handlung, Tübingen
Studium	
07/2009 – 03/2013	Dissertation: "Der Einfluss des Stammzellmarkers ALDH
	und des EGFR-PI3 Kinase-Akt Signalwegs auf die
	Strahlenresistenz humaner Tumorzelllinien"
	Note: Magna cum laude, 1.0
	Prof. Dr. HPeter Rodemann, Sektion für Strahlenbiologie
	und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie,
	Universitätsklinikum Tübingen
10/2007 – 03/2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin
	Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare
	Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie,
	Universitätsklinikum Tübingen
01/2007 – 08/2007	Diplomarbeit: "Zur Rolle der Aktin/Myosin-Interaktion in
	Nervenzellwachstumskegeln"
	Prof. Dr. Harald Rösner, Institut für Zoologie, Universität
	Stuttgart-Hohenheim
10/2002 – 08/2007	Studium der Biologie, Universität Stuttgart-Hohenheim
	Abschluss: Diplombiologin (Note 1.0)
10/2005 – 06/2007	Studentische Hilfskraft
	Institut für Zoologie, Universität Stuttgart-Hohenheim

07/2005 – 09/2005 Praktikum und Tätigkeit als Aushilfskraft Abteilung für Pathologie, Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart

Publikationen

Cisplatin-induced radiosensitization in non-small cell lung cancer cells is stimulated by ATM inhibition. Toulany M., <u>Mihatsch J.</u>, Holler M., Chaachouay H, Rodemann H.P. Submitted to *Radiother. Oncol.*

Selection of radioresistant tumor cells and presence of ALDH1 activity *in vitro*. <u>Mihatsch J.</u>, Toulany M., Bareiss P. M., Grimm S., Lengerke C., Kehlbach R., Rodemann H.P. *Radiother. Oncol.* 2011; 99 (3): 300-6.

Attenuation of actinomyosinII contractile activity in growth cones accelerates filopodiaguided and microtubule-based neurite elongation. Rösner H., Möller W., Wassermann T., <u>Mihatsch J.</u>, Blum M. *Brain Res.* 2007; 1176: 1-10.

Vorträge

Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie;
Dresden, 2010. Rolle des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs und Bedeutung des
Stammzellcharakters in auf Strahlenresistenz selektierten humanen Tumorzellen *in vitro*.
<u>Mihatsch J.</u>, Toulany M., Rodemann H. P.

Preise

Nachwuchsstipendium

19. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie; Dresden, 2010. Rolle des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs und Bedeutung des Stammzellcharakters in auf Strahlenresistenz selektierten humanen Tumorzellen *in vitro*. <u>Mihatsch J.</u>, Toulany M., Rodemann H. P.

Posterpreis

Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS); Tübingen,
Veränderte zelluläre "early-response"-Proteine nach ionisierender Bestrahlung –
Biomarker für individuelle Strahlenempfindlichkeit. <u>Mihatsch J.</u>, Rodemann H. P.

Posterpräsentationen

21. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie; Hamburg, 2012. Role of aldehyde dehydrogenase for radioresistance of non-selected and radioselected human tumor cells *in vitro*. <u>Mihatsch J.</u>, Toulany M., Rodemann H. P.

12th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology; Ermatingen, Schweiz, 2011. Role of EGFR-PI3K-Akt signaling and cancer stem cell characteristics in human tumor cells selected for radioresistance *in vitro*. <u>Mihatsch J.</u>, Toulany M., Rodemann H. P.

13. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS); Hamburg, 2010. Rolle des EGFR-PI3K-Akt Signalwegs und Bedeutung des Stammzellcharakters in auf Strahlenresistenz selektierten humanen Tumorzellen *in vitro*. <u>Mihatsch J.</u>, Toulany M., Rodemann H. P.

11th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology; Ermatingen, Schweiz, 2009. Identification of marker proteins of individual radiation sensitivity. <u>Mihatsch J.</u>, Rodemann H. P.

Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS); Tübingen,
Veränderte zelluläre "early-response"-Proteine nach ionisierender Bestrahlung –
Biomarker für individuelle Strahlenempfindlichkeit. <u>Mihatsch J.</u>, Rodemann H. P.

Weiterbildung

Workshop "Proteomics: From Technology to Targets and Biomarkers" Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut (NMI), Reutlingen, 2008.

Schulbildung

1992 – 2001 Max-Planck-Gymnasium, Schorndorf Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 2.1)

DANKSAGUNGEN

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. H. Peter Rodemann für die Bereitstellung des interessanten Themas, sein großes Interesse am Gelingen und die hervorragende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Martin Blum für seine herzliche Betreuung an der Universität Hohenheim und die Anfertigung des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Mahmoud Toulany gilt mein großer Dank für seine wertvolle Unterstützung und seine Anregungen während der gesamten Zeit.

Danken möchte ich auch meinen Kooperationspartnern Dr. med. Claudia Lengerke und Dr. rer. nat. Petra Bareiß, Medizinische Klinik für Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie, Rheumatologie und Pulmologie, Tübingen. Für die nette und kompetente Hilfe bei der Durchführung der FACS-Sorts danke ich Sabrina Grimm.

Ohne die Unterstützung und kollegiale Atmosphäre in der Sektion für Strahlenbiologie und Molekularen Umweltforschung hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht. Daher danke ich all meinen Kollegen, die mich über die Jahre begleitet haben. Namentlich möchte ich mich an dieser Stelle bei Eva Bathelt ganz besonders für ihre Hilfsbereitschaft im Sekretariat und ihre Freundschaft bedanken.

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

"Der Einfluss des Stammzellmarkers ALDH und des EGFR-PI3 Kinase-Akt Signalwegs auf die Strahlenresistenz humaner Tumorzelllinien"

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift