



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Wirkung der Caveolin-1 Überexpression auf die Strahlenantwort  
von TK6-Zellen**

Autor: David Barzan  
Institut / Klinik: Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Doktorvater: Prof. Dr. F. Wenz

In der Radioonkologie werden neue ergänzende Behandlungsmethoden hauptsächlich an der Steigerung der therapeutischen Breite gemessen, d. h. eine Senkung der Nebenwirkungen bei gleich bleibender oder gesteigerter Tumorkontrollrate. Vor allem bei Tumoren in der Nähe von Risikogewebe oder bei einer Vermischung von Tumor- mit Normalgewebe stoßen physikalische Strategien zur Erweiterung der therapeutischen Breite an ihre Grenzen. Hier bieten neuartige selektive gentherapeutische Ansätze, die eine Verbesserung der Radioprotektion des gesunden tumorfreien Gewebes zum Ziel haben, einen aussichtsreichen Ansatz für einen nachhaltigen Therapieerfolg. Der Vorteil der Radioprotektion besteht darin, dass bereits das Überleben einiger Stammzellen für die Repopulation des Normalgewebes nach Bestrahlung ausreichend ist.

Beim gentherapeutischen Radioprotektionsansatz wird mittels Gentransfervektoren DNA selektiv in Normalgewebszellen eingeschleust, mit dem Ziel einen strahlenresistenten Phänotyp zu erreichen. Das in dieser Arbeit verwendete Transgen CAV1 ist ein Transmembranprotein, das an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist. Es ist bekannt, dass CAV1 das Hauptstrukturprotein von Caveolae bildet, Einstülpungen der Plasmamembran an denen Signalmoleküle akkumulieren und in vielen Fällen wirkt CAV1 inhibierend auf Signaltransduktionsereignisse. Einflüsse von CAV1 auf das Zellüberleben und die DNA-Reparatur nach Bestrahlung wurden schon gezeigt.

Mit der Überexpression von CAV1 in der lymphoblastoiden B-Zelllinie TK6 wurde in dieser Arbeit ein *In-vitro*-Modellsystem geschaffen, mit dem die Einflüsse von CAV1 auf die Strahlenantwort in den endogen CAV1 defizienten TK6-Zellen gemessen werden können. Die zur Überexpression von CAV1 verwendeten eukaryotischen und lentiviralen Expressionsvektoren wurden erfolgreich kloniert. Ein Vorteil des lentiviralen Gentransfervektors besteht in einer Langzeitexpression aufgrund der Integration ins Genom der Wirtszelle. Die lentivirale Transduktion resultierte im Vergleich zur Plasmidtransfektion in einer deutlich höheren ektopischen Expression von CAV1 auf mRNA- und Proteinebene. Nach Transduktion und Selektion im Durchflusszytometer wurde eine TK6CAV1 Zellpopulation etabliert mit 90 % CAV1 exprimierenden Zellen bei durchschnittlich 1,2 Virusintegrationen pro Zelle. Anschließende Wachstumsmessungen zeigten einen Proliferationsvorteil der modifizierten TK6-Zellen in beiden Systemen, der allerdings nach lentiviral vermittelter CAV1-Expression stärker ausgeprägt war. Im Vergleich resultierte die Transfektion in 1,5 fach mehr CAV1 exprimierender Zellen als Kontrollzellen und die Transduktion zu einer 4 fach erhöhten Anzahl an TK6CAV1-Zellen als TK6wt-Zellen, gemessen sechs Tage nach einer Dosis mit 2 Gy. Vor allem bei einer klinisch relevanten Dosis von 2 Gy wurde ein Vorteil der CAV1 exprimierenden Zellen gezeigt, der sich in einer Repopulation bereits 4 Tage nach Bestrahlung bemerkbar machte ( $n = 4$ ;  $p = 0,01$ ). Die Spezifität der beobachteten Effekte konnten durch Verwendung von lentiviralen shRNA-Vektoren zur Unterdrückung der ektopischen CAV1-Expression gezeigt werden. Mit einem dieser Vektoren (pLL3.7-CAV1-shRNA-2) konnte eine Reduktion der CAV1-Expression um 95 % erreicht werden, wodurch in Wachstumsmessungen der Proliferationsvorteil von CAV1 signifikant unterdrückt werden konnte (2 Gy, Tag5;  $p < 0,05$ ). Western Blot Untersuchungen zeigten eine 5 fach bzw. 14 fach verringerte Apoptose in TK6CAV1-Zellen in einem Zeitfenster von 12 bzw. 24 h nach einer Dosis mit 2 Gy. Immunfluoreszenzanalysen ergaben eine 1,8 fach verringerte Apoptoserate in TK6CAV1 Zellen 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy ( $n = 3$ ,  $p = 0,036$ ). Ein Koloniebildungstest zeigte für TK6wt-, TK6CAV1- und TK6CAV1-shRNA2-Zellen keinen signifikanten Unterschied der Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit einer Dosis von 1 – 4 Gy ( $p > 0,05$ ). Eine mögliche Erklärung könnte ein Einfluss von CAV1 auf den Zellzyklus geben, wodurch eine Verringerung der frühen Apoptose bewirkt wird, was aber ohne Auswirkungen auf das Langzeitüberleben ist. Eine Analyse der Expression der beiden Zellzyklusregulationsproteine p53 und p21 in TK6CAV1-Zellen zeigte eine Unterdrückung der

strahleninduzierten p21-Expression 4 und 8 h nach Bestrahlung, die jedoch unabhängig von einer p53 Induktion war. Zellzyklusanalysen ergaben ausser einem erhöhten SubG1-Wert in TK6wt Zellen bis zu 6 h nach Bestrahlung keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung an Zellen in der G1-, S-, G2-, und SubG1-Phase zwischen TK6wt und TK6CAV1-Zellen bis zu 7 Tage nach Bestrahlung. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Zusammenhang zwischen CAV1 und einer unterdrückten Apoptose und p21-Expression zu klären.

Weitere präklinische Studien über das Verhältnis zwischen CAV1 und die Zellhomöostase nach Bestrahlung sind notwendig, um zu überprüfen, ob CAV1 ein potentielles Transgen für einen gentherapeutischen Ansatz zur Radioprotektion von Normalgewebszellen darstellt.