



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

**Funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen dem
Multidrug Resistenz 1 Protein und Caveolin-1 und deren Bedeutung
für die Radioprotektion von Normalgewebszellen**

Autor: Juliane Nehring
Institut / Klinik: Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Doktorvater: Privat.-Doz. Dr. P. Maier

Bei der Strahlentherapie ist die Bestrahlungsdosis limitiert durch Nebenwirkungen im Normalgewebe, v. a. in Zellen des hematopoetischen und gastrointestinalen Systems. Eine Steigerung des Therapieerfolgs könnte durch Tumorsensibilisierung und/oder Radioprotektion von gesundem Gewebe erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Studien des Labors für zelluläre und molekulare Radioonkologie der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Mannheim zum radioprotektiven Effekt der Überexpression von CAV1 oder MDR1 im TK6-Zellmodell, einer lymphoblastoiden Zelllinie, fortgesetzt, indem untersucht wurde, ob die gleichzeitige Überexpression von CAV1 und MDR1 in der in dieser Arbeit neu etablierten Zelllinie TK6-CAV1-MDR1 im Vergleich zur jeweiligen einzelnen Überexpression eine Verbesserung des Zellüberlebens nach Bestrahlung bewirkt. Zusätzlich wurde die Lokalisation von CAV1 und MDR1 ohne und mit Bestrahlung untersucht und die Bedeutung der Tyr14-Phosphorylierungsstelle von CAV1 im Hinblick auf bestrahlungsinduziertes Zellüberleben analysiert.

Für die vergleichenden Untersuchungen wurden TK6-CAV1 erfolgreich mit MDR1 lentiviral transduziert und selektiert. Die Proliferation nach Bestrahlung wurde mittels Langzeit-Assay (10 Tage, 2 Gy bis 4 Gy) und Kurzzeit-Assay (1 Gy bis 6 Gy) untersucht. Im Langzeit-Assay wiesen TK6-MDR1 im Vergleich zu TK6wt, TK6-CAV1 und TK6-CAV1-MDR1 das höchste Überleben auf, während TK6-CAV1 deutlich unter TK6-MDR1 lagen (2 Gy: 16 % niedriger, 4 Gy: 27 % niedriger; $p < 0,001$). Weder TK6-CAV1 noch TK6-CAV1-MDR1 wiesen eine höhere Proliferation als TK6wt bzw. TK6-MDR1 auf. In Übereinstimmung dazu wurde im Kurzzeit-Assay in TK6-MDR1 ein leichter, nicht signifikanter Proliferationsvorteil im Vergleich zu TK6wt beobachtet, während TK6-CAV1 niedriger lagen (24 h: $p < 0,04$). Die Kombinationszelllinie TK6-CAV1-MDR1 wies nach 48 h und 72 h die niedrigste Proliferationsrate auf. Die anhand fragmentierter Zellkerne bestimmte Apoptoserate (3- bis 8-fach erhöht, $p > 0,35$) und die Koloniebildung waren bei den untersuchten Zelllinien vergleichbar. Die Spaltung von Caspase 8 in das Spaltfragment p41/43 als Mechanismus der bestrahlungsinduzierten Apoptose wurde mittels Western Blot untersucht und ergab die höchste Spaltungsrate in TK6-CAV1, gefolgt von TK6-CAV1-MDR1, TK6wt und TK6-MDR1. Interessant war, dass in TK6-CAV1 bereits nach 36 h mehr als 60 % der maximal erreichten Caspase 8 Spaltung erreicht war, während es bei den anderen Zelllinien nur 50 % nach 48 h waren. Insgesamt konnte die radioprotektive Wirkung von MDR1 im Sinne eines Proliferationsvorteils bestätigt werden, die jedoch ohne Auswirkung auf die Apoptoserate und klonogenes Überleben blieb. Entgegen der Erwartung aus Vorarbeiten wurde eine schwache, doch konsistente pro-apoptotische Funktion von CAV1 beobachtet, sodass keine synergistische oder additive Wirkung zur Steigerung der Radioprotektion von CAV1 in Verbindung mit MDR1 gefunden wurde. Veränderte Konditionen (z. B. Zellkulturmedium) oder methodische Ursachen (z. B. schwankungsbehaftete Testmethoden) könnten als Ursache in Frage kommen; die Ergründung der Variabilität bezüglich der Strahlenwirkung auf CAV1-überexprimierende Zellen ist der erforderliche nächste Schritt zur Bewertung der Radioprotektion durch CAV1.

Die in der Literatur diskutierte Co-Lokalisation von CAV1 und MDR1 könnte die Grundlage einer direkten Interaktion sein, die u. a. die Transporteraktivität von MDR1 beeinflussen kann. Konfokalmikroskopische Studien bis 24 h nach Bestrahlung (2 Gy) zeigten eine Abnahme der Co-Lokalisationsparameter R (Pearson) um ca. 22 % ($p < 0,05$) und tM1/tM2 (Manders) um ca. 9 % (nur 1 h: $p_{tM2} < 0,03$), während anhand des Intensitätskorrelationskoeffizienten (Li) keine Änderung der Co-Lokalisation ermittelt wurde. Die Verwendung größerer Zellen, eine Kompartiment-spezifische

Auswertung und ein objektbasierter Auswerteansatz wären geeignete Maßnahmen zur Präzisierung der Lokalisation von CAV1 und MDR1 nach Bestrahlung.

Die Bedeutung der bestrahlungsinduzierten Phosphorylierung von CAV1 an Tyr14 wurde mit der neu etablierten Zelllinie TK6-CAV1^{Y14F} untersucht. Die Phosphorylierung nach oxidativem Stress (H₂O₂) bzw. Bestrahlung von CAV1 wurde durch Inhibition der Signalkinasen p38 und JNK um ca. 55 % (H₂O₂) bzw. ca. 25 % gemindert ($p \leq 0,01$), während Kinasen der SRC-Familie nur für die durch H₂O₂ induzierte Phosphorylierung relevant waren (Abnahme: ca. 70 %, $p = 0,001$). Die Phosphorylierung von CAV1 stieg ca. 5-fach nach 2 Gy bis 4 Gy bzw. nach 1 mM bis 5 mM H₂O₂ ($p < 0,03$). Sowohl bis 10 Tage nach Bestrahlung mit 2 Gy ($p < 0,005$) und bis 72 h nach Bestrahlung mit 1 Gy bis 6 Gy ($p < 0,01$) war die Proliferationsrate in TK6-CAV1 niedriger als in TK6-CAV1^{Y14F}. Hinsichtlich Kernfragmentierungsrate und Koloniebildung ergaben sich jedoch keine Unterschiede im Zelllinienvergleich. Wahrscheinlich sind unterschiedliche Zellsignalwege relevant für den H₂O₂- bzw. bestrahlungsinduzierten Zelltod, und möglicherweise werden unterschiedliche Zelltodmechanismen aktiviert, sodass eine multimodale Rolle von CAV1 und der Phosphorylierung an Tyr14 ausgeht.